



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

COMPARACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES FÁRMACOS EN
UN MODELO ANIMAL DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

ANA LUISA GUTIÉRREZ VALDEZ

DIRECTORA DE TESIS: .DRA. MARÍA ROSA AVILA COSTA

ESTADO. DE MEXICO.

SEPTIEMBRE, 2007



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.

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de agosto del 2007, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) de la alumna **Gutiérrez Valdez Ana Luisa** con número de cuenta **97541651** con la tesis titulada: **"Comparación del efecto de diferentes fármacos en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson"** bajo la dirección de la **Dra. María Rosa Ávila Costa**.

Presidente:	Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes
Vocal:	Dr. Jorge Guevara Fonseca
Secretario:	Dra. María Rosa Ávila Costa
Suplente:	Dra. Laura Colín Barenque
Suplente:	Dr. Abel Santamaría del Ángel

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 30 de agosto del 2007

Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

Agradezco el apoyo brindado para la realización de este trabajo a:

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
(**CONACYT**) NÚMERO DE BECARIO 194064

PAPIIT-DGAPA-UNAM PROYECTO 213705

Del mismo modo, agradezco al comité tutorial por su apoyo y por sus aportaciones para la realización de este trabajo

Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes

Dr. Jorge Guevara Fonseca

Dra. María Rosa Avila Costa.

Dra. Laura Colín Barenque

Dr. Abel Santamaría del Ángel

DEDICATORIAS

A mi Papá con todo mi AMOR, AGRADECIMIENTO y ADMIRACIÓN porque la culminación de este trabajo es parte de ti. Gracias por darme todo ese apoyo incondicional en todo momento!!!

A María Rosa, porque siempre estas ahí, por tu confianza, por enseñarme que cuando deseas algo NADA es imposible, por impulsarme a ser mejor, por tu apoyo incondicional y cariño, de verdad... no me alcanzan las palabras ni las letras para decirte GRACIAS!!!..... iiiTe quiero muchísimo!!!

A mis hermanos: Luis, Fabiola y Angélica por todo su cariño y apoyo, los quiero muchísimo!!!

A mis niños Arely, Azael y Cesar, porque con tan solo una sonrisa me alegran la vida.

A mis tíos: Roberto, Tete, Keta y Belem, por sus sabios consejos y sobre todo por su cariño, gracias!!!

A ti, por ser alguien muy especial en mi vida, te quiero muchísimo!!!

A Vero por tu amistad, por tus aportaciones valiosas para la realización de este trabajo y sobre todo por enseñarme que la vida es mas fácil dependiendo del cristal con que lo mires.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Ariadna, Cesar, Chucho, Enrique, Fidencio, José Luis, Lauris, Leo, Lichita, Luis Clemente, Luisa, Paty, Ricardo y Vero porque además de formar un excelente equipo de trabajo somos una bonita familia, gracias por su apoyo y cariño!!!

A Luisa por tu confianza y amistad!!!

A mis amigos: Adriana, Araceli, Arturo, Aurora, Cesar, Erika, Israel, Liliana, Luigi, por su apoyo y por todos esos maravillosos momentos que compartimos juntos.

A Imelda y Noemí por su valiosa amistad y estar en las buenas y en las malas, gracias!!!

A mis amigas de toda la vida Julieta y Elsa por su amistad de tanto tiempo y por todos esos momentos compartidos.

A Vianey, Gaby y Marce por su amistad.

A mis amigos Mario, Sergio, Luis Felipe, por nuestra amistad y por los momentos tan divertidos que pasamos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al laboratorio de aminoácidos excitadores, muy especialmente al Dr. Abel Santamaría por el apoyo brindado para llevar a cabo la realización de la técnica de peroxidación de lípidos. Gracias!!!

INDICE.	PAG.
	Resumen
1. Introducción-----	1
1.1 Antecedentes-----	3
1.2 Etiología-----	5
1.3 Disfunción mitocondrial-----	6
1.4 Factores ambientales-----	6
1.5 Factores genéticos-----	6
1.6 Estrés oxidativo-----	7
2. Ganglios basales-----	9
2.1 Anatomía-----	9
2.2 Organización funcional-----	11
2.3 Interacción de neurotransmisores-----	13
2.4 Poblaciones celulares-----	16
2.5 Consecuencias de la depleción dopaminérgica-----	18
3. Modelos experimentales-----	19
3.1 Reserpina-----	19
3.2 MPTP-----	20
3.3 Paraquat-----	21
3.4 Rotenona-----	21
3.5 6-OHDA-----	22
4. Tratamientos-----	24
4.1 Agonistas dopaminérgicos-----	24
4.2 L-DOPA-----	25
4.3 Apomorfina-----	28
4.4 Bromocriptina-----	28
4.5 Ropinirol-----	29
4.6.-Anticolinergicos-----	29
4.7 Inhibidores de la MAO-----	30
4.8 Potenciadores de la liberación de DA-----	31
4.9 Factores neurotróficos-----	31
4.10 Terapias Génica-----	32
4.12 Antioxidantes-----	33
4.13 Vitaminas E-----	33
4.14 Co-Enzima Q-----	34
4.15 Melatonina-----	34
5. Justificación-----	41
6. Hipótesis-----	41
7. Objetivo general-----	41
7.1Objetivos particulares-----	41
8. Metodología-----	42
9. Resultados-----	45
9.1 Conducta motora-----	45
9.2 Células inmunorreactivas a TH-----	46

9.3	Diámetro del botón presináptico	49
9.4	Estructura postsináptica	49
9.5	Sinapsis perforadas	50
9.6	Peroxidación de lípidos	53
10.-	Discusión	57
10.1	Conducta motora	57
10.2	Células inmunorreactivas a TH	60
10.3	Ultraestructura	63
10.4	Peroxidación de lípidos	65
11.-	Conclusión	70
12.-	Referencias Bibliográficas	71
13.-	Apéndice	86

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden motor caracterizado por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra pars compacta* (SNc); su etiología es desconocida, pero existe una amplia evidencia que sugiere que las especies reactivas de oxígeno juegan un papel muy importante en la neurodegeneración que ocurre en dicha enfermedad.

La melatonina es un producto de secreción de la glándula pineal, y tiene la característica de actuar como antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo*. Mientras que la levodopa es el fármaco más empleado en el tratamiento de la EP debido a su eficacia clínica, pero el tratamiento crónico produce efectos adversos como las disquinesias. Por lo que nuestro objetivo fue determinar si el tratamiento con melatonina protege las alteraciones inducidas por la inyección unilateral con 6-OHDA y compararla con el tratamiento con L-DOPA.

Se utilizaron 24 ratas macho previamente entrenadas en la viga de equilibrio; 18 animales fueron lesionados en el haz medial del cerebro anterior con 8 μ g de 6-OHDA, después de la lesión, 6 ratas fueron tratadas oralmente con 15 mg/Kg de L-DOPA, y otro grupo (n=6) con 10mg/Kg de melatonina durante 30 días, 6 ratas lesionadas sin tratamiento fueron mantenidas durante el mismo tiempo. El grupo control (n=6) fue inyectado con 4 μ l de solución vehículo (salina y ácido ascórbico). La evaluación de la conducta motora fue a los 7, 14, 21 y 28 días después de la lesión. Al término del tratamiento las ratas fueron sacrificadas y se tomó la SNc para la técnica de inmunocitoquímica para tirosina hidroxilasa (TH) y se realizó un conteo de neuronas inmunorreactivas. Asimismo, se obtuvo el núcleo estriado para el análisis ultraestructural. Posteriormente se lesionaron otros animales de la misma manera y se obtuvo el núcleo estriado y la SN para la medición de peroxidación de lípidos por fluorometría.

En nuestros resultados encontramos que los animales lesionados con 6-OHDA mostraron alteraciones en la conducta motora en todas las evaluaciones, a diferencia del grupo tratado con L-DOPA, quien presentó recuperación de la conducta motora en los primeros días de tratamiento, pero después de un tiempo los animales manifestaron deterioro en la actividad motora. Los animales tratados con melatonina tuvieron recuperación gradual de la conducta, siendo más evidente a los 28 días (en este mismo tiempo, los animales tratados con levodopa presentaron deterioro motor evidente). A nivel citológico encontramos que el grupo de 6-OHDA y los animales con L-DOPA presentaron pérdida drástica de células dopaminérgicas, alteraciones ultraestructurales importantes, y altos niveles de peroxidación de lípidos, a diferencia del grupo de melatonina, el cual se caracterizó por presentar mayor supervivencia de células dopaminérgicas, menor número de botones con edema y prevalencia de contactos sinápticos con espinas así como bajos niveles de peroxidación de lípidos. Por lo que consideramos que la melatonina podría ser un candidato para el tratamiento de la EP ya sea como monoterapia o en combinación con la L-DOPA, para evitar o retardar el daño producido por esta última.

SUMMARY

Parkinson's disease (PD) is a motor disorder characterized by the selective degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc), its etiology is unknown, but several evidences suggest that reactive oxygen species play a pivotal role in its pathogenesis.

Melatonin is a product secreted by the pineal gland; it acts as an antioxidant and a free radical scavenger *in vivo* and *in vitro*. L-DOPA is the most common drug for the treatment of Parkinson's disease because of its clinical efficacy. However, chronic L-DOPA treatment is associated with the development of adverse reactions like dyskinesias. Thus we conducted this study to determine if Melatonin reverted the alterations induced by 6-OHDA and compare the results with L-DOPA treatment.

Twenty-four male rats were trained in the beam-walking test before the lesion; 18 animals were stereotactically injected in the medial forebrain bundle with either 8µg/Kg of 6-OHDA (n=12), or sham lesioned with 4µl of vehicle (n=6). Two days after the lesion, rotational behavior was tested and 2 days later rats were treated with 10mg/kg Melatonin (n=6) or L-DOPA (n=6) orally for a month and 6 lesioned rats without treatment were kept for the same time. At 7, 14, 21 and 28 days, after the lesion motor behavior was evaluated, measuring the ability of rats to traverse a graded series of narrow beams to reach an enclosed safety platform. Rats were sacrificed, and ipsi and contralateral SN were processed for tyrosine hydroxylase (TH) immunocytochemistry to count dopaminergic neurons, we also took small fragments from ipsi and contralateral striatum for the ultrastructural study. A second experiment was carried out, where the animals were lesioned and treated in the same way and the fragments from the ipsi and contralateral striatum and SN were used to measure the lipid peroxidation trough fluorometry.

We found that the 6-OHDA lesioned rats showed alteration in the beam walking task at all evaluated times, in contrast the L-DOPA treated rats exhibited improve in the motor behavior at the first treatment days but after sometime the animals showed poor motor performance. The Melatonin treated rats had gradual motor behavior improvement, the improvement was more evident at 28 days after the lesion (in this time the L-DOPA treated animals showed evident motor alteration). At cytological level we found in the 6-OHDA group and L-DOPA treated rats a drastic loss of dopaminergic cells, ultrastructural alterations and high levels of lipid peroxidation, in contrast melatonin treated rats showed more dopaminergic cells, less number of synaptic endings with edema, more synaptic contacts with dendritic spines as well as low levels of lipid peroxidation.

Our results suggest that melatonin could be a possible candidate for treating PD like monotherapy or in combination with L-DOPA in order to avoid or delay the damage produced by L-DOPA.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo de los ganglios basales el cual es progresivo y deja al paciente incapacitado para ejecutar correctamente movimientos voluntarios. Se observa aproximadamente en el 1% de la población con edad por arriba de los 55 años (Brailowsky y García, 1996). Se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta* (SNc) por lo que existe disminución en los niveles de dopamina (DA) en los núcleos inervados por ésta, principalmente en el núcleo estriado, el cual juega un papel muy importante en la actividad motora (Luquin y Saldice, 1997).

Esta enfermedad es una patología que ocupa el segundo lugar entre las enfermedades degenerativas del sistema nervioso que afecta a personas de edad avanzada. Por lo que es importante seguir la línea de investigación en la EP ya que su prevalencia podría incrementarse en las próximas décadas debido al aumento en la esperanza de vida (Ebadi et al. 1996) De acuerdo con el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, se ha estimado que existen al menos 500,000 pacientes con EP en nuestro país, situando su prevalencia en un rango 50 a 100 casos por cada 100,000 habitantes (Góngora *et al.*, 2005).

Los pacientes con EP desarrollan cuatro rasgos clínicos principales:

- **TEMBLOR EN REPOSO.** El cual se caracteriza por ser un temblor que ocurre en reposo en una frecuencia de alrededor 3-4 HZ (Perkin, *et al.*, 2004) que se agrava con las emociones o el estrés; mejorar con la actividad y generalmente desaparece durante el sueño. Principalmente afecta las manos, pero también es frecuente en las extremidades inferiores. Suele iniciar en una mano y con el tiempo puede afectar a la otra extremidad. Este temblor de la mano provoca la conocida postura de “cuenta de monedas”, en la que la muñeca está flexionada y los dedos pulgar e índice se aproximan en un temblor fino como si estuvieran

contando monedas. Los labios y la lengua también pueden presentar temblor (Pastor y Tolosa 2001).

- RIGIDEZ MUSCULAR. Es causada por el aumento del tono muscular que afecta a todos los grupos musculares como flexores, extensores, músculos axiales o de extremidades y generalmente ocurre en fases más avanzadas. Como ocurre con el temblor, la rigidez aumenta generalmente ante situaciones de estrés (García-Martínez 2003).
- BRADICINESIA. Es la lentitud del movimiento que impide o dificulta los movimientos sucesivos o simultáneos. Clínicamente se manifiesta por una disminución en todo tipo de movimientos, pérdida de movimientos automáticos y reducción de la amplitud de los movimientos voluntarios. Al principio se manifiesta como dificultad al momento de realizar tareas motoras finas, como abrocharse los botones, escribir, etc. (Guerrero *et al.*, 2006).
- ALTERACION DE LA POSTURA. El paciente presenta inclinación de la cabeza en posición erecta, tronco dirigido hacia adelante, hombros caídos, brazos flexionados, manos delante del cuerpo y rodillas flexionadas (Jiménez-Jiménez, 2000). La alteración en la marcha que presentan estos pacientes consiste en la dificultad para iniciar el movimiento, la marcha es lenta y tienden a caminar arrastrando los pies. Debido a las alteraciones de movimiento, los pacientes tienen problemas para mantener su centro de gravedad estable y por lo tanto están sujetos a caídas frecuentes, o pérdida del equilibrio mientras están parados o caminando (Guerrero *et al.*, 2006).

Adicionalmente, pueden existir trastornos del sistema nervioso autónomo en forma de estreñimiento, sialorrea, alteraciones de la deglución, seborrea, la urgencia e incontinencia urinaria y disminución de la libido, todos estos aspectos se presentan en un 90% de los pacientes (Obeso *et al.*, 2002; Guerrero *et al.*, 2006).

En la fase tardía de la enfermedad, puede presentarse pérdida de la capacidad mental (Sánchez-Rodríguez, 2002) caracterizado por enlentecimiento cognitivo, déficit de atención y deterioro viso espacial (Guerrero *et al.*, 2006).

Como se mencionó, este padecimiento es progresivo y la incapacidad total ocurre entre los 10 y 20 años de iniciada la sintomatología característica de la enfermedad si es que no se ha ingerido ningún medicamento. Por lo general la muerte es prematura y ocurre por complicaciones secundarias, generalmente del sistema respiratorio como embolia pulmonar, infecciones respiratorias, neumonía y broncoaspiración (Otero-Siliceo 1996).

ANTECEDENTES

La EP fue descrita por primera vez por el médico y geólogo James Parkinson en 1817 en su publicación *Essay on the shaking palsy* (Ensayo sobre la parálisis agitante), como movimientos involuntarios con disminución de la fuerza muscular que están en reposo, sin alteración intelectual ni de los órganos de los sentidos (Otero-Siliceo 1996).

La EP despertó gran expectación a causa de su larga evolución y Charcot en 1880 afirmó que la EP era el quinto padecimiento más frecuente en pacientes con edades mayores de 40 a 50 años. Gowers en 1888, en una revisión de 80 pacientes informó que la edad de aparición de esta enfermedad era posterior a los 40 años de edad y aseguró que los 52 años era la edad exacta del comienzo independientemente del sexo (Hoehn y Yahr, 1987). Asimismo Purves Steward en 1898 observó que la enfermedad aparecía de los 22 a los 71 años (Alanis, 1996). Por lo que la EP se clasifica como juvenil cuando la edad de inicio es igual o inferior a 20 años, de inicio temprano cuando la edad es entre 21 y 40 años, y tardía, con 70 o más años (Giroud, 2004).

Se ha demostrado que la SNc presenta una considerable pérdida neuronal y depigmentación en pacientes que presentan la EP (Tretiakoff, 1919). En 1966 Hornykiewickz analizó cerebros de pacientes con esta enfermedad y encontró reducción significativa de DA, serotonina y noradrenalina principalmente en el cuerpo estriado y en la SNc, puntualizo que de las tres aminas biogénicas, la que más se reducía era la DA (Gibb y Less, 1991).

Así, la EP se caracteriza por un problema clínico mayor, causado por la disminución de DA en el cuerpo estriado como resultado de una severa degeneración de la vía dopaminérgica (Appel, 1981).

En la EP existe una reducción drástica en los niveles de DA y de sus metabolitos en el núcleo caudado, putamen, globo palido, SNc (ganglios basales), una

moderada pérdida de DA en el hipotálamo lateral, región olfatoria medial (Ebadi *et al.*, 1996) y *locus ceruleus* (Savitt *et al.*, 2006).

Con base en estudios postmortem, se ha asumido que al menos 60-70% de las neuronas dopaminérgicas de la SNc se debe perder antes de la aparición de los primeros síntomas clínicos (Gerlach y Reiddere 1999), ya que al inicio de la enfermedad las neuronas dopaminérgicas sobrevivientes incrementan su actividad ocasionando una mayor liberación y recambio, observándose incremento en la actividad de la tirosina hidroxilasa (TH -enzima limitante de la síntesis de catecolaminas-), mientras que las neuronas postsinápticas en el estriado incrementan sus receptores postsinápticos, esto es probablemente un mecanismo compensatorio de la pérdida progresiva de la inervación dopaminérgica (Zhang *et al.*, 2001). La característica bioquímica de esta enfermedad incluye depleción drástica del Glutión (GSH) e inhibición de la actividad del complejo I en la *sustancia nigra* (SN) de Pacientes con EP (Tirmenstein *et al.*, 2005).

Se ha observado que la pérdida neuronal asociada a la EP es distinta a la encontrada en el envejecimiento, debido a que en la EP la pérdida neuronal se concentra en la porción ventrolateral y caudal de la SNc, mientras que en el envejecimiento la porción dorsomedial es la que se encuentra afectada (Otero-Siliceo 1996). Otro dato patológico encontrado en autopsias de la mayoría de los pacientes con EP, es la presencia de inclusiones citoplasmáticas conocida como cuerpos de Lewy (Dawson y Dawson 2003), los cuales son pequeñas inclusiones esféricas de 5-25 μ m de diámetro y de 200-600 nm de largo (Lotharius y Brundin, 2002) que se encuentran formadas principalmente de una proteína llamada α -sinucleína (Bertabet *et al.*, 2002). Su función fisiológica no es muy clara, pero se ha propuesto que juega un papel muy importante en la regulación y reciclamiento de las vesículas sinápticas con particular relevancia en el almacenamiento de la DA (Moore *et al.*, 2005).

Los cuerpos de Lewy se encuentran localizados en las neuronas de la SN, y en otras regiones del cerebro como en la corteza y el *locus ceruleus* (Bertabet *et al.*, 2002), asimismo se pueden encontrar en cerebros envejecidos normales y en los cerebros de pacientes con otras enfermedades neurodegenerativas, como en la Enfermedad de Alzheimer (Lotharius y Brundin, 2002). Estudios recientes sugieren que algunas formas de Parkinson no presentan cuerpos de Lewy (Dawson y Dawson 2003).

Ahora bien, las investigaciones de la enfermedad de Parkinson se han enriquecido en los últimos 35 años, cuando además de los neuropatólogos, despertó el interés de los farmacólogos y neuroquímicos. Y es así cuando en 1976, Cotzias, Pavasiliou y Gellene, informaron por primera vez mejoría significativa con el uso de L-DOPA (Duvoisin 1987).

Rajput *et al.*, en su revisión (1974 a 1979), señalan que los pacientes con Parkinson que recibieron L-DOPA, tuvieron beneficios dentro de los primeros tres a seis meses de tratamiento; después de este tiempo mostraron un claro deterioro caracterizado por movimientos involuntarios (Otero-Siliceo 1996). Más tarde McDowell y Cerdarbaum (1982) en un estudio realizado en un periodo de 18 años reportaron la aparición de nuevos hallazgos, como las fluctuaciones presentadas por la terapia con L-DOPA, es decir presencia de disquinesias con regreso a los síntomas de la enfermedad.

ETIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

La etiología primaria del proceso degenerativo que afecta las neuronas dopaminérgicas en la EP es desconocida (Yap *et al.*, 2006). Tampoco se tiene una explicación satisfactoria de la selección por las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Koleskinova y Sobrovskaya 2003). Por lo que se han establecido numerosas hipótesis para tratar de explicar el origen de esta enfermedad (Appel, 1981).

DISFUNCION MITOCONDRIAL.

En estudios post-mortem en humanos se ha encontrado un decremento en la actividad del complejo I (NADH—ubiquinona-reductasa) y IV (citocromo c oxidasa) de la cadena respiratoria mitocondrial en la SN (Dawson y Dawson, 2003), asimismo en plaquetas y tejido muscular (DiMauro, 1993), de tal manera, que disminuye la actividad energética y se produce muerte celular; también puede incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y hacer a las neuronas más susceptibles a la excitotoxicidad por glutamato (Henzea *et al.*, 2005). Otra posibilidad es que el defecto del complejo I produzca apoptosis, ya que hay evidencias de que la reducción en el potencial de membrana mitocondrial produce como resultado del daño en la bomba de protones puede llevar a la apertura del poro de permeabilidad transitorio mitocondrial y liberar proteínas que señalizan el inicio de la apoptosis (Olanow y Tatton 1999).

FACTORES AMBIENTALES.

Diversos estudios epidemiológicos han sugerido una relación entre la industrialización y el uso de agroquímicos como factores en la incidencia de la EP, en los que se encuentran el paraquat (herbicida), y la rotenona (plaguicida; Bertabet *et al.*, 2002).

FACTORES GENETICOS

Esta hipótesis generalmente implica la presencia de factores de susceptibilidad hereditarios (Elizan y Casals, 1983; Langston *et al.*, 1983) donde se ha estimado que entre el 5 y 10% de los casos la EP es de carácter genético (Samadi *et al.*, 2006). A la fecha se identificaron 10 loci que se han relacionado con la EP hereditario (Le y Appel, 2004), de los cuales solo cinco mutaciones en 5 genes han sido identificados (Paisán Ruiz *et al.*, 2005). Por ejemplo: una de las alteraciones encontradas en pacientes que presentan la EP es una mutación en el gen que codifica para la proteína α -sinucleína, la cual está relacionada con la promoción de apoptosis, supervivencia neuronal bajo condiciones de estrés oxidativo (Olanow y Tatton, 1999) y regulación de la transmisión dopaminérgica

(Shimohama *et al.*, 2003). Se ha observado que la α -sinucleína presenta dos mutaciones: la primera es una sustitución de una alanina por una treonina en la posición 53, y la segunda es el resultado de una sustitución de una alanina por una prolina en la posición 30 (Mouradian, 2002).

La región del cromosoma 6q25.2- q27 también fue ligada inicialmente a una forma rara de parkinsonismo juvenil recesivo autosómico en familias japonesas. Posteriormente, se identificó una delección de microsatélites en una familia inglesa y se le dio el nombre de *parkin* (Moore *et al.*, 2005). Las mutaciones en tres de estos genes PARK2, PARK7 (también conocido como DJ-1) y PARK6 se relacionan con un fenotipo en particular, que se caracteriza por edad temprana de inicio y progresión lenta de la enfermedad con una buena respuesta al tratamiento con L-DOPA, pero asociado con frecuencia a la aparición temprana de discinesias (Linazasoro, 2005).

Asimismo se propone que la alteración del complejo I de la cadena respiratoria de pacientes con EP podría ser de origen hereditario, aunque todavía no existen evidencias claras (Jiménez-Jiménez *et al.*, 1998)

ESTRÉS OXIDATIVO.

Las reacciones de oxidación-reducción son procesos biológicos esenciales que conducen a la formación de diferentes compuestos en los procesos metabólicos celulares. Estas reacciones conllevan la transferencia de electrones que generan productos conocidos como radicales libres (RL) o especies reactivas de oxígeno (ROS) (Andersen, 2004). En condiciones metabólicas normales, existe un balance entre los eventos oxidativos (producto de los RL) y los sistemas de defensa antioxidante (Cadet y Brannock; 1998; León *et al.*, 2004; Yap *et al.*, 2006), como el GSH, glutatión peroxidasa (GSH-Px), superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), las cuales pueden prevenir o eliminar a las ROS (Betarbet, *et al.*, 2002).

Cuando el balance entre estos dos eventos no se logra mantener, ya sea por la pérdida o disminución del sistema protector o por el aumento en la producción de

los RL, el tejido “entra” en un estado de estrés oxidativo que provoca la destrucción indiscriminada de macromoléculas celulares como proteínas, DNA y carbohidratos (González, 1999). La generación excesiva de ROS en el sistema nervioso puede causar alteraciones en las vías de señalización del Calcio (Ca^{2+}), el cual causa una respuesta excitotóxica, es decir activación de los receptores a glutamato que desencadena una cascada de eventos que provoca la muerte celular (Barnham *et al.*, 2004; Savitt *et al.*, 2006). Generalmente los lípidos insaturados son particularmente vulnerables a las modificaciones oxidativas, la peroxidación de lípidos es el resultado del daño producido por estrés oxidativo, debido a que los RL reaccionan con el doble enlace de los ácidos grasos insaturados, tales como el ácido linoleico y ácido araquidónico, generando peroxi radicales, de tal manera que se inicia una reacción en cadena con otros ácidos grasos insaturados. La reacción en cadena conduce a la formación de metabolitos como el HNE (4 hidroxí- nonenal), acroleína, malondialdehído y F2-isoprostanes, de los cuales se encuentran en altos niveles en cerebros de pacientes con EP (González, 1999; Barnham *et al.* 2004; Yap *et al.*, 2006). La peroxidación de lípidos conlleva a la pérdida progresiva de la fluidez membranal, reducción del potencial de membrana y aumento a la permeabilidad de iones como el Ca^{2+} (Ferrer *et al.* 1999; Leist y Nicotera, 1999). El cerebro es un blanco importante de los RL debido a su gran concentración de lípidos poliinsaturados, catecolaminas, altas concentraciones de fierro y por su elevada velocidad de metabolismo oxidativo (Cruz *et al.*, 2003; Piñol *et al.*, 2006; Yap, *et al.*, 2006); además, el cerebro humano contiene niveles bajos de enzimas protectoras y de otros antioxidantes no enzimáticos. Otro aspecto significativo se relaciona con el hecho de que ciertas áreas del cerebro, como los ganglios basales, contienen grandes cantidades de fierro y otros metales de transición que constituyen factores cruciales en la generación de ROS (González *et al.*, 1999; Yap *et al.*, 2006). Se ha observado que la peroxidación de lípidos es selectivamente incrementada en la SN de Pacientes con EP, por lo que se sugiere un incremento en la producción de radicales libres que resultan en estrés oxidativo crónico, que puede causar degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas (Ebadi *et al.*, 1996;

Lotharius y Brundin, 2002).

El origen de esta sobreproducción de RL no se conoce pero se ha propuesto que se pueden generar durante el metabolismo de la DA (Ebadi *et al.*, 1996; Molina *et al.*, 1999). La DA puede autooxidarse fácilmente en especies tóxicas como quinonas, radical superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Más aún, la DA puede metabolizarse por la MAO-B (monoamino oxidasa-B) y formar DOPAC (ácido 3,4-dihidroxifenilacético) y H_2O_2 . El O_2^- puede convertirse en H_2O_2 por la SOD, o bien reaccionar con óxido nítrico (ON^\bullet) y formar peroxinitrito ($ONOO^-$). El H_2O_2 puede ser fácilmente reducido en presencia del ion hierro (Fe^{2+}) para formar a través de la reacción de Fenton, el radical hidróxilo (OH^\bullet), el cual se considera como el más dañino (Ebadi *et al.*, 1996; Cardoso *et al.*, 2005).

Estas hipótesis sirven de alguna manera, para explicar algunas de las anomalías relacionadas con la EP. Sin embargo ninguna de éstas explica clara y completamente la cascada de eventos responsables de dicha enfermedad.

Ahora bien, como se mencionó anteriormente las estructuras cerebrales involucradas en la enfermedad de Parkinson son los ganglios basales, los cuales serán descritos a continuación.

GANGLIOS BASALES

El término “ganglios basales” es usado para denominar a un número de núcleos relacionados anatómicamente y funcionalmente, los cuales se localizan en el telencéfalo, diencefalo y mesencéfalo. Estudios anatomo-funcionales reportan que los ganglios basales son un sitio de convergencia e integración de múltiples áreas sensoriales, motoras y de asociación (Wilson, 1998; Bolam *et al.*, 2000).

ANATOMÍA DE LOS GANGLIOS BASALES

Los ganglios basales son un grupo de núcleos localizados subcorticalmente, están íntimamente relacionados con el control del movimiento (Smith *et al.*, 1998). Este

grupo de núcleos incluyen: el núcleo caudado (NC), el putamen (P), el globo pálido (GP), núcleo subtalámico (NST) y la *sustancia nigra* (SN) (Gilmans y Winans, 1994) (Figura 1).

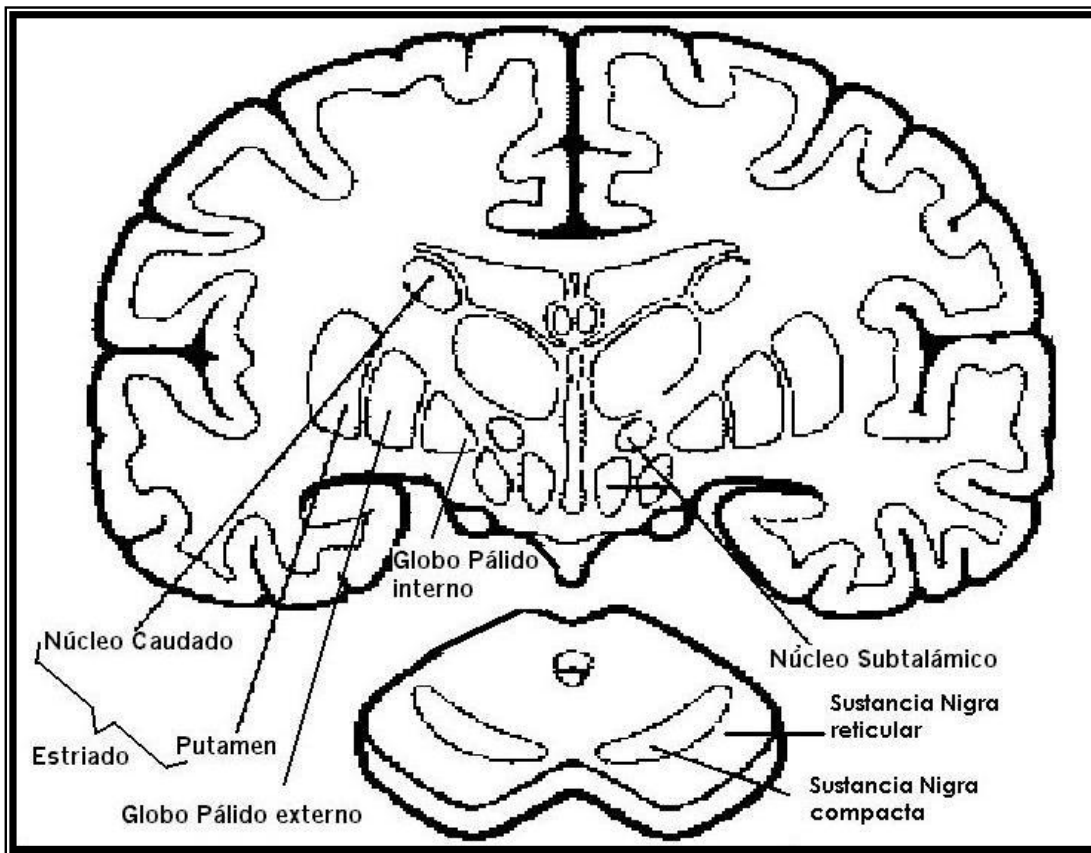


FIGURA 1. Esquema de los ganglios basales los cuales están íntimamente relacionados con el control del movimiento (tomado de Bertabet *et al.*, 2002).

Dentro de los primates, el núcleo estriado (NE) se encuentra separado por la cápsula interna en dos regiones: una región dorsomedial (el núcleo caudado) y una región ventromedial (el putamen), a estos dos núcleos se les considera como la entrada hacia los ganglios basales, ambos núcleos se desarrollan de la misma estructura telencefálica, por lo que se componen del mismo tipo celular (Carpenter, 1981). El GP es una estructura compuesta por dos segmentos, el

segmento interno (GPi) y el externo (GPe), en mamíferos inferiores se presentan el globo pálido y el núcleo entopedunculado (De Long y Georgopoulos, 1981). El NST se encuentra en la porción basal del diencefalo, en la unión con el mesencéfalo (Parent, 1990). La SN está en el mesencéfalo y presenta dos porciones una ventral llamada sustancia nigra *pars reticular* (SNr) que se semeja citológicamente al globo pálido y otra dorsal pigmentada llamada sustancia nigra *pars compacta* (SNc), compuesta por células dopaminérgicas cuyos cuerpos neuronales contienen neuromelanina (Carpenter, 1976). Este pigmento oscuro, el cual parece ser un polímero de la DA o sus metabolitos, da a la SNc su nombre, el grado de pigmentación esta correlacionado con la concentración de DA, pero la función del pigmento es desconocida (Coté y Crutcher, 1991). El GPi y la SNr constituyen los principales núcleos de salida de los ganglios basales.

ORGANIZACIÓN FUNCIONAL

Los ganglios basales no solamente se limitan a aspectos sensoriales de programación de movimientos, si no que también se encuentran relacionados con aspectos de planeación de movimientos, selección y memoria motora (Parent y Hazrati, 1995).

Las complejas conexiones de los ganglios basales se pueden simplificar con base a circuitos intrínsecos, los cuales están organizados funcional y estructuralmente, además aparentemente trabajan en paralelo y están funcionalmente segregados, relacionando corteza-ganglios basales-tálamo-corteza. A la fecha se conocen 5 circuitos principales:

- a) Circuito motor, que proyecta a regiones corticales motoras precentrales tálamo, núcleos ventral lateral *pars oralis*, ventral anterior *pars parvocellularis* y ventral anterior *pars magnocellularis*.
- b) Circuito oculomotor, que proyecta a regiones corticales visuales frontal y suplementaria y tálamo.
- c) Circuito prefrontal, que proyecta a la corteza prefrontal dorsolateral y

tálamo.

d) Circuito orbitofrontal lateral, que proyecta hacia la corteza orbitofrontal lateral y al tálamo.

e) Circuito límbico, que proyecta a la corteza cingulada anterior, a la corteza orbitofrontal medial y al tálamo (Alexander y Crutcher, 1990; Smith *et al.*, 1998).

El circuito motor se basa en la llamada “vía directa” y “vía indirecta”, para procesar, integrar y transmitir (a través de los ganglios basales) el flujo de información proveniente de la corteza cerebral. La vía directa se inicia en el estriado y proyecta directamente hacia los núcleos de salida (GPi-SNr); así mismo, del estriado parte otra vía (indirecta), en esta se hacen relevos en el GPe y NST, para finalmente dirigirla hacia los núcleos de salida (Smith *et al.*, 1998). La integración dentro del estriado se realiza a través de dos subpoblaciones de neuronas espinosas de proyección (Smith y Bolam, 1990). Ambas subpoblaciones se caracterizan por el tipo de receptores a neurotransmisores y neuropéptidos que presentan. De acuerdo a esto, las células de la vía directa expresan receptores a GABA y receptores a DA del subtipo D₁, y los neuropéptidos sustancia P y dinorfinas; mientras que las neuronas de la vía indirecta expresan GABA, receptores a DA del subtipo D₂ y los neuropéptidos encefalinas (Smith *et al.*, 1998)

Funcionalmente, la activación de ambas vías produce efectos opuestos, es decir, al incrementar la actividad de las neuronas de la vía directa se inhiben tónicamente a las neuronas de los núcleos de salida, disminuyendo la inhibición o bien se presentan la llamada “desinhibición” de las neuronas del tálamo. Mientras que al incrementar la actividad de las neuronas de la vía indirecta, se inhibe tónicamente la actividad del GPe, este decremento conlleva a la desinhibición de las neuronas del NST y éstas a su vez incrementan la actividad de los núcleos de salida, inhibiéndose las neuronas del tálamo (Alexander y Crutcher, 1990. Figura 2)

Con base a este modelo se puede tener un mejor panorama de la patofisiología de los desórdenes de movimiento asociados con la enfermedad de los ganglios basales. El incremento en la actividad de ambas vías se ha relacionado, primero con la facilitación del movimiento (vía directa) y con su inhibición (vía indirecta). De acuerdo a lo anterior se sugiere que la EP es el resultado de un desbalance en la actividad de ambas vías (DeLong, 1990; Smith *et al.* 1998).

Es importante señalar que la DA que llega al estriado al parecer desempeña funciones diferenciales sobre la actividad de ambas vías, es decir, facilita la transmisión de la vía directa y decrementa la actividad de la vía indirecta (Gerfen y Young, 1998). Funcionalmente la DA ejerce sus efectos sobre la actividad motora a través de 7 subtipos de receptores genéticamente diferentes, los cuales se han distribuido en dos familias; D₁ (D₁, D₅) y D₂ (D₃, D₄, D_{1C}, y D_{1D}). Se ha reportado, que los neuropéptidos que se localizan en ambas vías se encuentran regulados diferencialmente por la DA. Cuando aumenta la densidad de receptores D₁ (vía directa) se incrementan los niveles de expresión de sustancia P y dinorfinas, así mismo cuando aumenta la denervación de receptores D₂ (vía indirecta), se incrementa la expresión de encefalinas (Missale *et al.*, 1998).

INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES

Los ganglios basales son un grupo de núcleos que trabajan en estricta sinergia con la corteza cerebral, en donde se relacionan funciones motoras y motivacionales. Estos núcleos contienen una marcada diversidad de sustancias neuroactivas que están organizadas en subsistemas funcionales que trabajan de manera balanceada. Cualquier alteración de este balance da como resultado importantes alteraciones, como las que se observan en las enfermedades neurodegenerativas (Graybiel, 1990; Di Chiara *et al.* 1994).

Los modelos clásicos sobre la interacción entre neurotransmisores parten principalmente de observaciones clínicas, ya que tanto los agonistas a receptores dopaminérgicos así como los antagonistas de los receptores muscarínicos,

inducen algunas mejorías en los síntomas de la EP (Di Chiara y Morelli, 1993).

Evidencias experimentales indican que la DA ejerce efectos inhibitorios sobre la liberación de acetilcolina (Wilson, 1998). Asimismo la estimulación de los receptores dopaminérgicos, expresados por las interneuronas colinérgicas, inhibe la liberación de acetilcolina (Kawaguchi *et al.*, 1995). La administración de fármacos agonistas dopaminérgicos como la L-DOPA o la apomorfina inhibe la liberación de acetilcolina en el estriado, sin embargo este efecto puede bloquearse cuando se aplican antagonistas dopaminérgicos (Graybiel, 1990; Wilson, 1998). De acuerdo a lo anterior, se afirmó que la función dopaminérgica depende en parte de la inhibición de las neuronas colinérgicas (Di Chiara y Morelli, 1993). Se ha reportado que los receptores dopaminérgicos D_1 y D_2 ejercen efectos diferenciales (Smith y Bolam, 1990; Gerfen 1992), estableciéndose que la estimulación directa de los receptores D_1 facilita la liberación de acetilcolina transináptica mientras que la estimulación de los receptores D_2 la inhibe (Di Chiara y Morelli, 1993; Di Chiara, 1994).

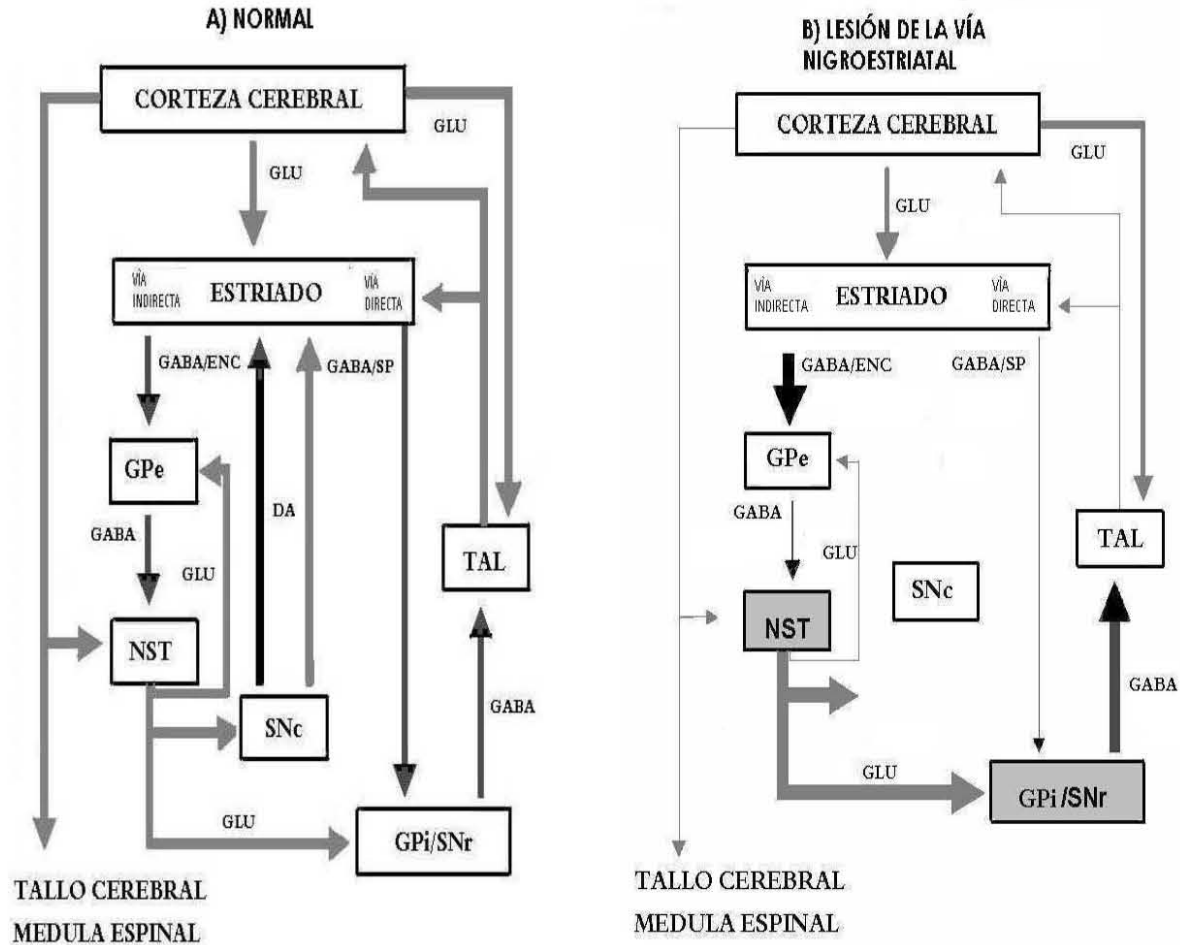


FIGURA 2. Modelo esquemático de la anatomía funcional del circuito motor corteza ganglios basales-tálamo-corteza, mostrando las vías paralelas directa e indirecta. Las líneas grises representan las conexiones glutamatergicas (GLU) excitatorias, mientras que las líneas negras muestran las conexiones GABAérgicas inhibitorias. **A:** circuito normal, en donde la vía directa incluye el Globo pálido interno (GPI) y la sustancia nigra reticular (SNr), mientras que la vía indirecta incluye el Globo pálido externo (GPe) y al Núcleo subtalámico. La dopamina (DA) proveniente de la sustancia nigra pars compacta (SNc) ejerce funciones diferenciales sobre las proyecciones de la vía directa e indirecta, mediante la activación de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 respectivamente. El GPI/SNr proyectan de regreso hacia la corteza cerebral vía Tálamo (TAL), otros de los neurotransmisores involucrados son, encefálicas, (ENC) y sustancia P (SP), **B:** Lesión de la vía nigroestriatal. El resultado de las alteraciones que se presentan después de la pérdida dopaminérgica en todo el circuito, esta indicado por el grosor de las flechas. La hiperactividad glutamatergica en el NST, es la posible causa de los síntomas parkinsonicos, ya que se incrementa la actividad de la SNr y el GPI, y se sobreinhibe el circuito talamocortical. Modificado de Wichmann y DeLong (1993).

Las proyecciones glutamatérgicas córtico-estriatales, además de las colaterales del NST y de algunas fibras talámicas, ejercen funciones excitatorias dentro del estriado estableciendo una interacción entre las terminales dopaminérgicas, colinérgicas y glutamatérgicas en las neuronas espinosas medianas (Smith y Bolam, 1990; Graybiel, 1990; Wilson 1998).

Por otro lado, las neuronas espinosas medianas de proyección, que contienen GABA inhiben la actividad de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigro-estriatal que hacen contacto en dos sitios principales: en los cuerpos celulares y en las terminales axónicas (Smith y Bolam, 1990). La microinyección de antagonistas GABAérgicos en la sustancia nigra y en el estriado, provoca que se incremente el recambio de DA. Sin embargo, este efecto es anulado cuando se administra GABA, es decir se inhibe la liberación de DA (Bartholini, 1976). Este neurotransmisor (GABA) tiene una influencia inhibitoria sobre las interneuronas estriatales (Scatton, 1987).

Como se mencionó anteriormente, los neuropéptidos se encuentran distribuidos de manera diferencial en ambas vías (Graybiel, 1990; Gerfen, 1992). Se ha reportado que la interacción entre la DA, GABA y encefalinas, estimulan la actividad motora en la rata (Voorn *et al.*, 1987; Reid *et al.*, 1990). Asimismo la sustancia P, neuroquininas y dinorfinas también estimulan esta actividad (Herrera-Marschitz *et al.*, 1986). Sin embargo, cuando se administra naloxona (antagonista de los receptores a opiáceos) esta actividad se suprime (Angulo y McEwen, 1994).

Los opiáceos como las encefalinas inhiben la actividad de las neuronas estriatales GABAérgicas, por consiguiente se presenta la desinhibición de las neuronas que proyectan al globo pálido (Dewar *et al.*, 1987; Austin y Kalivas, 1990). Además esta desinhibición de las proyecciones GABAérgicas del globo pálido, suprime la actividad de las neuronas GABAérgicas de la SNr y finalmente el tálamo es desinhibido (Graybiel, 1990; Angulo y McEwen, 1994).

El efecto regulador de la DA sobre el neuropéptido encefalina se ha estudiado a

través de investigaciones realizadas en ratas, donde la DA es depletada unilateralmente de la SNc con 6-OHDA, junto con estos estudios, se ha reportado mediante técnicas inmunocitoquímicas, que hay un incremento ipsilateral en los niveles de ARNm de metionina-encefalina y preproencefalinas (Graybiel, 1990; Pickel *et al.*, 1992; Wilson, 1998). De acuerdo a estos resultados, la DA ejerce una inhibición tónica sobre los neuropéptidos dentro del estriado de ratas.

Funcionalmente, la administración de sustancia P dentro de la SN, produce despolarización de estas neuronas (Davies y Dray, 1976), estos resultados sugieren que esta despolarización se debe a la liberación de sustancia P, por lo que se propone que las neuronas espinosas, que contienen GABA/sustancia P modulan la liberación de DA en la vía nigroestriatal (Kawaguchi *et al.*, 1995).

POBLACIONES CELULARES

Estudios celulares con tinción de Nissl revelan la existencia de aproximadamente 111 millones de neuronas en el estriado de humano (Fox *et al.* 1975), de las cuales, se describieron diferentes tipos neuronales (Gravenland *et al.*, 1985). Se estima que el 95% de las neuronas estriatales son neuronas espinosas medianas y se caracterizan por un cuerpo celular que mide entre 10-20 μ m de diámetro. Ultraestructuralmente presentan un núcleo relativamente grande con pocas indentaciones y con agregados de cromatina en la membrana nuclear, también presentan poca cantidad de citoplasma y pocos organelos (Fox *et al.*, 1971). Además presentan de 25 a 30 ramificaciones dendríticas que irradian en todas direcciones, presentando un radio de 300 a 500 μ m (Wilson, 1998). Su axón colateral se distribuye en la misma área que su árbol dendrítico (Wilson y Groves, 1980) (Figura 3A). Se ha reportado otro tipo de neurona espinosa menos común, que tiene como característica una menor densidad de espinas dendríticas, un soma más largo y pocas pero largas ramificaciones dendríticas (Bolam *et al.*, 1981; Graveland *et al.*, 1985)

El 5% restante de la población total del estriado está formado por varios tipos de neuronas llamadas interneuronas, su principal característica es la tener un soma de gran tamaño (más de $20\mu\text{m}$) y carecer de espinas en las dendritas (Figura 3B). Se han identificado entre 7 y 8 tipos de interneuronas con base a su morfología, sin embargo sólo se conocen en detalle tres tipos, de acuerdo al tipo de neurotransmisor y neuromodulador que expresan, y se caracterizan estructural y funcionalmente como:

1. Interneuronas gigantes colinérgicas que presentan el 2% de la población total en el estriado (Fox *et al.*, 1971.; DiFiglia *et al.*, 1982; Wilson, 1998).
2. Interneuronas en forma de canasta que contienen GABA/parvoalbumina, que son entre el 3-5% del número total de células, además incluyen otro grupo de interneuronas que contienen GABA/calretinina, sin embargo este tipo de interneuronas no esta caracterizada con detalle.
3. Interneuronas que contienen somatostatina /óxido nítrico sintetasa, que representan el 1-2% de la población total (DiFiglia *et al.*, 1982; Wilson 1998) (Figura 3B).

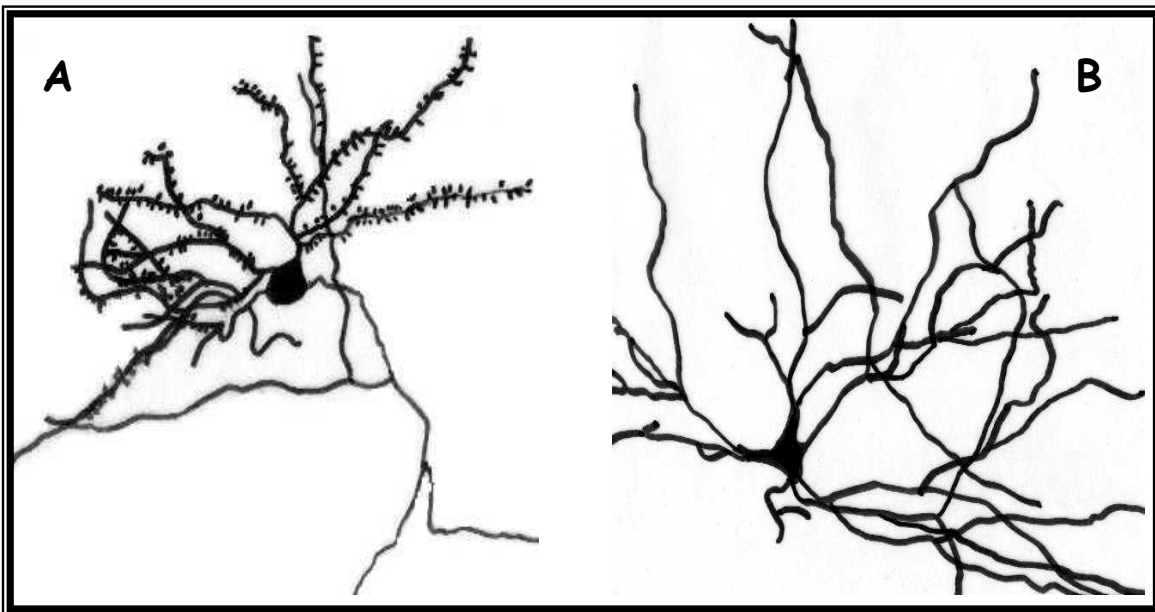


FIGURA 3. Neurona espinosa mediana que se caracteriza por presentar espinas dendríticas (A) y una interneurona colinérgica la cual se caracteriza por tener un soma de gran tamaño (más de $20\mu\text{m}$) y por carecer de espinas dendríticas (B).

En especies como ratas, ratones y gatos, las neuronas espinosas medianas de proyección representan el 95% del total de la población neuronal del estriado, aunque en otras especies este porcentaje varía, como en el mono, en donde estas neuronas representan el 77% de la población y el resto se considera que está constituido por interneuronas (Wilson, 1998).

Una gran variedad de reportes se han enfocado principalmente a describir la organización sináptica de las neuronas espinosas medianas, ya que son el principal blanco de las aferencias corticales (Wilson y Groves, 1980; Smith *et al.*, 1998). Se ha reportado que el soma de las neuronas espinosas medianas y las porciones iniciales de las dendritas, reciben al menos dos tipos de sinapsis simétricas, las cuales han sido propuestas como dopaminérgicas (Freud *et al.*, 1984). Las dendritas distales y proximales reciben sinapsis simétricas y asimétricas (Gerfen *et al.*, 1990). Las espinas dendríticas se pueden dividir en dos porciones: la región del cuello de la espina, la cual recibe principalmente sinapsis simétricas y la región de la cabeza que recibe sinapsis asimétricas generalmente excitatorias (Mensah, 1980; Smith *et al.*, 1998).

CONSECUENCIAS DE LA DEPLECIÓN DOPAMINÉRGICA

La denervación dopaminérgica estriatal provoca un aumento en la densidad de los receptores D₂ y disminución de los receptores D₁ (Qin *et al.*, 1994), lo cual resulta en complejas alteraciones en la circuitería de los ganglios basales (Figura 2B). Se ha propuesto que las neuronas que contienen los receptores D₁, reducen su tasa de disparo, lo que trae como consecuencia una reducción en la inhibición de las neuronas de la SNr/Gpi; mientras que las neuronas que contienen receptores D₂ y que proyectan al GPe producen hiperactividad glutamatérgica del NST, afectando a las neuronas de la SNr y GPi que proyectan al tálamo y son GABAérgicas es decir inhibitorias, de tal forma que se sobreinhibe el circuito talamocortical (DeLong, 1990), dicha reducción en la actividad talamocortical ha sido evidenciada por estudios de tomografía por emisión de positrones (PET) en pacientes con EP (Playford *et al.*, 1992), por lo que se piensa que esta sobreinhibición es la causa

del temblor, la rigidez y la bradicinesia se observa en los pacientes (DeLong, 1990).

Rodríguez y cols. (1998) proponen la hipótesis de que la hiperactividad glutamatérgica del NST a través de la conexión hacia la SNc puede tener influencia excitotóxica en las neuronas dopaminérgicas sobrevivientes y provocar la progresión continua de la EP. Asimismo, en registros de neuronas espinosas de proyección se muestra que la depleción dopaminérgica provoca incremento en la liberación de glutamato y alteración de la sensibilidad de los receptores postsinápticos a diferentes neurotransmisores (Calabrasi *et al.*, 1993).

Se ha observado que en modelos experimentales de la EP la pérdida de neuronas dopaminérgicas resulta en la alteración de la expresión del RNAm de algunos neuropéptidos y neurotransmisores como por ejemplo el del GABA (Wang *et al.*, 2007).

A nivel ultraestructural con la depleción de DA, se observa incremento en el tamaño de los botones presinápticos, aumento en el número de sinapsis perforadas así como cambios en los blancos postsinápticos (Colín-Barenque, 1994; Avila-Costa, 1996; 1998; Avila-Costa *et al.*, 2005). Meshul y cols. (2000) lesionaron unilateralmente en 3 diferentes sitios, la SNc, la corteza prefrontal y la combinación de la SNc/corteza prefrontal y reportan que en los tres grupos se presentó un incremento en la media del porcentaje de sinapsis asimétricas asociadas a sinapsis perforadas.

MODELOS EXPERIMENTALES.

Los estudios en animales experimentales son de gran ayuda para dilucidar los mecanismos básicos que regulan la función neuronal a nivel celular, molecular y conductual. La finalidad de generar estos modelos es recrear algunos de los eventos que suceden en las enfermedades neurodegenerativas y probar nuevas estrategias terapéuticas. El objetivo de los compuestos químicos usados en los

modelos de la EP es el de interrumpir la vía dopaminérgica nigroestriatal e imitar la deficiencia de DA observada en los pacientes con esta enfermedad (Flint, 2001; Bertabet *et al.*, 2002)

RESERPINA

La reserpina es un alcaloide aislado de la planta *Rauwolfia* (Alamo *et al.*, 2004). Se ha observado que la administración sistémica de la reserpina produce depleción de las terminales dopaminérgicas en el estriado e induce un estado de hipocinesia en roedores. La principal desventaja de este modelo es que la reserpina induce cambios que son temporales y cuando se inyecta en el estriado no induce cambios morfológicos en las células dopaminérgicas de la SNc. Sin embargo este modelo es empleado para investigar el efecto terapéutico del reemplazo dopaminérgico estriatal, incluyendo la L-DOPA y agonistas dopaminérgicos (Betarbet *et al.*, 2002).

MPTP

Después de la inyección de El 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) se observan síntomas clínicos similares a los de la EP en humanos. El MPTP es altamente liposoluble por lo que fácilmente puede cruzar la barrera hematoencefálica, posteriormente es metabolizado por los astrositos y el MPTP es convertido al ion MPP^+ , por la enzima MAO-B el cual es reconocido y tomado por el sistema de recaptura de DA de alta afinidad de las neuronas dopaminérgicas. El MPP^+ puede actuar inhibiendo el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial y de ese modo provocar estrés oxidativo (Betarbet *et al.*, 2002).

El MPTP se administra principalmente en forma sistémica, pero también se administra por diferentes vías, incluyendo vía oral, intracerebral y subcutánea (Betarbet *et al.*, 2002; Emborg, 2004). Se reporta que existe diferente susceptibilidad a la neurotoxina entre especies, ya que el ratón es más susceptible que la rata, incluso diferentes cepas de ratones pueden mostrar distinta sensibilidad. Los animales más utilizados para este modelo son el ratón y el mono,

ya que las ratas son insensibles al MPTP y la mayoría de los estudios en ratas involucran la inyección intracerebral de la toxina.

Lotharius y cols. (1999) reportan que el MPP produce bloqueo parcial del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial y se observa que a bajas y altas dosis no hay cambio ultraestructural en la mitocondria de células del estriado. Por otra parte se ha reportado que animales tratados con esta toxina presentan recuperación tanto de la conducta así como de la bioquímica del efecto producido por el MPTP. Sin embargo, estudios realizados a nivel de microscopia electrónica muestran deterioro de las células de la SNc de animales tratados con esta neurotoxina, manifestada por encogimiento, acumulo de cromatina, vacuolización, dilatación de cisternas del aparato de Golgi, inclusiones citoplasmáticas, edema mitocondrial, e inclusiones densas en las mitocondrias. En el estriado se encontró degeneración axonal evidenciado por separación de la mielina, disgregación o interrupción de microtubulos, neurofilamentos y edema de las terminales axónicas (Cochiolo *et al.*, 2000; Emborg, 2004).

Este modelo es frecuentemente utilizado para el estudio de mecanismos en la patogénesis de la EP, por ejemplo este modelo sugiere el papel de la disfunción mitocondrial y la exposición ambiental a toxinas en la patogénesis de la EP (Bertabet *et al.*, 2002).

PARAQUAT

La exposición al herbicida 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina o paraquat (PQ), que es uno de los químicos empleados en la agricultura, ha sido utilizada para generar un modelo de la EP. El PQ puede cruzar la barrera hematoencefálica, y cuando se inyecta sistémicamente en ratones produce un decremento dosis-dependiente de las células dopaminérgicas de la SNc y de la inervación estriatal, seguido por disminución en los movimientos ambulatorios. El mecanismo de acción del PQ involucra estrés oxidativo y tiene una estructura muy similar al MPP+, por lo que puede ejercer un efecto tóxico por vía de la inhibición de la cadena respiratoria

mitocondrial. El modelo de PQ soporta la teoría de que las toxinas ambientales y pesticidas pueden jugar un papel muy importante en la patogénesis de la EP (Bertabet *et al.*, 2002).

ROTENONA

Es un componente natural derivado de las raíces de cierta especie de plantas, la cual es comúnmente utilizada como un insecticida de vegetales, y también se utiliza para matar poblaciones de peces en los lagos y los depósitos. La rotenona es un inhibidor específico del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Dawson y Dawson, 2003) y causa una degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas, por lo que es utilizado para reproducir varias de las características de la EP. Debido a que la rotenona es extremadamente hidrofóbica, es capaz de cruzar las membranas biológicas fácilmente, y por lo tanto no depende del transportador de la DA para el acceso al citoplasma de las células (Díaz *et al.*, 2004). El mecanismo por el cual produce la muerte de las neuronas dopaminérgicas no es completamente entendido, pero se ha sugerido la hipótesis de la producción de especies reactivas de oxígeno. Se reporta que la exposición crónica a rotenona puede causar la acumulación de inclusiones citoplasmáticas que contienen ubiquitina y α -sinucleína (Bertabet *et al.*, 2000). La desventaja de este modelo está en base a la susceptibilidad de los animales, ya que unos animales muestran lesión y otros no (Bertabet *et al.*, 2002).

6-OHDA

La 6-Hidroxidopamina (2,4,5-trihidroxifeniletilamina; 6-OHDA) es un análogo hidroxilado de la DA (Blum *et al.*, 2001) usada extensamente para generar un modelo animal de EP; fue el primer componente descubierto para inducir la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas (Ungerstedt, 1968). Cuando se administra *in vivo* la toxina causa condiciones Parkinsonianas por decremento en los niveles de DA y de la actividad de la Tirosina Hidroxilasa (TH) dañando la recaptura de DA y causando la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Lotharius, *et al.*, 1999), se ha reportado que también produce catalepsia e

hipoactividad (Srinivasan y Schmidt, 2004).

Este modelo se ha estudiado en muchas especies animales incluyendo ratones, ratas, gatos, perros y primates no humanos. La rata es la especie más usada debido a la capacidad de réplica y a la estabilidad del modelo (Emborg, 2004).

La 6-OHDA no puede cruzar la barrera hematoencefálica, por lo que se debe administrar intracerebralmente para ejercer sus efectos tóxicos. Se estima que la vida media de la 6-OHDA en condiciones fisiológicas es de 38 minutos (Tirmenstein *et al.*, 2005). Generalmente la lesión es unilateral y la inyección se puede hacer en el haz medial, en la SN o en el estriado. Dependiendo del sitio de la inyección, el número de inyecciones y la cantidad de neurotoxina, el animal presenta diferente grado de progresión de la enfermedad, la elección de uno u otro sitio de la aplicación depende del objetivo del experimento (Emborg, 2004).

La inyección en el haz medial del cerebro anterior induce la pérdida de las células dopaminérgicas en aproximadamente el 85-90% en la SNc, llevando a la deafferentación del núcleo estriado, núcleo accumbens y corteza prefrontal (Dowd y Dunnett 2005); en comparación con otros sitios donde se induce pérdida celular de aproximadamente el 70% (Emborg, 2004). La degeneración ocurre dentro de las 24 horas después de la administración de la 6-OHDA, y la depleción de DA estriatal se puede apreciar 2 ó 3 días después de la inyección (Bertabet *et al.*, 2002).

La 6-OHDA es incorporada a la neurona por el sistema de recaptura de DA de alta afinidad, actúa inhibiendo el complejo I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial, de este modo reduce la generación de ATP (Glinka *et al.*, 1998; Lotharius, *et al.*, 1999) además causa la producción de ROS, O_2^- , OH^\bullet y H_2O_2 , induciendo subsecuentemente la degeneración de las terminales axónicas y de los cuerpos celulares (Otero-Siliceo, 1996). Andrew y cols (1993) detectaron la presencia de 6-OHDA endógena en muestras de orina de pacientes con EP, sugiriendo que este componente puede estar involucrado en la patogénesis de la enfermedad

(Tirmenstein *et al.*, 2005).

Por lo anterior el modelo de la 6-OHDA es ampliamente utilizado para imitar aspectos selectivos de este trastorno, así como para evaluar la eficacia del trasplante de células, factores neurotróficos y componentes que promueven la supervivencia de las células dopaminérgicas de la SNc en la EP. La desventaja de este modelo es que no se ha detectado la formación de las inclusiones citoplasmáticas características de la EP (cuerpos de Lewy); generalmente se emplea unilateralmente ya que si se lleva a cabo de forma bilateral produce adipsia y afagia y en consecuencia la muerte (Bertabet *et al.*, 2002).

Después de la lesión unilateral en el haz medial del cerebro anterior o bien en la SNc con la 6-OHDA, el animal presenta giro espontáneo ipsilateral y disminuye su conducta exploratoria espontánea (Ungerstedt, 1971^a). La conducta de giro puede ser provocada con la administración de algunas sustancias que activan los sistemas dopaminérgicos (Ungerstedt y Arbuthnott, 1970; Ungerstedt, 1971^b).

Una de las drogas que han sido empleadas para inducir la conducta de giro es la apomorfina (agonista dopaminérgico), la cual actúa sobre las terminales postsinápticas produciendo una mayor actividad motora en el lado ipsilateral a la lesión por lo tanto el animal gira hacia el lado que tiene menos DA (Miller y Beninger, 1991). De acuerdo a esto, si a un animal depletado de DA unilateralmente se le administra apomorfina y se registran 200 giros ó más durante 30 minutos, se puede afirmar que la denervación de DA estriatal es de un 95% o más (Ungerstedt, 1971^b).

TRATAMIENTOS

El tratamiento de la enfermedad de Parkinson sigue siendo un problema de difícil solución. Desde que se demostró que la enfermedad se debía a una deficiencia en el suministro de DA, se han establecido diversos tratamientos farmacológicos con el objeto de minimizar los síntomas de esta enfermedad y mejorar la función de las estructuras involucradas, (Kienzl *et al.*, 1999). En las últimas décadas se han

producido grandes avances en el conocimiento de las bases neuroquímicas y anatomofuncionales de la EP, lo que se ha traducido en el desarrollo de tratamientos farmacológicos y quirúrgicos con eficacia sintomática. Sin embargo, hasta el momento, ningún tratamiento ha demostrado de forma fehaciente la capacidad para modificar la evolución del proceso degenerativo (Mínguez y Escamilla 2005^a)

AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS

La característica de los agonistas dopaminérgicos es que su acción farmacológica deriva de su capacidad de activar receptores dopaminérgicos (Martínez *et al.*, 1998). Se ha mostrado que los agonistas a receptores D1, los cuales estimulan la adenilato ciclasa, no son adecuados terapéuticamente debido a que es más probable desarrollar disquinesias que con los agonistas de los receptores D2. En contraste los agonistas a receptores D2, los cuales inhiben la adenilato ciclasa son drogas antiparkinsonianas más eficaces. Por lo que en general, el uso de la mezcla de agonistas a receptores dopaminérgicos D1 y D2 proporciona un mejor control de los síntomas de la EP (Biagio y Bernardi 2005). Entre los agonistas más empleados en la terapéutica de la EP se encuentran:

L-DOPA

L-DOPA (Levo-dihidroxifenilalanina) se forma a partir del aminoácido L-tiroxina como uno de los pasos intermedios en la síntesis de catecolaminas (Otero-Siliceo, 1996), básicamente ocurren dos reacciones: la primer reacción es catalizada por la enzima TH (-enzima limitante de la síntesis de la DA- Nagatsu y Udenfriend, 1964; Levitt *et al.*, 1965) la cual convierte a la tirosina a L-3,4-dihydroxyfenilalanina (Bahena *et al.*, 2000). El siguiente paso de esta transformación es la descarboxilación de la DOPA, catabolizada por la enzima descarboxilasa de L-amino ácidos aromáticos (AADC) produciendo DA (Figura 4) (Vallone *et al.*, 2000).

Históricamente, el uso de la L-DOPA en la EP comienza en 1961, cuando Birkmayer y Hornykiewicz describieron el uso de pequeñas dosis por vía

intravenosa, posteriormente en 1967 Cotzias reportó la utilidad de este fármaco por vía oral en dosis de 4 y 8 g al día (Juri y Chana, 2006).

Es indudable que el uso de este fármaco vino a revolucionar y mejorar la calidad de vida de los pacientes, permitiéndoles realizar sus actividades cotidianas (Barbeau, 1981), por lo que hasta el momento la L-DOPA es el fármaco sintomático más efectivo en el tratamiento de la EP (Biagio y Bernardi, 2005). El mecanismo de acción no se conoce completamente, aunque su efecto parece derivar principalmente de su capacidad de elevar los niveles de DA en el estriado (Obeso *et al.*, 2000^a; Picconi *et al.*, 2004).

La DA no atraviesa la barrera hematoencefálica, (BHE), por lo que se recurre al aminoácido precursor inmediato, la L-DOPA, que sí logra atravesar la BHE utilizando un transportador propio de los aminoácidos aromáticos (Díaz *et al.* 1998). La L-DOPA se absorbe bien en el intestino delgado, pero se inactiva en una gran proporción (aproximadamente al 95%) por la MAO periférica y da lugar a la aparición de efectos secundarios como vómito y taquicardia. Una mínima parte de la dosis (5 o 10%) alcanza la circulación cerebral; por lo que con el fin de evitar esta transformación periférica, la L-DOPA suele administrarse asociada a un inhibidor de la descarboxilasa, incapaz de atravesar la BHE, como la carbidopa o la benzeracida y de esta manera se prolongan sus niveles plasmáticos y cerebrales. (Nombela *et al.* 2002; Segura *et al.* 2003; García-Minet *et al.*, 2003).

En la mayoría de los pacientes la administración crónica de la L-DOPA está asociada con una serie de complicaciones, por ejemplo problemas neuropsiquiátricos, que son desarrollados en un 40% de los pacientes, alucinaciones, delirios, y demencia desarrollada en un 30% de los pacientes (Obeso *et al.*, 2000^b; Molloy *et al.*, 2006), debido a que se ha discutido que la L-DOPA puede entrar a las neuronas dopaminérgicas de la vía mesolímbica, la cual puede resultar en síntomas psicóticos (Radad *et al.*, 2005).

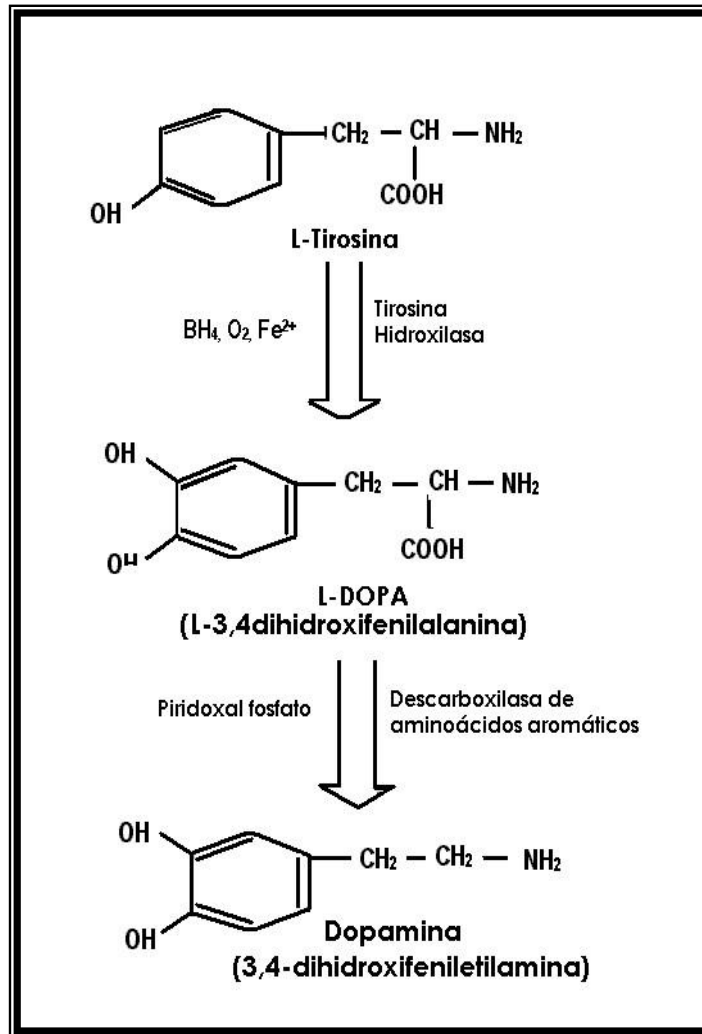


FIGURA 4. Síntesis de Dopamina

Las fluctuaciones motoras que se presentan con el tratamiento prolongado con L-DOPA, son fenómenos difíciles de entender, dichas fluctuaciones motoras y fenómenos secundarios, como las discinesias (Yamamoto *et al.*, 2006) se presentan rara vez en los primeros meses de tratamiento, excepto en algunos pacientes afectados severamente; se reporta que las discinesias se desarrollan en un 60-80% de los pacientes, (Blanchet, 1999; Linzasoro 2005).

Se ha observado que después de aproximadamente 10 años, el tratamiento con L-DOPA en pacientes Parkinsónicos deja de ser efectivo (Wooten, 1990; Biagio y Bernardi, 2005).

Los trastornos secundarios que se presentan después de un largo periodo de aplicación crónica de L-DOPA son:

- a) "Pérdida del efecto al final de la dosis" (wearing-off), es decir cuando una dosis de L-DOPA no es suficiente para mejorar los síntomas de la enfermedad antes del tiempo indicado para la siguiente dosis. Este fenómeno se presenta después de 3 ó 5 años del uso continuo de L-DOPA.
- b) Estado "efectivo-inefectivo" (on-off), Complicación que se presenta después de tiempo indefinido e impredecible, y consiste en periodos de buena respuesta a la L-DOPA y periodos de poca respuesta a este fármaco (Samadi *et al.*, 2006).

Se ha sugerido que estos transtornos representan alteraciones farmacocinéticas, o que el efecto farmacodinámico de la L-DOPA altera la sensibilidad de los receptores dopaminérgicos por su prolongada estimulación o por los cambios patológicos progresivos de la enfermedad (Otero-Siliceo, 1996). Asimismo se ha reportado que la administración a largo plazo puede acelerar la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, debido a que este fármaco incrementa la producción de radicales libres provocando en las células estrés oxidativo e induciendo su muerte (Jenner, 1995; Wolters *et al.*, 1995).

APOMORFINA

La apomorfina es un agonista dopaminérgico de los receptores D₁ y D₂, (Obeso *et al.*; 2000^b) con una actividad terapéutica máxima entre los 30 y 60 minutos después de la inyección (Giménez y García 2002), se puede administrar por vía subcutánea, intranasal, sublingual y rectal. Se ha reportado que la inyección intermitente de apomorfina por vía subcutánea es utilizada para controlar los periodos de fluctuaciones *off*, inducidos por la L-DOPA, dicha utilidad se mantiene

durante 5 años de tratamiento en muchos pacientes (Molina *et al.*, 1999; Radad *et al.*, 2005). Pero por otra parte, se ha reportado que la administración intermitente de apomorfina por vía subcutánea, puede causar problemas adversos como inflamación de la piel, que se caracteriza por la formación de nódulos dolorosos en la grasa del tejido subcutáneo (Paniculitis). La administración vía intranasal conlleva a problemas locales como costras y obstrucción nasal; la administración vía sublingual tarda más tiempo en iniciar su efecto (20-40 min de latencia), lo que representa un inconveniente de cierta importancia; y la administración vía rectal, ya sea en supositorios o enema es difícil de manejar por los propios pacientes. Además, existe una gran variabilidad personal en la respuesta, posiblemente relacionada con la variable irrigación anatómica del recto.

Posteriormente se insistió en el uso de la L-DOPA coadministrando N-propilnorapomorfina, la cual permitía su administración por vía oral, la mitad de los pacientes tratados sufrieron trastornos psiquiátricos y en muchos pacientes se reprodujeron los mismos patrones de fluctuaciones y de discinesias que ya habían experimentado previamente bajo el tratamiento con L-DOPA (Giménez y García 2002).

BROMOCRIPTINA

La 2-bromo- α -ergocriptina es un derivado del ácido lisérgico y en 1974 fue propuesto como el primer agonista dopaminérgico para la terapia en la EP (Ramaker *et al.* 2000). Al parecer la bromocriptina es utilizada en las etapas iniciales de la EP ya que retarda las complicaciones motoras inducidas por la administración a largo plazo de la L-DOPA (Ramaker *et al.*, 2000; Segura *et al.*, 2003). Sin embargo, reportes clínicos han mencionado que la Bromocriptina induce algunos efectos colaterales como náuseas, vómito (Ramarker *et al.*, 2000), cuadros de confusión y alucinaciones los cuales son frecuentes, y con el pasar del tiempo se produce una aparente disminución del beneficio (Molina *et al.*, 1999).

Un estudio realizado por Avila-Costa y cols. (2005^b), reporta que en el modelo animal de la enfermedad de Parkinson producido con 6-OHDA, el tratamiento con bromocriptina atenúo el efecto neurotóxico reduciendo el edema de los botones presinápticos y la pérdida de espinas dendríticas en el núcleo estriado de rata, asimismo protege a las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Ordóñez, 2004). Se ha propuesto que el efecto neuroprotector de la bromocriptina puede deberse a sus características antioxidantes y como atrapador de radicales libres (Radad *et al.*, 2005).

ROPINIROL

El ropinirol es un indol no ergótico que se asemeja a la DA y presenta una afinidad selectiva por receptores dopaminérgicos D2, y nula o escasa actividad sobre los receptores D1. El ropinirol se ha analizado en múltiples estudios clínicos, tanto como monoterapia como administrada en combinación con L-DOPA; estos trabajos avalan su eficacia y buena tolerancia, hasta el punto de que muchos pacientes en estadios iniciales de la EP pueden tratarse satisfactoriamente durante cinco años, o bien suplementando con L-DOPA reduce el riesgo de aparición de discinesias y consigue mantener al paciente en buena situación funcional. El ropinirol habitualmente se tolera bien, aunque con su administración pueden presentarse efectos adversos, como náuseas, hipotensión, somnolencia, incremento de las discinesias, confusión y alucinaciones (-síntomas muy parecidos al tratamiento con fármacos dopaminérgicos-Vivancos, 2006).

ANTICOLINÉRGICOS

Actualmente está claro que la liberación de acetilcolina se encuentra sujeta a un control inhibitorio continuo de la DA, mediante su acción sobre los receptores del tipo D2 presentes en las interneuronas colinérgicas, por tal motivo, la pérdida de la inervación dopaminérgica da como resultado un aumento en la liberación de acetilcolina y por tanto, un exceso de estimulación de los receptores muscarínicos del estriado, sugiriendo un papel importante de la acetilcolina en los síntomas, por lo que se ha propuesto que la eficacia de los anticolinérgicos en la enfermedad de

Parkinson se debe a una atenuación de la hiperactividad colinérgica mediante el bloqueo de los receptores muscarínicos del estriado (Beker y Joynt, 1990; Góngora *et al.*, 2005). Los antagonistas muscarínicos son fármacos usados como adyuvantes para reducir algunas deficiencias motoras en los estadios iniciales de la EP. El trihexifenidilo, la benzotropina y el biperideno son algunos de los que se usan en la actualidad (Otero-Silicio *et al.*, 1996). Todos estos fármacos bloquean a los receptores colinérgicos muscarínicos, por lo que probablemente actúan corrigiendo el exceso de neurotransmisión colinérgica estriatal originado por la deficiencia dopaminérgica (Góngora *et al.*, 2005). Por sí solos los anticolinérgicos son moderadamente efectivos para aliviar la bradicinesia y la rigidez, pero raras veces son eficaces para corregir la inestabilidad postural. Sin embargo, cuando se usan en combinación con L-DOPA, son bastante efectivos para suprimir el temblor en reposo (Góngora *et al.*, 2005).

Dada su moderada acción antiparkinsoniana, su uso ha quedado relegado para el tratamiento de los síntomas leves de las etapas iniciales de la EP o como coadyuvante de la L-DOPA o los agonistas dopaminérgicos. Las dosis suelen incrementarse gradualmente hasta llegar a la mejoría máxima o probablemente hasta la aparición de efectos secundarios, que incluyen sequedad bucal, retención urinaria, visión borrosa y constipación. De manera notable, el bloqueo de los receptores muscarínicos del sistema nervioso central (SNC) produce confusión mental, amnesia y alteraciones cognoscitivas. A pesar de todo, los fármacos anticolinérgicos siguen siendo muy útiles para los pacientes con síntomas mínimos o que no toleran la L-DOPA por sus efectos adversos (Góngora *et al.*, 2005).

INHIBIDORES DE LA MONOAMINA OXIDASA

La Selegilina (L-deprenilo) es un inhibidor de la enzima mono-amino-oxidasa tipo B (MAO-B), isoenzima que actúa sobre la DA. La enzima oxida el grupo propinil de la selegilina dando lugar a un derivado intermediario que a su vez, inactiva a la MAO-B, de este modo, la selegilina eleva la concentración cerebral de DA sin afectar otras monoaminas. Es utilizada desde hace tiempo como coadyuvante de

la levodopaterapia para reducir los efectos *wearing-off* de aparición temprana, pero es ineficaz en las fluctuaciones *on-off* de las fases avanzadas de la EP. En la actualidad se piensa que el principal efecto de la selegilina es sintomático y no neuroprotector (Martínez *et al.*, 1998; Stocchi y Olanow, 2003).

POTENCIADORES DE LA LIBERACIÓN DE DA

La amantadina es un antiviral (para el virus de la influenza A2) cuyo mecanismo de acción no es totalmente conocido. Se ha demostrado que actúa sobre la liberación de DA. A esto se suma su acción antagonista sobre los receptores glutamatérgicos tipo NMDA (Segura *et al.*, 2003), bloqueando la neurotransmisión glutamatérgica desde el núcleo subtalámico al globo pálido, lo que podría explicar su acción antiparkinsoniana y neuroprotectora. Tiene una eficacia clínica ligera, mejorando de forma transitoria (tolerancia a los dos-tres meses) la acinesia, la rigidez y el temblor, aunque hay pacientes en los que la duración del efecto perdura. Las reacciones adversas más frecuentes, son el edema y la livedo reticularis (enfermedad vascular inflamatoria constituida por úlceras dolorosas) en pies y manos, aunque en caso de acumulación puede provocar confusión, alucinaciones, psicosis y convulsiones (Martínez *et al.*, 1998).

FACTORES NEUROTROFICOS

Los factores tróficos son moléculas, generalmente proteínas, producidas por diferentes tipos celulares, que regulan la biología celular. Los que actúan sobre el sistema nervioso se denominan factores neurotróficos y entre otras funciones regulan la diferenciación y mantenimiento del fenotipo neuronal y la sinaptogénesis. Además, protegen a las neuronas de determinadas situaciones patológicas como la muerte por apoptosis y la acción de diferentes tóxicos. De todos los factores tróficos el GDNF (Factor Neurotróficos Derivado de Células Glíales) parece ejercer una acción trófica más potente sobre las neuronas dopaminérgicas.

En un estudio se investigó los efectos de la infusión continua de GDNF en el putamen en cinco pacientes con EP (un paciente unilateral y cuatro bilateral) seguidos durante un año. Los resultados mostraron que en la escala UPDRS III (*Unified Parkinson Disease Rating Scale*) mejoró un 24% a los tres meses y un 39% al año, también mejoraron significativamente la puntuación media en la subescala II de actividades cotidianas, y en la escala de discinesias. Mientras que en un estudio clínico en donde se reclutaron 40 pacientes con EP avanzada entre los años de 1996 y 1999, se les administró intraventricularmente GDNF mensualmente a diferentes dosis durante un periodo de 6-8 meses, y posteriormente se continuó el estudio en 16 pacientes durante 20 meses. Los resultados fueron negativos, y no se ha documentado mejoría clínica en la escala UPDRS con ninguna de las dosis utilizadas. Los efectos adversos fueron anorexia, náuseas, pérdida de peso, e hiponatremia (bajas concentraciones plasmáticas de sodio) (Mínguez y Escamilla 2005^b)

TERAPIA GÉNICA

Consiste en el tratamiento cerebral directo con vectores que expresen determinados genes de interés terapéutico. Estos vectores pueden ser virales (adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes simple o lentivirus) o no virales (liposomas, ADN desnudo o complejos ADN-proteínas). Mediante la inyección intraestriatal de virus atenuados se ha conseguido una adecuada transferencia génica en modelos animales de EP. Por este medio se ha logrado incrementar la expresión estriatal de TH en ratas hemiparkinsonianas, con mejoría del déficit neuroquímico y motor. Mediante terapia génica *in vivo* también se ha planteado modificar la hiperactividad del núcleo subtalámico (NST), aspecto crucial en la fisiopatología de la EP. En ratas hemiparkinsonianas, la inyección de virus que expresan decarboxilasa del ácido glutámico (GAD) en el NST se acompaña de mejoría motora, supuestamente mediada por el incremento del neurotransmisor inhibitor ácido γ -aminobutírico (GABA). Se ha propuesto un ensayo clínico en el que este tratamiento se podría llevar a cabo en pacientes con avanzada EP candidatos a estimulación cerebral profunda del NST. Una de las

desventajas de esta terapia es que la inyección del vector sólo conseguiría distribuir el gen en una zona muy limitada, con efectos clínicos posiblemente insuficientes. Por otro lado, se precisaría cirugía craneal, y se añadirían los problemas relacionados con la bioseguridad de los vectores virales (Mínguez y Escamilla, 2005^b).

ANTIOXIDANTES

Como se mencionó anteriormente se ha considerado que el estrés oxidativo desempeña un papel significativo en la neurodegeneración que ocurre en la EP, por lo que se han propuesto estrategias terapéuticas basadas en fármacos con propiedades antioxidantes por ejemplo:

VITAMINA E

La vitamina E es una sustancia liposoluble capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, tiene actividad de α -, β -, γ - δ -tocoferol y α -, β -, γ -tocotrienol. Dicha vitamina tiene propiedades antioxidantes, y se ha reportado que su principal función es proteger la integridad de la membrana por inhibición de la peroxidación de lípidos ocasionada por el estrés oxidativo. Se ha estudiado el papel de la vitamina E en la EP tanto en pacientes como en modelos experimentales (Chandan *et al.*, 2004).

Factor y cols. (1990) reportan que pacientes con EP tratados con vitamina E mostraron disminución de los síntomas motores en comparación con los que no recibieron el tratamiento, asimismo, Adler y cols. (1993) realizaron un estudio referente a las disquinesias en pacientes con EP, los cuales fueron tratados con vitamina E (1600 IU/día) durante un periodo de 8-12 días, y observaron una recuperación significativa en comparación con los pacientes que recibieron placebo. En un modelo de EP producido con MPTP, los ratones fueron pre-tratados con altas dosis de vitamina E (2350 mg/kg) 48 horas antes y 72 horas después de la administración de la toxina, resultando en una protección parcial de la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SN, algo similar se observó al

emplear la neurotoxina 6-OHDA (Marc y Jin, 2003).

Sin embargo, existen estudios contradictorios donde se ha reportado que pacientes que fueron tratados con vitamina E, no presentaron ninguna mejoría de los síntomas motores en comparación con los que recibieron tratamiento placebo (Fariss y Zhang, 2003; Chandan *et al.*, 2004).

CO-ENZIMA Q

La Co-enzima Q es un co-factor de la cadena respiratoria (captador de electrones del complejo I y II) que posee propiedades antioxidantes, se ha reportado que esta enzima se encuentra en bajas concentraciones en los pacientes con EP (Agostinho *et al.*, 2003). En una revisión realizada por Cardoso y cols. (2005), mencionan un beneficio significativo sintomático y mayor recuperación en pacientes con EP a los que se les administró 360 mg CoQ10 en comparación con aquellos pacientes que solo recibieron placebo.

Sin embargo, existen estudios contradictorios donde se ha observado que en ratones con depleción dopaminérgica inducida con la toxina MPTP y tratados con CoQ10, presentaron baja protección con respecto a la concentración de DA en el núcleo estriado. En un estudio piloto realizado con pacientes con EP y tratados con CoQ10, no se encontraron cambios significativos en la escala UPDRS en comparación con los pacientes que recibieron placebo (Galpern y Cudkowicz, 2007).

Finalmente, la Melatonina que actualmente no se utiliza en el tratamiento de la EP, pero se ha propuesto ampliamente como estrategia terapéutica debido a las características que a continuación se mencionan.

MELATONINA

A finales de la década de los cincuenta, se aisló y se identificó por primera vez una hormona secretada por la glándula pineal a la que se le dio el nombre de

Melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (Reiter *et al.*, 1997), y se observó que los niveles aumentan en la noche y disminuyen durante el día. La Melatonina actúa como un mensajero químico de transducción de información de fotoperiodos en el cerebro, también como mediador de ritmos reproductivos, circanales, ritmo circadiano, hibernación (Vanecek 1998), sueño-vigilia y temperatura (Reiter *et al.*, 2003; Boutin *et al.*, 2005).

La síntesis de Melatonina ocurre a partir de las moléculas del triptófano en la glándula pineal la cual está compuesta por dos tipos de células: las células neurogliales y los pinealocitos, que predominan en número y que producen dos tipos de sustancias: las indolaminas (entre las que se encuentra la Melatonina) y los péptidos (algunos de ellos, como la arginina).

De forma clásica conocemos que la oscuridad estimula la síntesis y aumenta los niveles de Melatonina, mientras que la luz inhibe este proceso (Campos, 2002).

Cuando una estimulación fótica llega a la retina se produce la activación de las células ganglionares de la retina y se generan impulsos nerviosos, (dichos impulsos son transmitidos en la oscuridad) (Piñol *et al.*, 2006) los cuales proyectan al núcleo supraquiasmático (SCN) del hipotálamo siendo este el encargado de transmitir la información al pinealocito.

Se ha establecido que el estímulo primario para que se produzca el incremento de Melatonina durante la noche, en la mayoría de los mamíferos, es la liberación de norepinefrina (NE) de las terminales de los nervios simpáticos postganglionares que se conectan con la glándula pineal. La NE liberada interactúa con los receptores α y β de la membrana de los pinealocitos produciendo la activación de la adenilato ciclasa (AC), lo que se traduce en el incremento de los niveles de adenosina 3' 5' monofosfato cíclico (AMPC) que promueve la inducción y activación de la síntesis proteica de N-acetil transferasa (NAT), el cual constituye el paso limitante en la síntesis de Melatonina. También se ha descrito que los

pinealocitos poseen receptores para péptido intestinal vasoactivo (PIV), los cuales son similares a los receptores β del pinealocito. El PIV al parecer proviene del ganglio parasimpático pterigopalatino y tiene la capacidad de incrementar la actividad de la NAT por elevación del AMPc. La NAT convierte a la serotonina sintetizada del triptófano a N-acetil serotonina, la cual es subsecuentemente O-metilada por acción de la hidroxiindol-O-metiltransferasa (HIOMT) a N-Acetil-5metoxitriptamina comúnmente conocida como Melatonina (Oviedo y Camejo, 2001).

Debido a que la Melatonina es lipofílica, puede pasar por difusión pasiva de los pinealocitos a los ventrículos y capilares; la Melatonina puede entonces actuar en sus respectivos receptores (Figura 5) (Moller and Baeres 2002).

Hasta el momento se han identificado tres tipos de receptores a Melatonina acoplados a proteínas G, el MT1 (Mel_{1a}) y MT2 (Mel_{1b}) están acoplados a membranas (León, 2004; Weil *et al* 2006), mientras que los receptores MT3 han mostrado que representan una enzima quinona reductasa 2, la cual puede participar en la protección antioxidante a través de la eliminación de quinones prooxidantes (Srinivasan *et al*; 2006)

También se observó que en vertebrados la Melatonina se forma en la retina, la membrana coclear, leucocitos y tracto gastrointestinal (Hardeland *et al.*, 2006).

Los estudios realizados en humanos han podido demostrar que la concentración de Melatonina en sangre varía de forma considerable en función de la edad del individuo. En los adultos jóvenes, se encuentran niveles de Melatonina que varían entre 40 pmol/L durante el día y 260 pmol/L por las noches, observándose que disminuye con la edad (Campos, 2002; Venero *et al.*, 2002).

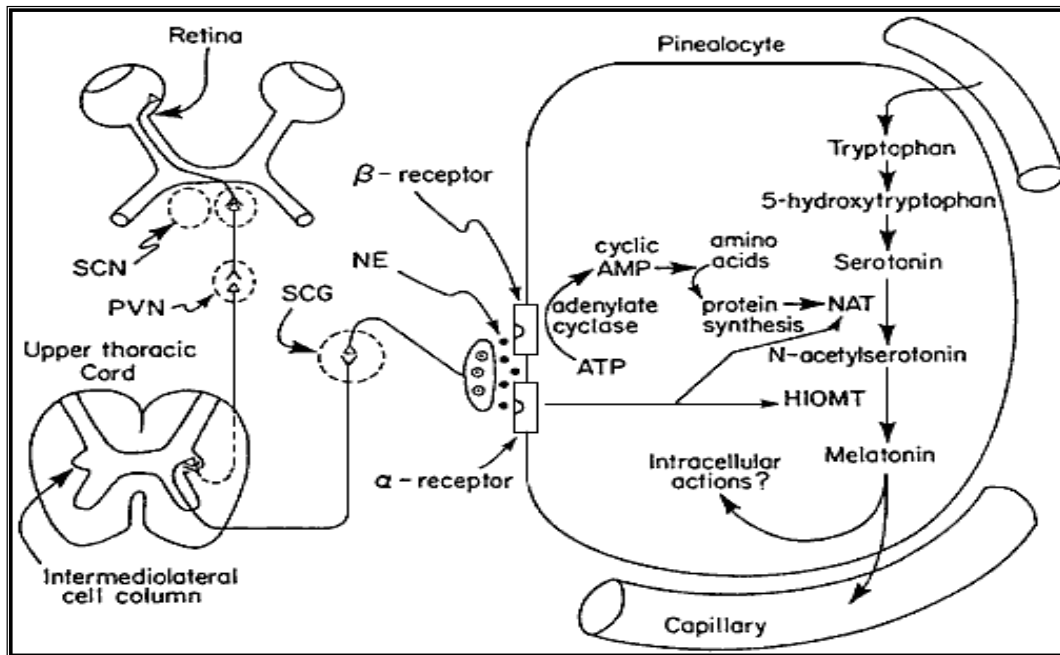


FIGURA 5. Representación esquemática de la síntesis y secreción de la Melatonina en el pinealocito (Modificado de Oviedo y Camejo, 2001).

Ahora bien, la Melatonina es una sustancia que ha sido ampliamente estudiada debido a que se le han atribuido importantes propiedades antioxidantes (Reiter *et al.*, 2003; Piñol *et al.*, 2006), inclusive se ha reportado que la Melatonina es un potente antioxidante dos veces más eficiente que la vitamina E y cuatro veces más que el GSH y el ácido ascórbico (Kundurovic y Sofic 2006).

Como se mencionó la Melatonina exógena puede difundir libremente a través de las membranas. (Vanecek 1998; Bondy, *et al.*, 2004), de tal manera que fácilmente puede cruzar la BHE (Singh *et al.*, 2006) y proteger a las células contra un amplio espectro de lesiones, por ejemplo:

Se ha observado que la Melatonina exógena reduce el daño neuronal en modelos de Alzheimer (EA). Los primeros reportes aparecen en 1998 cuando Brusco y cols. (1998) administraron 6mg/día de Melatonina a unos pacientes con EA durante un periodo de 36 meses; el tratamiento con Melatonina retrasó significativamente la progresión de la enfermedad, asimismo observaron mediante imágenes de resonancia magnética nuclear que reduce el grado de atrofia cerebral.

A niños recién nacidos con asfixia perinatal se les administró 80mg de Melatonina por vía oral, 6 hrs después, los niveles de peroxidación de lípidos, de nitritos y nitratos disminuyeron significativamente (Reiter *et al.*, 2003).

La Melatonina protege células, tejidos y órganos de daño oxidativo, ya que neutraliza el H_2O_2 , ON^\bullet , O_2^- y NOO^- (Reiter, 2000^a ; Reiter *et al.*, 2000^b), más aún, puede inducir genes que codifican para enzimas antioxidantes (Bondy y Sharman, 2007), decremента los niveles de peroxidación de lípidos (Harms *et al.*, 2000; Khaldy *et al.*, 2003), tiene efectos oncostáticos y estimula el sistema inmune (Reiter *et al.*, 2003; Boutin *et al.*, 2005).

Recientemente se han realizado diversos estudios *in vivo* (por vía subcutánea) e *in vitro* para probar el efecto de la Melatonina sobre la influencia de la homeostasis mitocondrial, y se ha encontrado que la Melatonina incrementa la actividad del complejo I y IV de la cadena respiratoria. Por lo que se ha sugerido que dicha acción puede contribuir al efecto protector en enfermedades como la EP, Alzheimer, epilepsia, e isquemia las cuales involucran disfunción mitocondrial (Dabbeni *et al.*, 2001; León *et al.*, 2004). Se ha reportado además, que en homogenados de cerebros de rata, la Melatonina previene el nivel de peroxidación de lípidos inducido por ON^\bullet (Piñol *et al.*, 2006).

Nam y cols. (2005) reportaron que en un modelo de enfermedad de Huntington producido por la toxina 3-NP, (ácido 3-Nitropropionico) la cual produce lesión de las neuronas estriatales mediante mecanismos secundarios excitotóxicos

mediados por estrés oxidativo, los animales que recibieron tratamiento intraperitoneal con Melatonina, presentaron menores niveles de peroxidación de lípidos, en comparación con los que no recibieron el tratamiento. Además esta neurotoxina induce decremento en los niveles de DA, dicho decremento fue atenuado por el tratamiento con la Melatonina. Finalmente los autores sugieren que el tratamiento con Melatonina no solo reduce la muerte neuronal estriatal, sino también la pérdida de terminales dopaminérgicas que proyectan al estriado, por lo que sugieren que la Melatonina podría ser utilizada en enfermedades neurodegenerativas.

También se ha estudiado el efecto de la administración crónica de Melatonina en modelos transgénicos de la EA, donde se ha reportado ampliamente que el estrés oxidativo juega un papel muy importante; el tratamiento con Melatonina disminuye los niveles de peroxidación de lípidos, los niveles de glutatión son restablecidos, se incrementa la actividad de la SOD mientras que los niveles de Bax y caspasa 3 son reducidos, de tal forma que se inhibe la cascada de eventos que conllevan a la muerte neuronal por apoptosis. Estos resultados soportan la evidencia del efecto neuroprotector de la Melatonina y su posible uso terapéutico (Feng *et al.*, 2006).

En estudios *in vitro* se ha observado que la melatonina protege a las neuronas dopaminérgicas de daño inducido con la toxina MPTP (Iacovitti *et al.*, 1997). En estudios más recientes se ha reportado que en animales depletados DA con 6-OHDA y tratados con Melatonina, se protege la mitocondria contra el estrés oxidativo producido por la neurotoxina, por incremento de la expresión génica de las enzimas antioxidantes (Mayo *et al.*, 2002), más aún, el tratamiento con Melatonina restaura los niveles de DA, así como sus metabolitos DOPAC y HVA (ácido homovalínico) (Aguiar *et al.*, 2002).

Se ha sugerido que el tratamiento con Melatonina juega un papel muy importante sobre el sistema dopaminérgico (Hamdi, 1998; Willis, 2005), proponiendo que la Melatonina puede actuar como un neuromodulador en el sistema nigroestriatal, ya que se ha reportado que el tratamiento crónico con Melatonina induce incremento de los niveles de RNAm de la TH en la SN y el área ventral tegmental (León *et al.*, 2005). Más aún, produce recuperación significativa del déficit motor inducido por la lesión de 6-OHDA (Dabbeni *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2006).

Un extenso y variado número de trabajos realizados tanto en personas adultas como en niños han demostrado que la Melatonina tiene muy baja toxicidad (Campos, 2002). En estudios recientes, realizados bajo la supervisión de la U.S. National Toxicology Program, se encontraron escasos indicios de toxicidad en aquellas ratas tratadas durante toda la gestación con dosis muy elevadas de Melatonina (entre 10 y 200 mg/kg/día). En este grupo se estudió la mortalidad prenatal, el peso corporal fetal y la incidencia de malformaciones fetales, y se observó que la Melatonina no presenta toxicidad significativa en ninguna de las variables analizadas (Acuña *et al.*, 2006).

Es importante señalar que en los reportes previamente mencionados, la vía de administración de la Melatonina fue subcutánea e intraperitoneal, y que existen muy pocos estudios en donde se ha utilizado la vía de administración oral.

Ahora bien, en nuestro laboratorio hemos encontrado que, después de la lesión unilateral con 6-OHDA en ratas, el estriado de los animales presenta importantes alteraciones ultraestructurales (Avila-Costa *et al.*, 2005^a); así como pérdida significativa de neuronas dopaminérgicas en la SN, después del tratamiento con algunos fármacos como la L-DOPA encontramos que no solo no se revierten dichas alteraciones, sino que empeoran, concluyendo que posiblemente la L-DOPA está provocando mayor producción de radicales libres (Gutiérrez, 2004). Después del tratamiento con un agonista dopaminérgico que tiene propiedades antioxidantes, encontramos que dichas alteraciones disminuyen, llegando, en

algunos parámetros, a presentar características similares a los estriados de los animales control (Ordóñez, 2004; Avila-Costa et al 2005^b).

JUSTIFICACIÓN

Debido a que la Melatonina muestra propiedades antioxidantes muy importantes, y ya que una de las teorías más aceptadas acerca de la etiología de la EP es la del estrés oxidativo, consideramos relevante probar si al administrar por vía oral este fármaco se pueden prevenir las alteraciones citológicas y conductuales reportadas anteriormente en nuestro laboratorio, y comparar su efecto con la administración de L-DOPA, debido a que es el fármaco de elección en la EP, pero que se sabe que tiene efectos colaterales adversos después de su administración por períodos prolongados, entre los cuales se encuentra la generación de radicales libres.

HIPÓTESIS

Debido a que la Melatonina posee grandes propiedades antioxidantes, es probable que el tratamiento ejerza un efecto neuroprotector después de la lesión con 6-OHDA.

OBJETIVO GENERAL

Comparar el efecto de la administración crónica de L-DOPA y Melatonina en rata lesionada unilateralmente con 6-OHDA.

OBJETIVOS PARTICULARES

Comparar el efecto de la administración crónica de la L-DOPA y la Melatonina sobre:

- La conducta motora fina mediante la prueba de la viga de equilibrio.
- El número de neuronas inmunorreactivas a TH en la *sustancia nigra compacta*.
- Las alteraciones ultraestructurales del estriado.
- Los niveles de peroxidación de lípidos

METODOLOGÍA

Los experimentos se llevaron a cabo con 24 ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de entre 180-200 g al inicio del experimento, y que fueron mantenidos en un ciclo luz-oscuridad de 12:12 con libre acceso agua y alimento.

Para evaluar la conducta motora se utilizó un aparato de madera con dos pedestales, a los cuales va unida una viga de madera de 2m de largo con una inclinación de 15°. Se utilizaron vigas de diferentes anchos: 3,6,12,18,24mm por donde los animales debían caminar hasta alcanzar su caja hogar desde la parte más baja del aparato (Figura 6). Se registró con un cronómetro el tiempo en que los animales tardaban en atravesar cada viga (tiempo total) las cuales fueron colocadas en orden aleatorio. Se esperaba como tiempo máximo 120 segundos, y si el animal no cruzaba en el tiempo estipulado se daba por terminada esta actividad asignando el valor de 120 segundos a su evaluación. Todos los animales fueron entrenados en la viga de 24mm durante los 5 días previos a la lesión, un día antes de la operación se realizó una evaluación control.



FIGURA 6. Prueba de la viga de equilibrio

Posteriormente las ratas se lesionaron quirúrgicamente de la siguiente manera: Los animales fueron anestesiados con una dosis de 35mg/kg de peso de pentobarbital sódico por vía intraperitoneal (i.p), posteriormente fueron fijadas en un aparato estereotáxico. El primer grupo consistió de 18 ratas las cuales

fueron lesionadas unilateralmente (lado izquierdo) en el haz medial del cerebro anterior (las coordenadas estereotáxicas empleadas fueron AP= -2.8mm; L= 1.9mm; V= 8.6mm a partir de bregma de acuerdo con Paxinos y Watson 1986) con 4 μ l de solución salina que contenía 8 μ l de 6-OHDA y 0.2 mg de ácido ascórbico. El segundo grupo se formó con 6 ratas (grupo control) que fueron lesionadas en el mismo sitio con 4 μ l de solución vehículo (salina-ácido ascórbico); 48hrs. después de la lesión se evaluó la conducta de giro con apomorfina a una dosis de 0.25 mg/Kg. Con el propósito de garantizar una pérdida dopaminérgica del 90% (Ungerstedt 1970) se utilizaron sólo aquellos animales lesionados con 6-OHDA que mostraron más de 200 giros en un periodo de 30 minutos. A las 48 horas después de esta evaluación, 6 ratas lesionadas fueron tratadas por vía oral con 15 mg/Kg de levodopa/carbidopa comercial (sinemet) y otro grupo de animales fue tratado con 10 mg/Kg de Melatonina (n=6) por vía oral, durante 30 días. 6 ratas lesionadas con 6-OHDA no recibieron tratamiento y las ratas del grupo control (n=6) se mantuvieron por el mismo tiempo. La evaluación en la viga de equilibrio se llevó a cabo a los 7, 14, 21 y 28 días después de la lesión.

Al término del tratamiento se sacrificó a los animales mediante perfusión intracardiaca y se extrajeron los cerebros. Posteriormente se obtuvieron rebanadas de el mesencéfalo para realizar la técnica de Inmunocitoquímica para TH (Ver apéndice1) y se determinó el número de neuronas dopaminérgicas en la SNc en un área de 1500 μ m en 7 cortes por animal, incluyendo tanto el lado ipsi como el contralateral a la lesión (Figura 7).

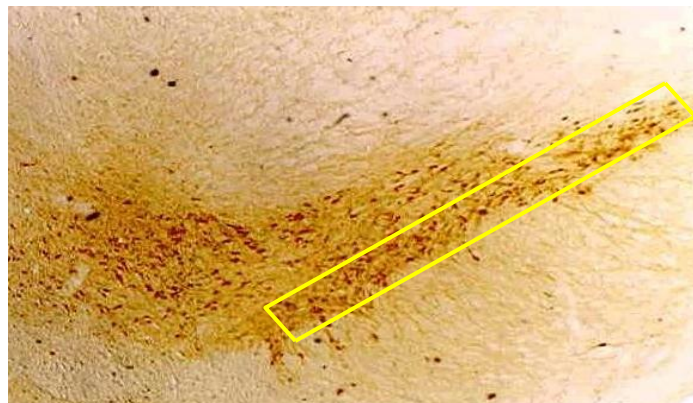


FIGURA 7. Conteo de neuronas inmunorreactivas a TH en un área de 1500 μ m²

Se tomaron fragmentos del estriado ipsi y contralateral a la lesión para el procesar con la técnica para microscopía electrónica de transmisión.

El análisis consistió:

- En la medición de 50 botones presinápticos (eje mayor y eje menor).
- Estructura postsináptica (espina o dendrita).
- Número de sinapsis perforadas (ver apéndice 2).

Posteriormente con el propósito de medir los niveles de peroxidación de lípidos, se realizó un segundo experimento, donde los animales se lesionaron de la misma manera y fueron mantenidos durante el mismo tiempo (30 días). Los grupos fueron divididos como se describe en la tabla 1.

GRUPO	INYECCION EN EL HAZ MEDIAL	TRATAMIENTO
Grupo I	Salina-ácido ascórbico	----- 15mg/kg L-DOPA
Grupo II	Salina-ácido ascórbico	
Grupo III	Salina-ácido ascórbico	10mg/kg Melatonina
Grupo IV	6-OHDA	-----
Grupo V	6-OHDA	15mg/kg L-DOPA
Grupo VI	6-OHDA	10mg/kg Melatonina

Tabla 1: Protocolo del tratamiento

Al término del tratamiento los animales se sacrificaron, se extrajeron los cerebros por decapitación, y se obtuvo el estriado ipsi y contralateral, así como la SNc ipsi y contralateral para la determinación de peroxidación de lípidos por fluorometría (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2000) (ver apéndice 3).

RESULTADOS

CONDUCTA MOTORA

Como se puede observar en la gráfica 1, en la evaluación control los animales tardaron poco tiempo en recorrer la viga. A diferencia del grupo con 6-OHDA, donde los animales presentaron un comportamiento muy similar en todas las vigas de diferentes grosores, observándose que tardaron más tiempo en recorrerlas, haciéndose más evidente a más tiempo post lesión. Asimismo, los animales lesionados con 6-OHDA y sin tratamiento presentaron ciertas características motoras como: el quedarse estáticos inicialmente, agarrando la viga firmemente antes de moverse a través ella, las ratas se dedicaban principalmente a explorar mientras recorrían la viga, el caminar de las ratas era muy lento en comparación con la evaluación control y varios animales no pudieron recorrer la viga en el plazo establecido.

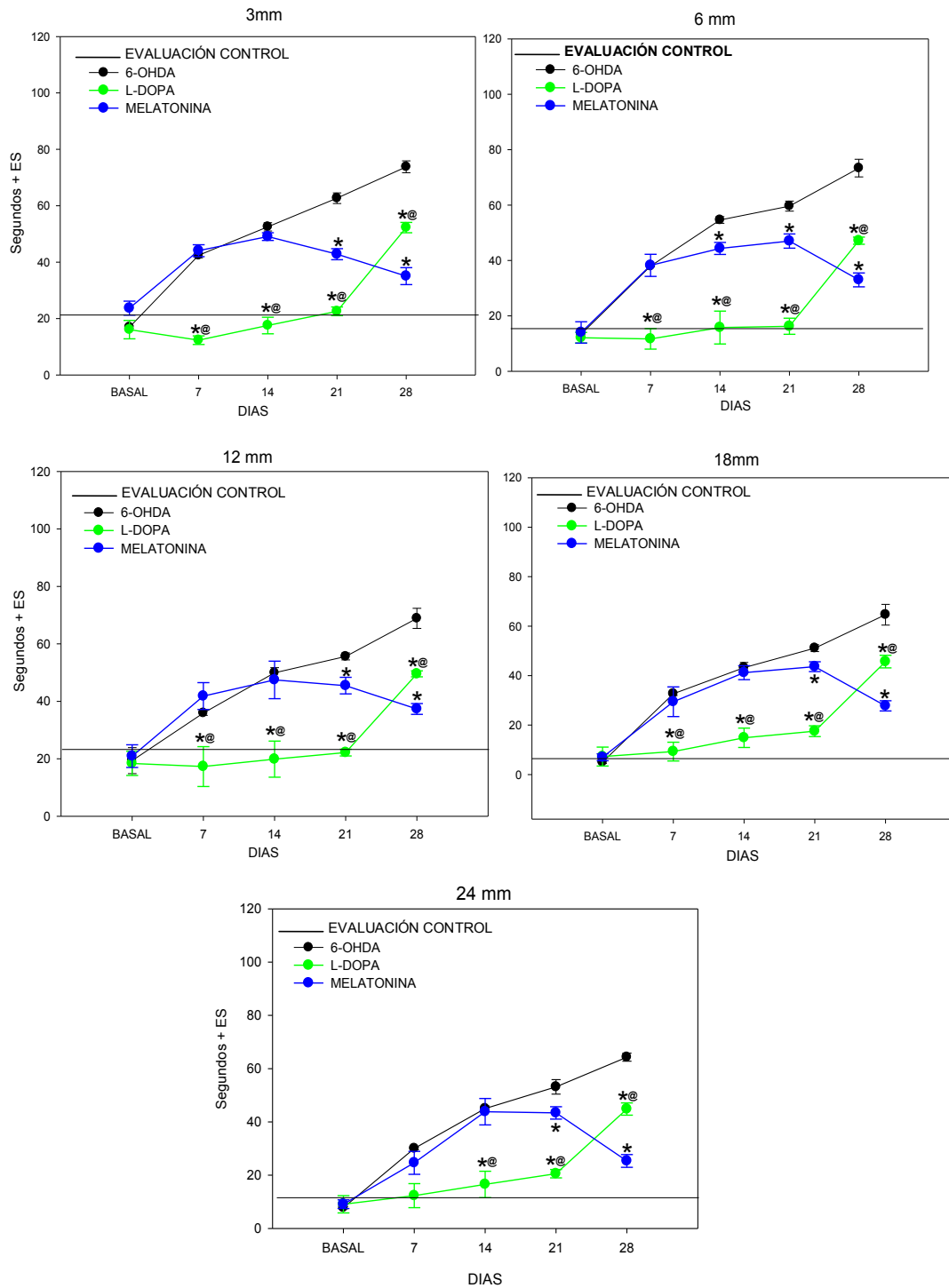
Por otro lado, el grupo lesionado y tratado con L-DOPA (6-OHDA+L-DOPA) en los primeros días de iniciado el tratamiento presentó recuperación de la conducta motora hasta los 21 días, ya que tardaron menos tiempo en recorrer las vigas en comparación con el grupo de 6-OHDA, pero a partir de los 28 días de tratamiento tardaron más tiempo en comparación con el grupo tratado con Melatonina.

El grupo tratado con 6-OHDA+Melatonina a los 7 y 14 días de evaluación presentaron valores muy similares al grupo de 6-OHDA sin tratamiento, pero hacia los 21 días de evaluación este grupo presentó menos tiempo en el recorrido de las diferentes vigas, indicando recuperación de la coordinación motora en comparación con el grupo de 6-OHDA y a los 28 días de tratamiento con Melatonina la recuperación motora se hizo más evidente. Es importante hacer hincapié en que en los 28 días de tratamiento, cuando el grupo con 6-OHDA+Melatonina presentó mayor recuperación de la conducta motora, los animales con 6-OHDA+L-DOPA empezaron a incrementar el tiempo de recorrido en la viga existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (gráfica 1).

CÉLULAS INMUNORREACTIVAS A TH

Respecto a el número de neuronas inmunorreactivas a TH en la SNc, el grupo control mantuvo un número similar de neuronas tanto en el lado contralateral ($\xi = 93 \pm 1.7$) como en el ipsilateral a la lesión ($\xi = 94 \pm 1.9$), a diferencia del grupo lesionado con 6-OHDA ($\xi = 73 \pm 1.9$ y 5 ± 1.6 lado contralateral e ipsilateral respectivamente) y los animales tratados con 6-OHDA+L-DOPA ($\xi = 59 \pm 1.0$ y 6 ± 2.0 lado contralateral e ipsilateral respectivamente) quienes presentaron una drástica disminución en el número de células en ambos lados de la SNc, siendo más evidente en el lado ipsilateral, observándose diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control. Cabe mencionar que los animales tratados con L-DOPA presentaron menor número de células con respecto al grupo 6-OHDA, sin embargo no existieron diferencias significativas entre ambos grupos. El grupo de 6-OHDA+Melatonina presentó mayor número de células tanto en el lado contralateral ($\xi = 77 \pm 0.48$) como en el ipsilateral ($\xi = 10.2 \pm 0.218$) a la lesión, siendo las diferencias estadísticamente significativas con respecto a los grupos con 6-OHDA y con 6-OHDA+L-DOPA, sin embargo, al ser la lesión tan extensa también se observaron diferencias significativas con respecto al grupo control (Gráfica 2 y Figura 8).

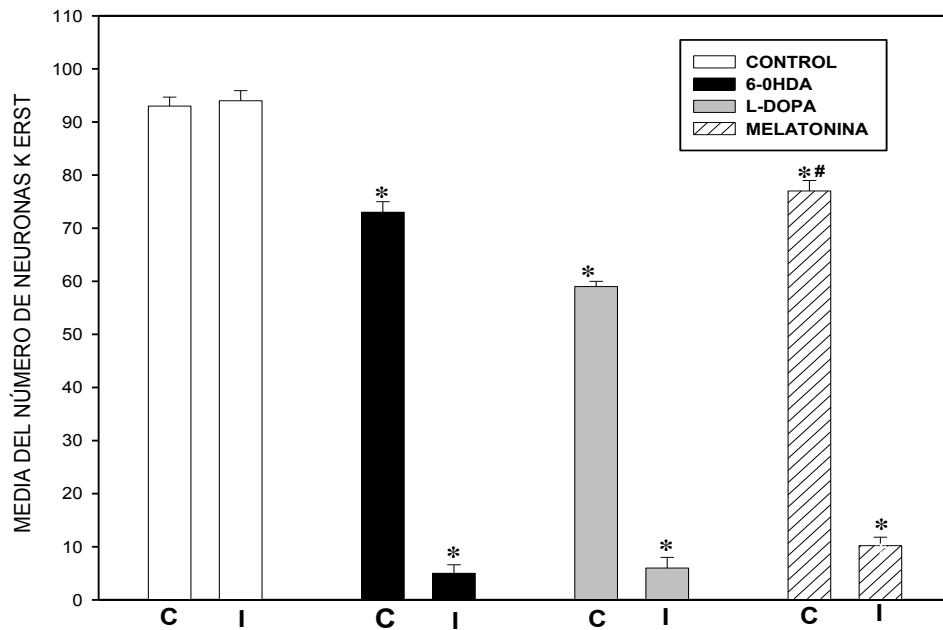
VIGA DE EQUILIBRIO



GRAFICA 1. En esta gráfica se muestra la media del tiempo total en que los animales tardaron en recorrer la viga de equilibrio en los tres grupos analizados.

En donde * = $P < 0.005$ v/s grupo 6-OHDA
 @ = $P < 0.005$ L-DOPA v/s grupo Melatonina

NÚMERO DE NEURONAS INMUNORREACTIVAS A TIROSINA HIDROXILASA



GRAFICA 2. En esta gráfica se muestra la media del número total de neuronas inmunorreactivas a TH de la SN ipsi (I) y contralateral (C) a la lesión de los cuatro grupos analizados. En donde * = P + 0.001 entre los tratamientos y el control.
= P + 0.001 entre 6-OHDA y L-DOPA vs Melatonina

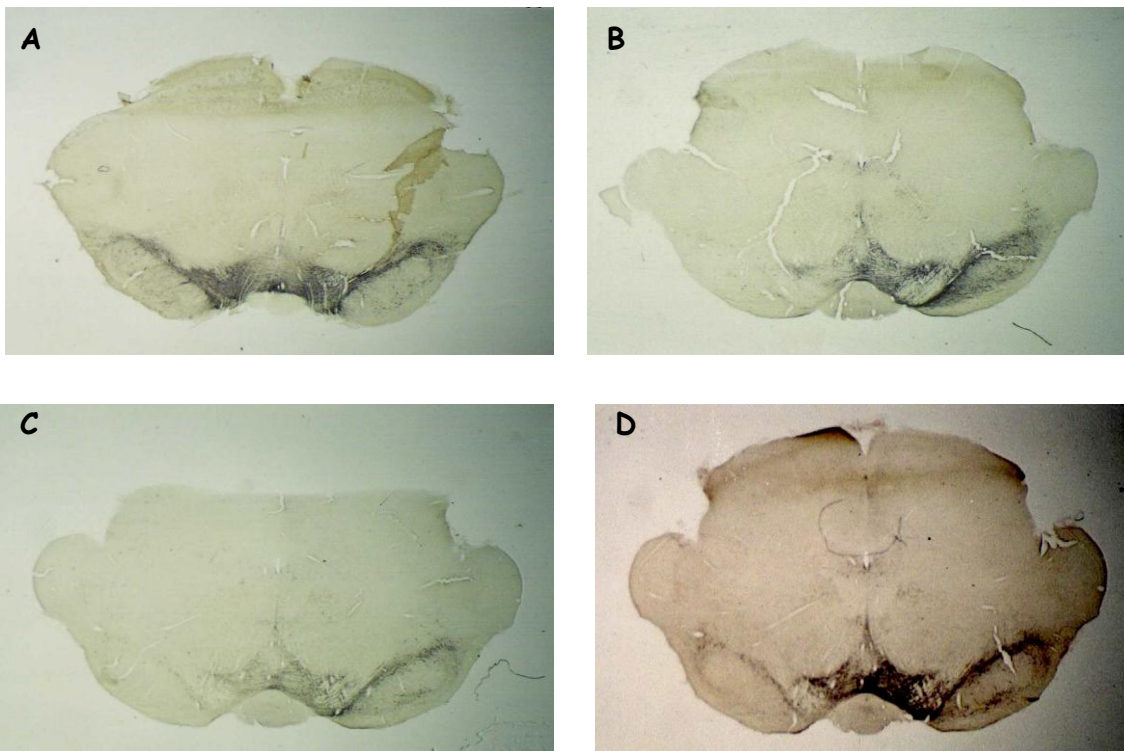


FIGURA 8 Micrografías de neuronas inmunorreactivas a TH en la SNc del lado contralateral e ipsilateral a la lesión, grupo control (A), grupo lesionado con 6-hidroxidopamina (B), grupo lesionado con 6-OHDA + L-DOPA (C) y grupo 6-OHDA+Melatonina (D).

DIÁMETRO DE LOS BOTONES SINÁPTICOS

Como se observa en la gráfica 3, los botones sinápticos de las ratas del grupo control presentaron una media de 474.9 ± 9.6 nm para el eje menor y para el eje mayor presentaron una media de 696.8 ± 9.4 nm en el lado contralateral; y en el lado ipsilateral para el eje menor 477.0 ± 9.6 nm, y para el eje mayor de 700 ± 9.6 nm

El grupo lesionado con 6-OHDA presentó aumento en el tamaño de los botones sinápticos ($\xi = 980.3 \pm 16.13$ nm y 1379.7 ± 18 nm para el eje menor y eje mayor respectivamente del lado ipsilateral), este mismo comportamiento se apreció en el grupo tratado con 6-OHDA+L-DOPA ($\xi = 966.0 \pm 12.10$ nm y 1340.0 ± 13.20 nm para el eje menor y eje mayor respectivamente del lado ipsilateral) por lo que se observaron en ambos grupos diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control. El grupo tratado con 6-OHDA+Melatonina mostró menor número de botones presinápticos con edema ($\xi = 778.7 \pm 11.00$ nm y 1115.30 ± 11.00 nm para el eje menor y eje mayor del lado ipsilateral respectivamente), observándose diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo tratado con 6-OHDA+L-DOPA y el grupo lesionado sin tratamiento. El lado contralateral (lado no lesionado) de todos los grupos experimentales (6-OHDA, 6-OHDA+L-DOPA y 6-OHDA+Melatonina) no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control (Gráfica 3 y Figura 9A y B)

ESTRUCTURA POSTSINÁPTICA

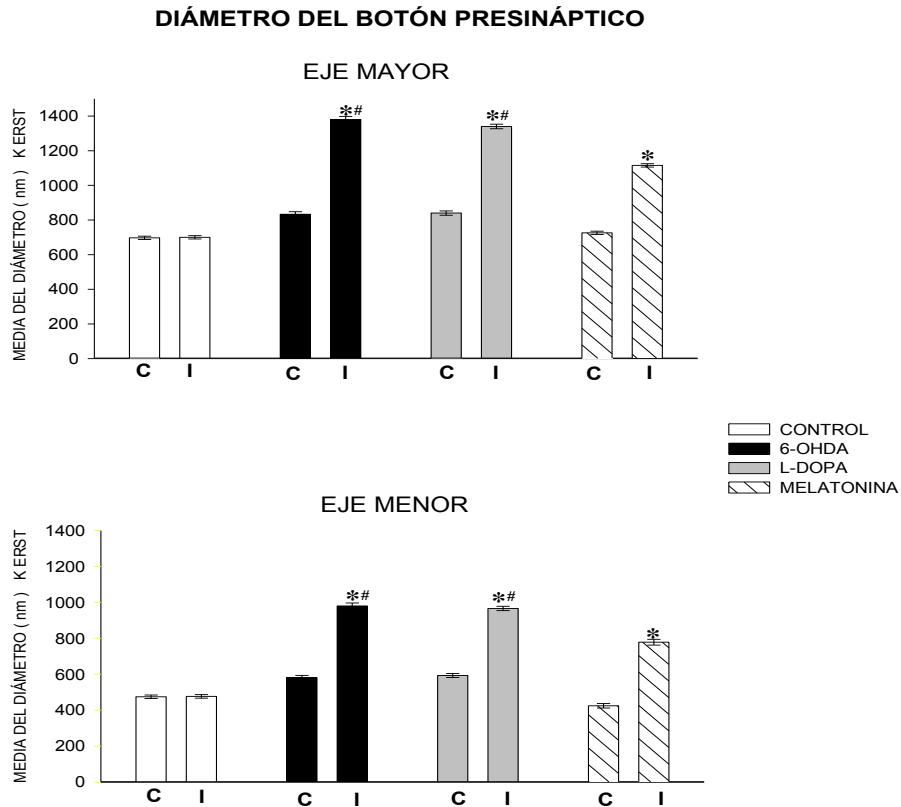
Al analizar la estructura postsináptica (espinas o dendrita) con la cual se establecía el contacto sináptico, observamos que en el grupo control prevalecían los contactos sinápticos con espinas dendríticas, encontrándose una media de 28 ± 1.0 para el lado contralateral y 27 ± 1.9 en el lado ipsilateral, a diferencia del grupo con 6-OHDA ($\xi = 20 \pm 1.6$) y el grupo tratado con 6-OHDA+L-DOPA ($\xi = 21 \pm 1.8$), en donde se presentó disminución de contactos con espinas dendríticas solo en el lado ipsilateral, percibiéndose diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control y al grupo tratado con Melatonina. El grupo de 6-OHDA+Melatonina ($\xi = 27 \pm 1.7$) no presentó

diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control, es decir, presentó mayor número de contactos con espina que con dendrita. Por otro lado, con respecto al estriado contralateral, ninguno de los grupos experimentales presentó diferencias estadísticamente significativas en el número de contactos con espina dendrítica comparados con el grupo control (Gráfica 4 y Figura 9 y 10).

SINAPSIS PERFORADAS

Otro de los parámetros evaluados en este estudio fue el número de sinapsis perforadas, las cuales se caracterizaron por la invaginación de la membrana del botón postsináptico, es decir que el botón presináptico presenta una ruptura o interrupción en la densidad sináptica (Geinisman *et al.*, 1987), y la densidad presináptica generalmente se encuentra cercana al aparato espinoso de la espina dendrítica (Calverley and Jones *et al.*, 1987).

En la gráfica 5 se representa el número de contactos perforados encontrados en los diferentes grupos, donde el grupo control presentó una media de 5 ± 1.7 del lado contralateral y de 4 ± 1.9 en el lado ipsilateral a la lesión, en contraste todos los grupos experimentales presentaron un aumento en el número de contactos perforados en ambos estriados, haciéndose más evidente en el lado ipsilateral y observándose diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control (Figura 9B).



GRAFICA 3. En esta gráfica se muestra la media del tamaño de los botones sinápticos, tanto del eje mayor como del eje menor de los caudados ipsi (I) y contralateral (C) a la lesión de los cuatro grupos analizados. En donde * = $P + 0.005$ vs el grupo control
= $P + 0.005$ vs el grupo de melatonina

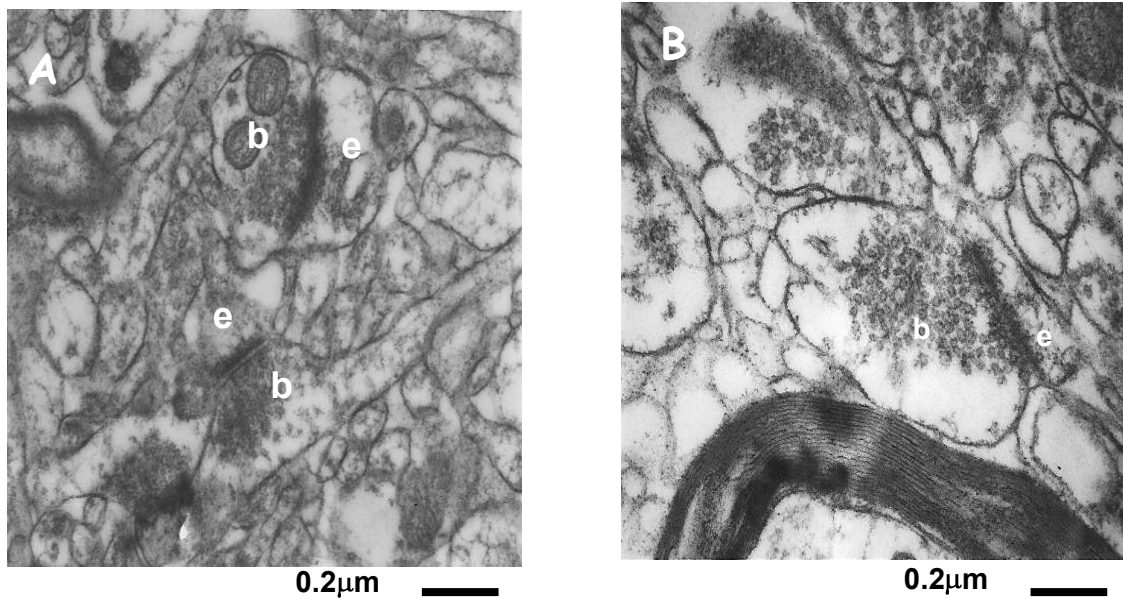
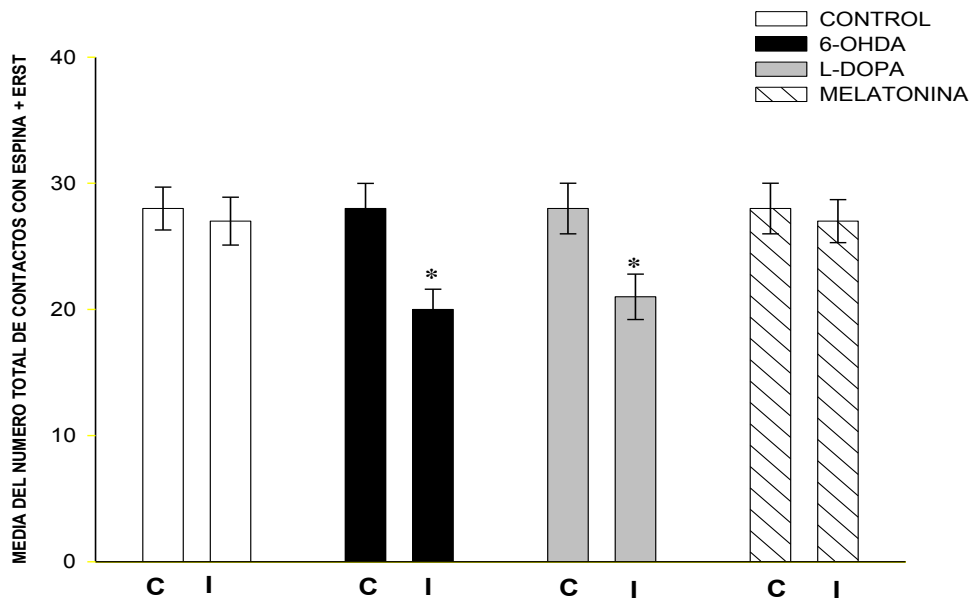


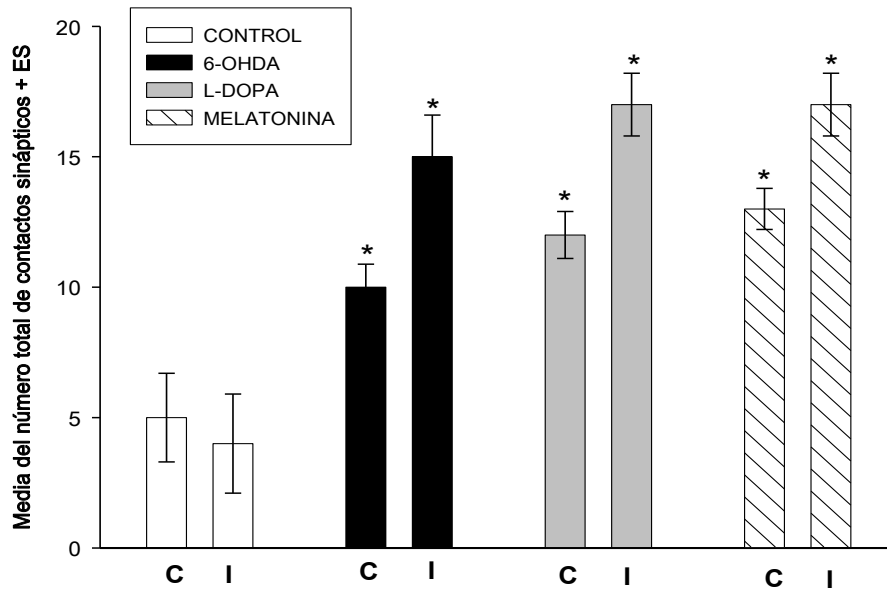
FIGURA 9. A Microfotografía del estriado de un animal del grupo control en donde se observa: el neuropilo bien conservado; dos botones presinápticos (b) estableciendo contacto con espinas dendríticas (e). En **B** se muestra un boton sináptico (b) con edema estableciendo contacto con una espina dendrítica (e), el neuropilo se encuentra muy vacuolado. Estas características prevalecieron en el grupo lesionado con 6-OHDA del lado ipsilateral, y el grupo lesionado con 6-OHDA + L-DOPA.

CONTACTOS CON ESPINA DENDRITICA



GRAFICA 4. En esta gráfica se muestra la media del número total de botones sinápticos que establecieron contacto con espina dendrítica de los caudados ipsi (I) y contralateral (C) a la lesión de los cuatro grupos analizados. En donde * = $P < 0.005$ vs el grupo control y el tratado con melatonina

NUMERO DE SINAPSIS PERFORADAS



GRAFICA 5. En esta gráfica se muestra la media del número total de botones sinápticos que establecieron contactos perforados en los estriados ipsi (I) y contralateral (C) a la lesión de los cuatro grupos analizados. En donde * = $P < 0.001$ vs el grupo control

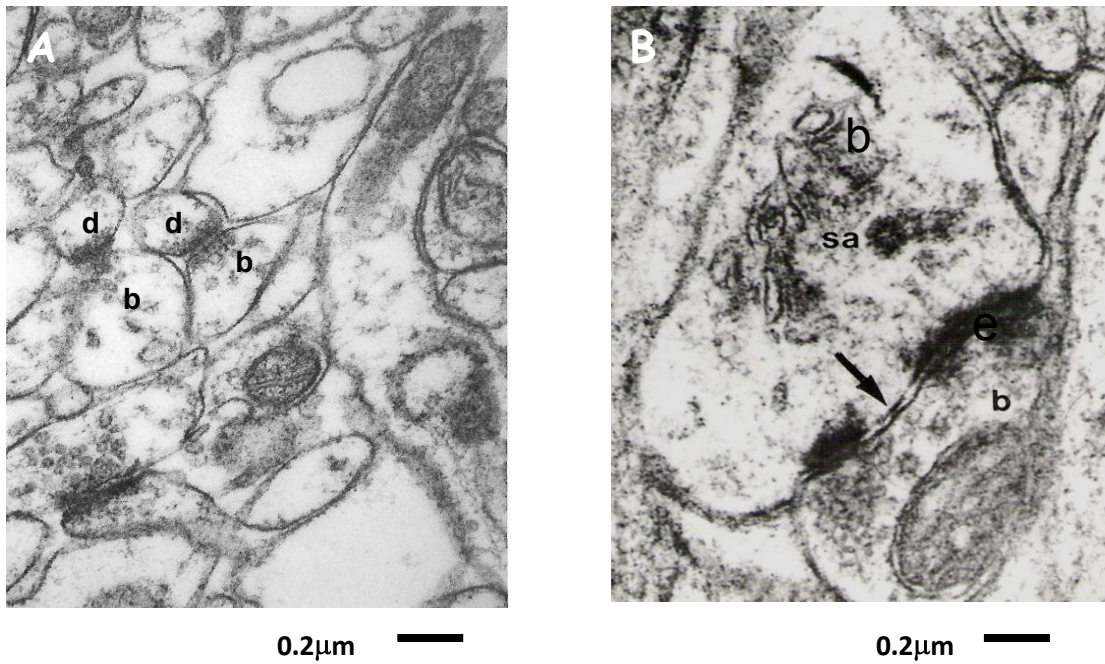


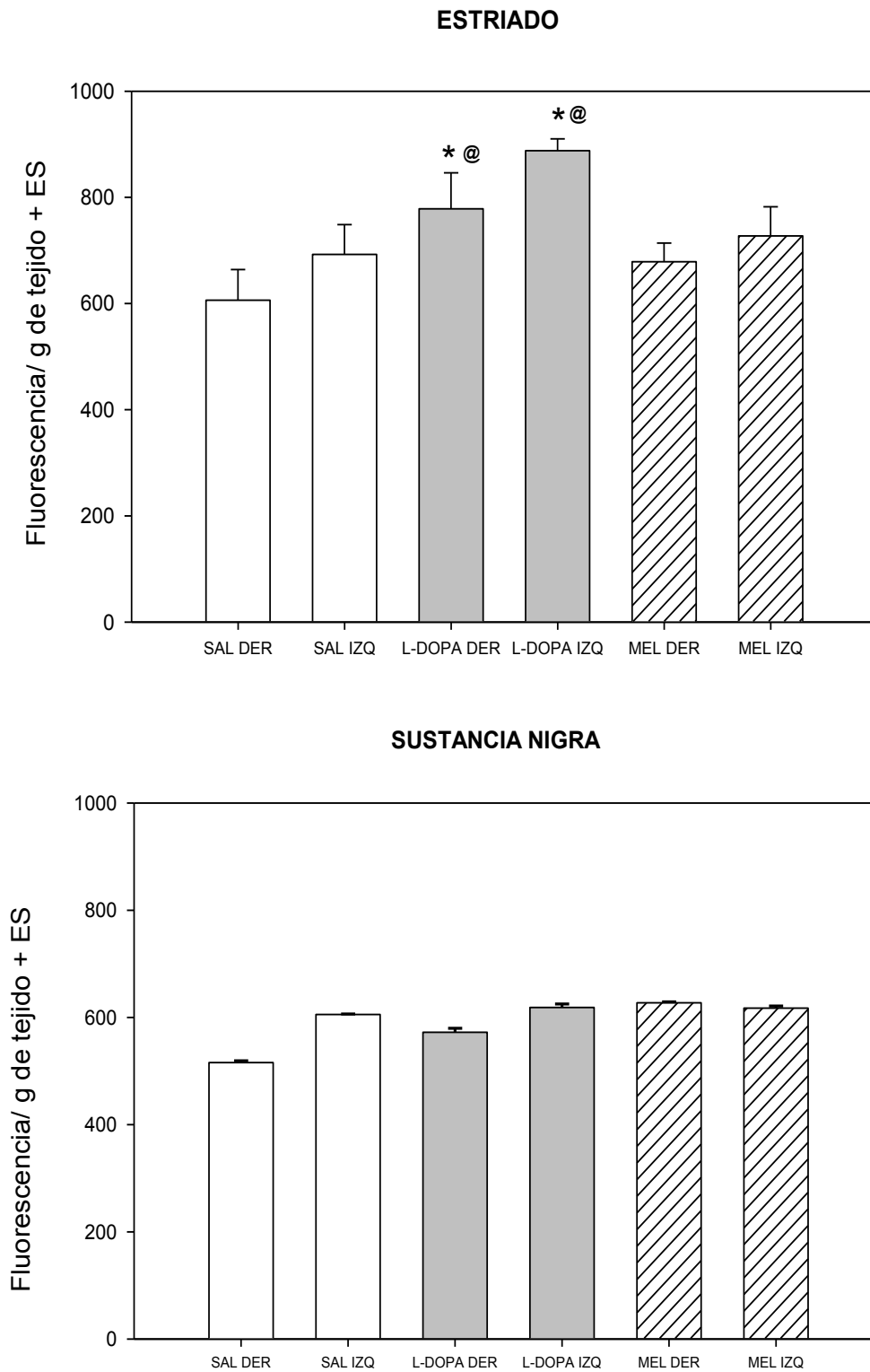
FIGURA 10 Micrografías del tejido estriado donde se observa: **A.-** Botón presináptico (**b**) estableciendo contacto con una dendrita (**d**), y este tipo de contacto fueron los que prevalecieron en el grupo con 6-OHDA y 6-OHDA+L-DOPA. En **B.-** se observa un botón presináptico (**b**) estableciendo contacto perforado (\rightarrow) con una espina dendrítica en donde es muy evidente el aparato espinoso (**sa**). Este tipo de contactos perforados fueron característicos de del grupo con 6-OHDA, 6-OHDA+L-DOPA y 6-OHDA+Melatonina

PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS.

Con respecto a la peroxidación de lípidos en el núcleo estriado, en los grupos lesionados con solución vehículo+tratamiento, encontramos que el grupo salina presentó una media de 606.22 ± 57.84 de fluorescencia/g de tejido del lado contralateral y 692.60 ± 56.16 de fluorescencia/g del lado ipsilateral, el grupo salina+Melatonina mostró una media de 678.80 ± 35.20 de fluorescencia/g del lado contralateral y 727.23 ± 55.08 de fluorescencia/g del lado ipsilateral, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos, a diferencia del grupo salina+L-DOPA ya que presentó altos niveles de peroxidación, mostrando una media de 778.32 ± 67.88 de fluorescencia/g del lado contralateral y 887.87 ± 22.40 de fluorescencia/g del lado ipsilateral. En la SN, observamos que entre los grupos de salina, salina+L-DOPA y salina+Melatonina no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Gráfica 6).

En los grupos lesionados con 6-OHDA+tratamientos, en el núcleo estriado ipsilateral observamos que el grupo de 6-OHDA ($\xi = 765.07 \pm 37.73$ de fluorescencia/g), 6-OHDA+L-DOPA ($\xi = 891.90 \pm 71.69$ de fluorescencia/g) y 6-OHDA+Melatonina ($\xi = 635.01 \pm 35.40$ de fluorescencia/g) presentaron altos niveles de lípidos peroxidados en comparación con el grupo control, pero es importante destacar que el grupo de 6-OHDA+Melatonina mostró valores significativamente menores en comparación con el grupo de 6-OHDA y 6-OHDA+L-DOPA; en el estriado contralateral, el grupo de 6-OHDA ($\xi = 525.83 \pm 49.66$ de fluorescencia/g) y el grupo de 6-OHDA+Melatonina ($\xi = 539.71 \pm 30.24$ de fluorescencia/g) no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control, a diferencia del grupo con 6-OHDA+L-DOPA quien presentó altos niveles de peroxidación ($\xi = 676.42 \pm 41.18$ de fluorescencia/g) en comparación con el grupo control y el grupo tratado con Melatonina. En la SN de los grupos lesionados con 6-OHDA+tratamientos, encontramos altos niveles de peroxidación, tanto en el lado ipsilateral como contralateral, siendo más evidente en el lado ipsilateral del grupo de 6-OHDA y 6-OHDA+L-DOPA, en comparación con el grupo de 6-OHDA+Melatonina (Gráfica 7).

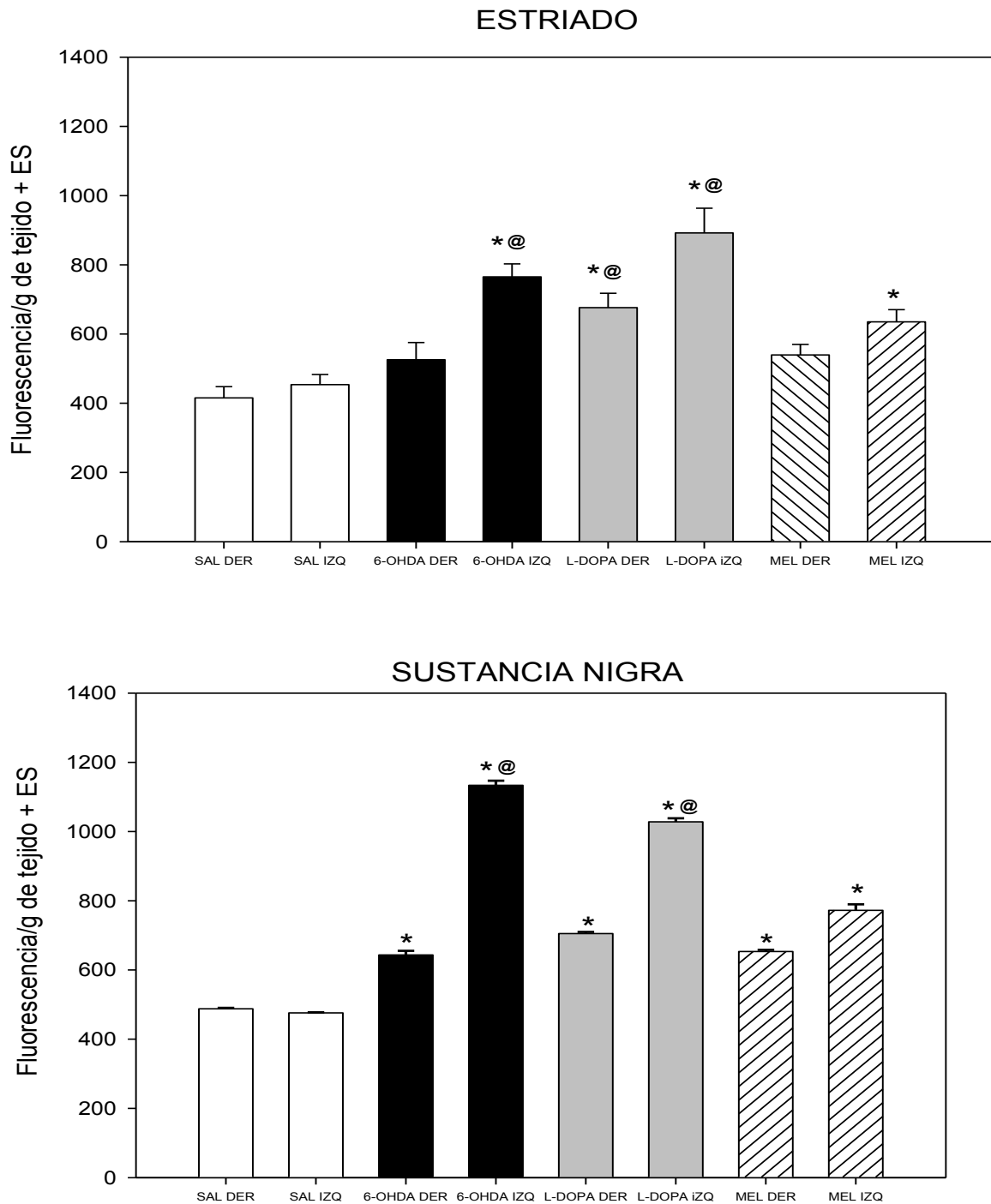
PEROXIDACION DE LIPIDOS LESION CON SALINA+ TRATAMIENTOS



GRÁFICA 6. En esta gráfica se muestra la media de las unidades de fluorescencia/g de tejido en el núcleo estriado y *sustancia nigra* de los animales lesionados con solución salina + tratamientos.

En donde: * = P + 0.005 v/s grupo Salina
@ = P + 0.005 v/s grupo Salina+Melatonina

PEROXIDACION DE LIPIDOS LESION 6-OHDA+ TRATAMIENTOS



GRAFICA 7. En esta gráfica se muestra la media de las unidades de fluorescencia/g de tejido en el núcleo estriado y *sustancia nigra* de los animales lesionados con 6-OHDA + tratamientos.

En donde * = P + 0.005 v/s grupo Salina

@ = P + 0.005 v/s grupo 6-OHDA+Melatonina

DISCUSIÓN

CONDUCTA MOTORA

Como se pudo observar en nuestros resultados, los animales lesionados con 6-OHDA presentaron decremento en la coordinación motora, haciéndose más evidente a más tiempo post lesión (Gráfica 1), lo cual concuerda con los resultados de Allbut y Henderson (2007), quienes realizaron un estudio con ratas lesionadas unilateralmente en el haz medial con 6-OHDA, y evaluaron la conducta motora en una viga de madera de 4cm de ancho, donde observaron, que el tiempo que tardaron las ratas en recorrer la viga es incrementado drásticamente con respecto al grupo control, asimismo los animales presentaron rigidez y mucha precaución en sus movimientos al recorrer la viga. Algunas ratas recorrían la viga pero se detenían y luego reiniciaban el recorrido o simplemente se quedaban inmóviles, lo cual es análogo a los comportamientos observados en los pacientes con EP. Por lo que dichos autores proponen que la depleción de DA en el estriado, resulta en el decremento de la iniciación de los movimientos y la velocidad de recorrer la viga de madera, lo cual podría ser considerado como acinesia y bradicinesia.

Truong y cols. (2006), realizaron un estudio en ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA en diferentes dosis, y posteriormente evaluaron la conducta motora en una viga de madera. Los animales mostraron un tiempo de recorrido de aproximadamente 1 minuto a las 2 y 4 semanas post-lesión, mientras que el grupo control mostró un tiempo de recorrido de 0.2 minutos, concluyendo que los cambios en el daño motor están correlacionados con la pérdida de las células dopaminérgicas.

Como se describe en nuestros resultados, los animales tratados con L-DOPA mostraron mejoría en la conducta motora hasta los 21 días, pero a los 28 días el tratamiento con L-DOPA ya no fue capaz de disminuir las alteraciones motoras inducidas por la 6-OHDA. Como se mencionó anteriormente el tratamiento con L-DOPA sigue siendo el fármaco más efectivo para el tratamiento de la EP, ya que ningún otro fármaco iguala su habilidad para

suprimir los síntomas. Sin embargo, después del tratamiento crónico, 30 a 80% de los pacientes desarrollan efectos adversos como las discinesias que llegan a ser más discapacitantes que la enfermedad misma (Blanchet *et al.*, 1994). Al respecto Rajput y cols. señalan en su revisión (1974 a 1979), que los pacientes que recibieron L-DOPA, cerca de dos terceras partes tuvieron beneficios dentro de los primeros tres a seis meses de tratamiento, pero después de un tiempo mostraban un claro deterioro acompañado de un incremento constante de complicaciones, tales como cambios en el umbral inducido por L-DOPA, y movimientos involuntarios (Otero-Siliceo 1996). Asimismo se ha reportado que los pacientes que desarrollan disquinesias debido al prolongado uso de L-DOPA, se caracterizan por movimientos caóticos involuntarios e incontrolables de la boca, mejillas, brazos y piernas (Blanchet, 1999; Linazasoro, 2005); dichas disquinesias se consideran como una respuesta negativa de la plasticidad cerebral en respuesta al tiempo de evolución de la enfermedad y el uso prolongado de L-DOPA (Linazasoro 2005; Samadi *et al.* 2006).

También se ha reportado que animales depletados de DA y tratados crónicamente con L-DOPA presentan disquinesias, movimientos diatónicos (contracción muscular involuntaria) que afectan los movimientos de la cabeza, tronco y de los miembros, los cuales son manifestaciones clínicas observadas en pacientes (Monville *et al.*, 2005). Además de que el tratamiento prolongado con L-DOPA produce rigidez y bradicinesia, deja de ser efectivo, y se presentan los periodos “wearing-off”, es decir cuando una dosis de L-DOPA no es suficiente para mejorar los síntomas de la enfermedad (Chan *et al.*, 2005; Samadi *et al.*, 2006; Nomoto y Nagai, 2006).

El mecanismo por el cual la L-DOPA produce complicaciones motoras aún no ha sido establecido, pero se han propuesto diversas teorías, entre ellas se encuentran:

Las fluctuaciones pueden ocurrir por deficiencias en la síntesis y almacenamiento de la DA en las terminales dopaminérgicas (Blanchet *et al.*, 1994). Otra posibilidad es que el Sistema Transportador de DA (DAT), que representan el mayor mecanismo por el cual la DA es eliminada de las sinapsis

(-elemento crucial involucrado en la regulación de la transmisión dopaminérgica-Jaber *et al.*, 1999), se ve alterado por el tratamiento prolongado con L-DOPA. (Fahn *et al.*; 2004).

Para tratar de explicar por qué la L-DOPA deja de ser efectiva se ha puesto especial interés en las modificaciones de la densidad de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 en las neuronas estriatales de proyección, sin que a la fecha queden claros los cambios que se producen, ya que se ha reportado aumento, disminución o ningún cambio en los receptores D2 estriatales en modelos animales, lo mismo ha sucedido para los receptores D1 (Calon *et al.*, 1995; Taylor *et al.*, 2005).

Ahora bien, los animales tratados con Melatonina presentaron un comportamiento muy similar al grupo con lesión inducida por inyección de 6-OHDA a los 7 y 14 días, posteriormente los animales presentaron mejoría de la conducta motora haciéndose más evidente a los 28 días post-lesión (Gráfica 1). Consideramos que en los animales tratados con Melatonina probablemente no mejoraron la conducta motora al inicio del tratamiento, debido a que la inyección de la neurotoxina es sumamente agresiva y provoca que algunas células dejen de ser funcionales (es decir, dejan de producir DA) sin necesariamente inducir su muerte (Kearns y Gash; 1995). Por ello probablemente los animales presentan un desbalance motor muy similar al grupo de 6-OHDA, entonces es factible pensar que con el tratamiento con Melatonina se activen diferentes vías de señalización para aumentar el mecanismo de defensa contra los ROS producidos por la 6-OHDA, por lo que después de un tiempo la célula será capaz de recuperar su actividad, produciendo una influencia moduladora en el sistema dopaminérgico reflejándose en la recuperación de la conducta motora.

A este respecto Singh y *cols.* (2006) reportan que en animales tratados por vía sistémica con Melatonina previa y posteriormente a la lesión con 6-OHDA, se presenta disminución en el número de giros inducidos por apomorfina, mejoras en la postura y el tiempo de inicio de movimiento en comparación con el grupo

de 6-OHDA y tratados con solución vehículo. Dichos resultados evidencian que el tratamiento con Melatonina podría tener efectos benéficos para el tratamiento de la EP. Por otra parte Hamdi (1998) realizó un estudio en animales donde administró Melatonina en el agua para beber y encontraron que el núcleo estriado presentó mayor afinidad a los receptores dopaminérgicos D2, mientras que el número de receptores no cambió. El mecanismo por el cual la Melatonina incrementa la afinidad de los receptores dopaminérgicos D2 es desconocido, pero el autor propone que este efecto puede ser producido a través de modificaciones conformacionales en el sitio de unión al receptor. Este mecanismo puede involucrar una alteración funcional por un efecto directo o indirecto de la Melatonina en uno o más niveles de regulación del receptor, por ejemplo: genes de transcripción y síntesis de proteínas del receptor, es decir que la Melatonina puede representar una influencia moduladora en el sistema dopaminérgico (Aguar *et al.*, 2002).

CÉLULAS INMUNORREACTIVAS A TH

En cuanto al número de neuronas inmunorreactivas a TH, se observó drástica disminución de células al depletar la vía nigroestriatal; nuestros resultados concuerdan con los de Demier y colaboradores (1999) quienes realizando un estudio sobre la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNc, encontraron que los pacientes con enfermedad de Parkinson presentaron una reducción en el número de neuronas dopaminérgicas de hasta 95% dependiendo del tiempo de evolución clínica, mientras que los animales con lesión nigroestriatal muestran una reducción significativa del número de neuronas dopaminérgicas en la SNc (Blunt *et al.*, 1993; Machado, *et al.*, 2005).

Como se observa en nuestros resultados el grupo lesionado con 6-OHDA y el grupo de 6-OHDA+L-DOPA presentaron pérdida drástica de neuronas inmunorreactivas a TH (Gráfica 2). La pérdida celular con el tratamiento con L-DOPA puede deberse a que como se mencionó anteriormente, la L-DOPA por medio de la enzima AADC es convertida a DA y de este modo eleva los niveles de DA en el núcleo estriado (Obeso *et al.*, 2000^a; Picconi *et al.*, 2004). A este respecto existen evidencias que sugieren que la cantidad disponible de DA,

además de servir como neurotransmisor, puede actuar como una neurotoxina y de ese modo participar en el proceso de neurodegeneración. En estudios de células en cultivo expuestas a altas dosis de DA se ha encontrado que la DA es capaz de producir muerte neuronal apoptótica caracterizada por condensación y fragmentación nuclear (Luo y Roth 2000), e incrementar el Ca^{2+} intracelular en las neuronas y decrementar los niveles de GSH, estos efectos de la oxidación de la DA en la fisiología celular pueden ocurrir *in vivo* bajo condiciones de estrés oxidativo, de tal manera que podrían potenciar la muerte celular (Roth *et al.*, 1997).

Se ha reportado que animales lesionados con 6-OHDA y tratados con L-DOPA durante un periodo de 6 semanas se observa disminución de células inmunorreactivas a TH en la SNc comparado con animales tratados con solución vehículo (Ferrario *et al.*, 2003).

Con respecto al tratamiento con Melatonina, nuestros datos muestran que hubo mayor número de neuronas dopaminérgicas en comparación con el grupo de 6-OHDA y 6-OHDA+LDOPA (Gráfica 2).

Como se mencionó anteriormente la 6-OHDA provoca la generación y acumulación de compuestos citotóxicos que inducen estrés oxidativo, de tal manera que actúa inhibiendo el complejo I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial, de este modo reduce la generación de ATP y causa la producción de especies reactivas de oxígeno. En este sentido, se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo* en donde se ha observado que la administración de Melatonina puede influenciar la homeostasis mitocondrial, de ese modo la Melatonina incrementa la actividad mitocondrial en la cadena respiratoria del complejo I y IV (León, *et al.*, 2005). Asimismo en un modelo de EP producido con 6-OHDA, el tratamiento sistémico con Melatonina incrementó la eficiencia del complejo I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial de la SNc, sugiriendo que la Melatonina puede interactuar con el complejo donando 2 electrones (León *et al.*, 2004; Dabbeni *et al.*, 2001). Se ha propuesto que el mecanismo posible por el cual la Melatonina incrementa la actividad del complejo IV puede ser en parte

por el efecto en la expresión del DNA mitocondrial (DNAm_t) ya que la Melatonina incrementa la expresión del DNAm_t que codifica el polipéptido de la subunidad I, II, y III del complejo IV en la mitocondria, lo cual se correlaciona con el incremento de la actividad del complejo IV (León *et al.*, 2005); también se ha sugerido que la Melatonina puede interactuar con el complejo de la cadena de transporte de electrones ya que tiene la capacidad de donar y aceptar electrones, de ese modo incrementa el flujo de electrones, el cual es un efecto que no se ha observado con ningún otro antioxidante (León *et al.*, 2004).

Interesantemente se ha reportado que la Melatonina tiene la capacidad de regular cambios en la expresión de genes, pero el mecanismo a través del cual puede actuar aún no es entendido. Se ha propuesto que puede involucrar activación de factores de transcripción por medio de receptores específicos a Melatonina (Bondy, *et al.*, 2004). Por ejemplo, se ha reportado una alta regulación del GDNF en el sistema nigroestriatal seguido de la administración intranigral de Melatonina en animales depletados de DA. El GDNF confiere protección al sistema dopaminérgico estriatal en modelos experimentales de la EP. A este respecto, se ha observado que la administración de GDNF estimula a la enzima TH. Por lo que un posible mecanismo por el cual la Melatonina induce la expresión del RNAm de la TH, puede estar relacionado con los altos niveles de GDNF (Venero *et al.*, 2002; McMillan *et al.*, 2007).

Más aún, se ha observado que la diferenciación de neuronas dopaminérgicas y la expresión de los niveles de RNAm de la TH son regulados por el estado del oxígeno, dichas neuronas en cultivo muestran altos niveles de DA e incremento en la expresión de la TH cuando son expuestas a condiciones anóxicas (0% de O₂) o hipóxicas (5% O₂). Dentro este contexto las condiciones hipóxicas favorecen la expresión del gen para la TH; por lo que se ha propuesto que el tratamiento con Melatonina puede producir un ambiente menos oxidativo y de esa manera favorecer la expresión de la enzima TH (Venero *et al.*, 2002).

ULTRAESTRUCTURA

Nuestros resultados mostraron que la depleción unilateral de DA produjo alteraciones en el diámetro de los botones presinápticos (Gráfica 3), lo cual concuerda con los datos reportados por Colín-Barenque (1994) en biopsias de pacientes con EP, y en animales lesionados con 6-OHDA (Avila-Costa, 1996; Ordóñez, 2004; Flores, 2005). Se ha propuesto que el edema de los botones presinápticos puede ser debido a que la 6-OHDA al ser inyectada en el haz medial del cerebro anterior induce una completa o casi completa destrucción de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales así como de sus terminales en el estriado (Soto-Otero 2000); ya que las terminales dopaminérgicas y glutamatérgicas establecen contacto sináptico con las neuronas espinosas medianas GABAérgicas entonces la depleción de DA afecta la función de estas últimas (Meshu et al 1999), entonces es probable que para compensar la pérdida dopaminérgica, los botones sinápticos restantes degeneren (se hinchen) y ocupen mayor espacio (Ingham *et al.* 1991). Arbuthnott e Ingam (1993) han postulado que al no estar la DA presente en el estriado, las membranas son más susceptibles y sufren modificaciones que podrían resultar en un aumento en el diámetro de los botones sinápticos.

Con respecto a la estructura postsináptica nuestros datos muestran que la lesión del estriado ipsilateral provocó pérdida de contactos sinápticos establecidos con las espinas dendríticas, los cuales son característicos de los contactos dopaminérgicos (Voorn y Buijs 1987). Estos datos concuerdan con los reportados por Avila-Costa y cols (1998), en donde reportaron que tanto el tejido de pacientes con EP como el de animales lesionados con 6-OHDA en la vía nigroestriatal se observan cambios en el blanco postsináptico en el núcleo caudado. Asimismo Ingam y cols (1993) realizaron un estudio en animales lesionados con 6-OHDA y encontraron una disminución del 19 % en la densidad de espinas dendríticas. Una explicación posible es que la DA tiene una función neurotrófica relacionada con el mantenimiento y supervivencia de la espina dendrítica (Ingham y Hood 1998).

Otra explicación posible es que la pérdida de espinas podría ser un mecanismo compensatorio como consecuencia de la deafferentación ocasionada por la lesión con 6-OHDA, ya que como se ha observado, el incremento en la liberación de glutamato en el estriado al estar modulada en parte por las aferencias nigroestriatales (Cepeda y Levine, 1998), promovería un incremento en los niveles extracelulares de glutamato (Meshul *et al.* 1999). Entonces al disminuir el número de espinas se reduciría la posibilidad de contactos sinápticos excitatorios y con esto la posible hiperexcitabilidad (Cavazos, *et al.* 1991), evitando de ese modo la muerte celular por excitotoxicidad (Fiala, *et al.* 2002).

En cuanto al número de sinapsis perforadas, nuestros resultados concuerdan con lo reportado en estudios previos, en donde se observó, en muestras de núcleo caudado de Pacientes con EP, un aumento en el número de contactos sinápticos perforados (Calverley y Jones 1990; Muriel *et al.*, 2001), asimismo en animales depletados de DA (Jeffrey *et al.* 2000; Avila Costa *et al.* 2004).

Se ha propuesto que las sinapsis perforadas pueden funcionar para incrementar la superficie de la densidad postsináptica y de ese modo hacer más eficiente el proceso de neurotransmisión (Anglade *et al.*, 1996; Jeffrey *et al.*, 2000, Briones *et al.*, 2004). Por lo que es muy probable que al provocar la lesión con 6-OHDA, el botón sináptico trate de compensar la pérdida de otras terminales aumentando la densidad sináptica, observándose posibles mecanismos de plasticidad cerebral (Kung, *et al.*, 1998).

En un estudio realizado por Anglade y cols (1996) en donde analizaron el núcleo caudado de pacientes con EP, los cuales recibieron tratamiento con L-DOPA, reportan un incremento en el número de sinapsis perforadas (88% de incremento), y aumento de la densidad sináptica, comparado con el grupo control, por lo que proponen que las sinapsis perforadas pueden estar correlacionadas morfológicamente con el aumento del recambio de receptores en la densidad postsináptica, además sugieren que estos cambios sinápticos probablemente no son debidos al tratamiento con L-DOPA, ya que se han observado en animales con denervación dopaminérgica en ausencia de L-

DOPA, es decir que la L-DOPA no está involucrado en las sinapsis perforadas, si no que es un mecanismo compensatorio producido por la denervación dopaminérgica.

Ahora bien, como se describe en nuestros resultados, los animales que recibieron tratamiento con Melatonina presentaron menor número de botones con edema (Gráfica 3) y mayor número de contactos con espinas dendríticas, (Gráfica 4) a diferencia del grupo de 6-OHDA y 6-OHDA+L-DOPA. La neuroprotección observada con el tratamiento con Melatonina pudo deberse a que la Melatonina actúa como atrapador de radicales libres y antioxidante, ya que tiene la capacidad de estimular las enzimas antioxidantes como el GSH y SOD (Mayo *et al.* 2002), asimismo puede influenciar la homeostasis mitocondrial, incrementa la actividad en la cadena respiratoria del complejo I y IV (León *et al.*, 2005), más aún tiene la capacidad de regular la expresión génica del GDNF el cual confiere protección al sistema dopaminérgico estriatal (McMillan *et al.*, 2007). De este modo podría permitir que el estriado regrese a un balance que evita mayor daño sobre las neuronas estriatales como consecuencia de las alteraciones provocadas por la 6-OHDA.

PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

En nuestros resultados pudimos observar que el grupo lesionado con 6-OHDA (Gráfica 7) presentó altos niveles de peroxidación de lípidos, lo cual es el resultado del daño producido por estrés oxidativo (Yap *et al.*, 2006), debido probablemente, a que bajo condiciones fisiológicas la 6-OHDA es oxidada rápidamente, no enzimáticamente, por el oxígeno molecular (Soto-Otero, 2000), produciendo RL, H_2O_2 y productos de oxidación de quinonas (los cuales también están involucrados como intermediarios de RL inestables) (León, 1996). Así, el H_2O_2 resultante de la autooxidación de la 6-OHDA puede ser fácilmente reducido en presencia de hierro (Fe^{2+}) vía la reacción de Fenton, formando el radical OH^\bullet (Enochs *et al.*, 1994), entonces esta excesiva producción de RL, provoca que las células entren en un estado de estrés oxidativo causando la destrucción indiscriminada de macromoléculas celulares como proteínas, DNA y carbohidratos (González, 1999). Asimismo, el estrés

oxidativo puede causar alteraciones en las vías de señalización del Ca^{2+} (Barnham *et al.*, 2004; Savitt *et al.*, 2006), el cual provoca la sobre-estimulación de los receptores glutamatérgicos, de tal manera, que se produce una cascada de eventos que llevan a la formación de ON^\bullet el cual a su vez produce más especies reactivas de Nitrogeno (Akçay *et al.*, 2005).

También se ha reportado que la 6-OHDA puede actuar directamente, por inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial, a nivel de los complejos I y IV (Glinka *et al.*, 1998), lo que trae como consecuencia la depleción del ATP, (Blum *et al.*, 2001) y la subsecuente producción de ROS (Lotharius *et al.*, 1999). Se ha reportado ampliamente que la 6-OHDA produce la disminución de las enzimas GSH y SOD, asimismo, se ha observado que incrementa los niveles de peroxidación de lípidos en el núcleo estriado (Betarbet *et al.*, 2002).

Ahora bien, la L-DOPA no protegió las alteraciones inducidas por la 6-OHDA, debido a que se ha sugerido que el tratamiento con L-DOPA produce estrés oxidativo por dos vías: a) Incremento en la degradación de DA por la MAO generando H_2O_2 como un producto (Maratos *et al.*, 2003), y b) por la auto-oxidación de la L-DOPA a dopamina, la cual resulta en la producción de H_2O_2 , O^{2-} , OH^\bullet y quinones (Luo y Roth, 2000). Por lo que se ha propuesto que la pérdida neuronal puede ser causada por mecanismos de oxidación, ya que existe una amplia evidencia de que la L-DOPA reduce la supervivencia de las células dopaminérgicas en cultivo (Michel y Heftil, 1990; Walkinshaw y Waters, 1995).

También se ha demostrado que la administración de L-DOPA induce la producción de ON^\bullet en el núcleo estriado (Itokawa *et al.*, 2006). En este sentido se ha observado que células expuestas ON^\bullet muestran una inhibición irreversible de la cadena respiración mitocondrial, debido a la conversión de ON^\bullet a especies reactivas de nitrógeno (ERN), como catión nitroso (NO^+), anión nitroxil (NO^-) y ONOO^- ; de tal forma que se produce la depleción de energía y como consecuencia muerte celular, asimismo puede inducir peroxidación de lípidos (León *et al.*, 2005).

Con respecto a la pérdida de la eficacia terapéutica de la L-DOPA, Maharaj y colaboradores (2005^b) reportan que en animales que recibieron inyección intracerebral de sulfato ferroso y que recibieron tratamiento agudo y crónico con L-DOPA resulta en la formación de 6-OHDA en el núcleo estriado de rata, asimismo reportan que la L-DOPA incrementa los niveles de peroxidación de lípidos, y cuando la L-DOPA se administra junto con Melatonina, se reduce la formación de 6-OHDA y los niveles de peroxidación. Estos autores sugieren que la presencia endógena de fierro y ácido ascórbico en el cerebro de la rata puede crear un ambiente químico el cual puede permitir a la L-DOPA ser hidroxilada en su carbono 6, resultando en la formación no enzimática de 6-OHDA. De esta manera, la L-DOPA puede acelerar la degeneración de las neuronas dopaminérgicas por el metabolismo oxidativo de la 6-OHDA.

Finalmente, nuestros resultados muestran que el grupo que recibió tratamiento con Melatonina presentó mayor neuroprotección, debido a que la Melatonina actúa como atrapador de radicales libres (Reiter, *et al.*, 2000^b) y antioxidante (Martínez-Cruz, *et al.* 2006). Se ha observado que la Melatonina exógena protege células, tejidos y órganos del daño oxidativo, ya que neutraliza los $\cdot\text{H}_2\text{O}_2$, ON^\bullet , O_2^- y NOO^- (Reiter, 2000^a; Reiter, 2000^b). Asimismo se ha reportado que reduce los niveles de peroxidación de lípidos (Maharaj, *et al.* 2006).

Además se sugiere que la Melatonina puede promover y estimular las enzimas antioxidantes como GSH-Px, glutatión reductasa (GSH-Rx), glutatiloilcisteína sintasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenada (G6PD), SOD y CAT; pero el mecanismo de inducción enzimática aún no ha sido identificado (Hardeland y Pandi, 2005; Hardeland, *et al.* 2006). En estudios previos se ha reportado que células PC12 expuestas a la neurotoxina 6-OHDA y tratadas con Melatonina muestran un aumento en la expresión de genes de las enzimas antioxidantes como el GSH-Px, CuZnSOD y MnSOD (Reiter *et al.* 2003).

En un estudio realizado por Kerman y cols. (2005) en cerebros homogenizados en condiciones de estrés oxidativo inducido por trauma cerebral, reportan que

la Melatonina decremento significativamente los niveles de peroxidación de lípidos, debido probablemente a que encontraron incremento en la actividad del GSH-Px la cual metaboliza H_2O_2 a H_2O y GSH reducido. El incremento en la actividad del GSH-Px producido por la Melatonina puede ser por dos razones: 1) por la actividad antioxidante de la Melatonina, la cual protege a la enzima de la inactivación por RL y 2) por la estimulación de la expresión de genes de la enzima GSH-Px (Reiter *et al.*, 2003).

Más aún, se propone que la Melatonina bajo condiciones de estrés oxidativo puede actuar de la siguiente manera:

Se ha observado que en condiciones fisiológicas la Melatonina tiene la capacidad de atrapar 2 radicales OH^\bullet y dar lugar a la formación del metabolito 3-hidroximelatonina cíclico, el cual puede ser excretado por la orina, o bien puede ser metabolizado por RL y formar AFMK (N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinuramina). Otra vía es que la Melatonina puede interactuar con RL como $O_2^{\bullet-}$, CO_3^\bullet , y/o OH^\bullet llevando a la formación de AFMK. Este AFMK puede reaccionar con H_2O_2 o con O_2 y formar el metabolito AMK (N1-acetil-5-metoxikinuramina; las dos enzimas posibles de catalizar esta reacción han sido identificadas como arilamina formidasa y hemoperoxidasa) (Figura 11). Recientemente se ha puesto gran interés en el AFMK y AMK, debido a que se ha reportado que también poseen importantes características antioxidantes como las de la Melatonina. A este respecto se ha reportado que ambos metabolitos reducen los niveles de peroxidación de lípidos y tienen la característica de donar 2 electrones. Asimismo se ha reportado que el AFMK confiere neuroprotección a células de hipocampo las cuales fueron expuestas a H_2O_2 y a glutamato (Reiter *et al.*, 2003; Hardeland y Pandi, 2005; León *et al.*, 2005).

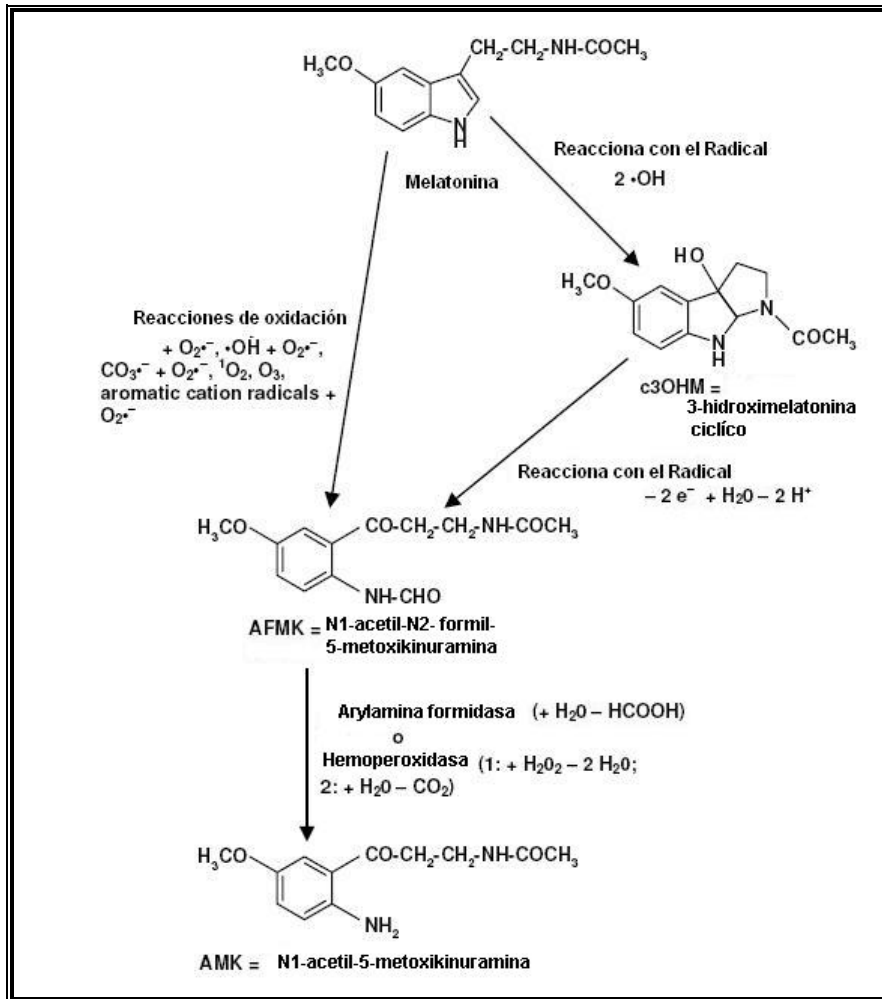


FIGURA11. Vía Kinurenica del metabolismo de la Melatonina (Tomado de Hardeland y Pandi 2005)

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos decir que:

- ➡ La degeneración neuronal provocada por la 6-OHDA se refleja ultraestructuralmente en el núcleo estriado por el aumento en el diámetro de los botones sinápticos, disminución de los contactos con espinas dendríticas, aumento en el número de contactos perforados y altos niveles peroxidación de lípidos. Así como alteraciones importantes en la conducta motora
- ➡ Los animales tratados con L-DOPA presentaron recuperación de la conducta motora en los primeros días de tratamiento, pero después de un tiempo los animales presentaron deterioro en la actividad motora. A nivel citológico los animales presentaron alteraciones muy similares al grupo de 6-OHDA debido a que la L-DOPA incrementa la producción de radicales libres provocando en las células estrés oxidativo y la consecuente muerte neuronal.

CONCLUSIÓN

- ➡ El tratamiento con Melatonina es capaz de proteger las alteraciones producidas por la 6-OHDA, las cuales se caracterizan por: recuperación de la conducta motora, mayor supervivencia de células dopaminérgicas, menor número de botones con edema, mayor prevalencia de contactos sinápticos con espinas, así como bajos niveles de peroxidación de lípidos. Por lo que consideramos que la Melatonina puede ser un posible candidato para el tratamiento de la EP ya sea como monoterapia (probablemente en los inicios de la enfermedad) o en combinación con la L-DOPA, para evitar o retardar el daño producido por esta última.

ABREVIATURAS

EP	Enfermedad de Parkinson
DA	Dopamina
GB	Ganglios Basales
NE	Núcleo Estriado
SN	Substancia Nigra
SNc	Substancia Nigra Compacta
SNr	Substancia Nigra Reticular
GPI	Globo Pálido Interno
GPe	Globo Pálido Externo
NST	Núcleo Subtalámico
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
CAT	Catalasa
SOD	Superóxido Dismutasa
GSH-Px	Glutación Peroxidasa
GSH	Glutación
NOSn	Óxido Nítrico Sintasa Neuronal
O_2^-	Anión Superóxido
H_2O_2	Peróxido de Hidrógeno
OH^\bullet	Radical Hidróxilo
ON^\bullet	Óxido Nítrico
$ONOO^-$	Peroxinitrito
MAO	Monoaminoxidasa
6-OHDA	6-Hidroxidopamina (2,4,5 Trihidroxifeniletilamina)
MPTP	1-Metil-4,Fenil-1,2,3,6-Tetrahidropiridina
TH	Tirosina Hidroxilasa
L-DOPA	Levo-dihidroxifenilalanina
AFMK	N1-acetil-N2- formil- 5-metoxikinuramina
AMK	N1-acetil-5-metoxikinuramina

APÉNDICES

1.-INMUNOCITOQUIMICA PARA TIROXINA HIDROXILASA PARA MICROSCOPIA DE LUZ.

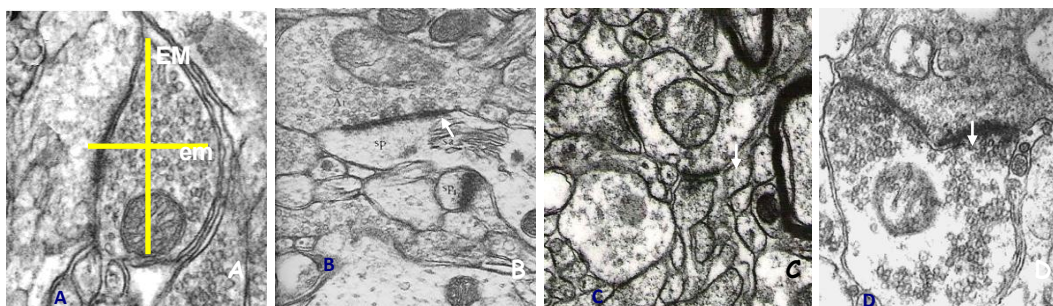
Se realizaron cortes histológicos del mesencéfalo ventral (SNc de entre 50-100). Posteriormente se hicieron lavados sucesivos en el siguiente orden: En amortiguador PBS 3 veces por 10 minutos; 3 lavados en amortiguador TRIS de 10 minutos; amortiguador TRIS y peróxido de hidrógeno 0.3 % (30 minutos); amortiguador TRIS y borohidrido de sodio 0.01 % (30 min); amortiguador TRIS con 1 % de suero normal de cabra y 0.3 % de tritón (durante 1 h), todos con agitación, posteriormente se incubaron los cortes en una alícuota de anticuerpo primario anti-TH en amortiguador TRIS 1:1000 con 1 % de suero normal de cabra por 3 días a 4 °C. Posteriormente se lavaron los cortes 3 veces en amortiguador TRIS con 1 % de suero normal de cabra durante 10 min con agitación. Se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente en el anticuerpo secundario. Anti-IGg de conejo 1:200 en TRIS con 1 % de suero normal de cabra. Se hizo un lavado en TRIS con 1 % de suero normal de cabra, para después incubar en Abidina-Biotina (2 Hrs) a temperatura ambiente. Después de 3 lavados en TRIS con agitación se reveló la tinción en los tejidos con 3-3 Diaminobencidina (DAB) al 0.05 % y 0.003 % de peróxido de hidrógeno. El tejido se lava una última vez en TRIS por 10 min y se montan en portaobjetos previamente gelatinizados, se dejan secar un día. Para cubrir con resina se realizó la deshidratación de los cortes con alcoholes en concentraciones crecientes (60, 70, 80, 90 y 96 %) diez minutos en cada uno y 3 cambios en alcohol de 100 % de 10 min. y finalmente dos cambios en tolueno de 10 min. cada uno.

Para su posterior análisis en un fotomicroscopio, haciendo un conteo de las neuronas inmunorreactivas a TH en la SNc en un área de 1500 μm^2 en 10 cortes por animal a partir del inicio del núcleo terminal medial del tracto óptico accesorio. Todos los datos se analizaron mediante la prueba de ANOVA.

2.-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Los fragmentos del cuadrante dorsomedial de la cabeza del NE y de la SNc se lavaron en PBS, y fueron colocados durante una hora en tetraóxido de Osmio al 1% preparado con PBS para la postfijación; posteriormente los fragmentos se lavaron con PBS en tres cambios de 10 minutos cada uno. El segundo paso consistió en la deshidratación del tejido con alcoholes en concentraciones crecientes (del 50 al 96 %) durante lapsos de 10 minutos cada uno y finalmente, el tejido fue puesto en alcohol al 100 % por tres ocasiones de 10 minutos cada una para colocar el tejido en tolueno durante dos períodos de 10 minutos cada uno. Los tejidos fueron infiltrados en una mezcla de resina 1:1 araldita-tolueno a 60 °C. Se mantuvieron por 12 horas en una mezcla 3:1 de araldita-tolueno a temperatura ambiente, los fragmentos ya infiltrados se incluyeron en araldita pura a 60 °C durante 24 horas.

Una vez que se polimerizó la resina, se procedió a realizar los cortes finos de 900 Å en un ultramicrotomo Reichert-Jung utilizando cuchillas de diamante. Se montaron los cortes en rejillas de cobre y se contrastaron en acetato de uranilo al 5 % durante 20 minutos y con citrato de plomo al 0.4 % por 5 minutos. Los cortes fueron observados en un microscopio electrónico Jeol Jem 100 CX II y se llevo a cabo el análisis ultraestructural, realizando las mediciones directamente en la pantalla.



Análisis ultraestructural: **A**.-eje mayor (EM) y el eje menor (em); tipo de contacto sináptico, con la cabeza (**B**), o con el cuello de la espina dendrítica (**C**); y número de sinapsis perforadas (**D**).

Las pruebas estadísticas que se utilizaron para el análisis de resultados fueron: Para el diámetro de los botones sinápticos se utilizó ANOVA. Para las características del botón sináptico (contacto con el cuello o con la cabeza de la espina dendrítica y el número de sinapsis perforadas) se utilizó la prueba de Wilcoxon.

3.- DETERMINACION DE PEROXIDACION DE LIPIDOS FLUOROMETRICO IN VIVO.

Se peso el tejido estriatal y nigral, para posteriormente homogenizarlo en 3ml de solución salina. A 1ml del homogenizado se le adiciono 4ml de una mezcla de cloroformo metanol (2:1). Se dejaron reposar los tubos en hielo durante un periodo de 45 minutos protegidos de la luz, posteriormente la fase lípidica es separada de la metanolica. Se procede a la medición de la señal de fluorescencia con longitudes de onda de excitación de 370nm y emisión 430nm. La sensibilidad fue ajustada con un estándar de fluorescente de quinina (0.1g/ml) en acido sulfúrico 0.05M a 300 unidades. Finalmente los resultados fueron expresados en unidades de fluorescencia/gramo de tejido fresco.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña-Castroviejo D., Escames G., López L. C., and Mulero M. (2006). Protective Role of Melatonin against Mitochondrial Damage in Inflammation Chapter XX. In: Melatonin: From Molecules to Therapy. Nova Science Publishers, Inc.
- Adler LA, Peselow E, Rotrosen J, Duncan E, Lee M, Rosenthal M, Angrist B.(1993). Vitamin E treatment of tardive dyskinesia. *Am J Psychiatry.* 150(9):1405-1407.
- Agostinho, P; Pereira, C. and Oliveira C.R (2005). Neurodegenerative Pathways in Parkinson's Disease: Therapeutic Strategies. *Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders*, 4, 405-419.
- Aguiar, L.M; Vasconcelos, S.M; Sousa, F.C. and Viana, GS. (2002) Melatonin reverse neurochemical alteration induced by 6-OHDA in rat striatum. *Life Science* 70: 1041-1051.
- Akçay Y.D., Yalçın A. and Zozmen Y.E. (2005). The effect of melatonin on lipid peroxidation and nitrite/nitrate levels and on superoxide dismutase and catalase activities in kainic acid-induced injury. *Cellular & molecular biology letters.* 10: 321–329
- Alamo, C., Lopez-Muñoz F., Bhatara V.S. and Cuenca, E. (2004). La contribución de la reserpina al desarrollo de la psiquiatría y su papel en la investigación neurobiológica. *Rev Psiquiatría* 31(3): 130-139.
- Alanís. Q.M. (1996). Historia natural de la Enfermedad de Parkinson. En -Otero-Siliceo. 1996. Parkinson enfoque al futuro. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Fondo de Cultura Económica. México.11-17.
- Alexander, G. Y Crutcher, H, M.D. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: Neural substrates of parallel processing. *TINS* 137. 266-271.
- Allbutt Haydn N. y Henderson Jasmine M. (2007). Use of the narrow beam test in the rat, 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Methods.* 159: 195–202
- Andersen, J.K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature review.* S18-S25.
- Andrew, R.,Watson, D.G., Best, S.A., Midgley, J.M.,Wenlong, H., Petty, R.K., (1993). The determination of hydroxydopamines and other trace amines in the urine of Parkinsonian patients and normal controls. *Neurochem. Res.* 18, 1175–1177.
- Anglade, P; Mouatt-Prigent, A. and Agid,Y. (1996). Synaptic plasticity in the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease. *Neurodegeneration* 5:121-128.
- Angulo, J.A. and McEwen, B.S. (1994). Molecular aspects of neuropeptide regulation and function in the hábeas striatum and nucleus accumbens. *Brain Res.Rev.* 19: 1-28.
- Appel, S.H. (1981). A unifying hypothesis for the cause of amyotrophic lateral sclerosis, Parkinsonism, and Alzheimer disease. *Ann Neural* 10: 499-505. En: Otero-Siliceo. (1996). Parkinson enfoque al futuro. Fondo de Cultura Económica México. Pág 25-32.
- Arbuthnott, G.W. and Ingham, C.A. (1993). The thorny problem of whatdopamine does in psychiatric disease. En: Arbuthnott, G.W. y Mesón, P.C. (eds.) *Progress in Brain Research*, vol. 99 Elsevier Science Publishers B.V. p. 341-350.
- Austin, M. Y Kalivas, P. (1990). Enkephalinergic and GABAergic modulation of motor activity in the ventral pallidum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252: 1370-1377.

- Avila Costa M.R. (1996). Evolución de las alteraciones ultraestructurales del neuropilo del núcleo caudado de rata después de la lesión unilateral de la vía nigroestriatal con 6-hidroxidopamina. Tesis para obtener el grado de Maestría en Neurociencias. ENEP-Iztacala. UNAM.
- Avila Costa, M.R. Colín, B, L; Espinosa, V.J. Y Machado,S:J. (1998). Degeneración del neuropilo del núcleo caudado en la enfermedad de Parkinson y en el modelo experimental provocado con 6-OHDA: Análisis ultraestructural comparativo. *Patología. México.* 36:297-301.
- Avila-Costa MR, Colín-Barenque L, Aley-Medina P, Gutierrez Valdez AL, Ordoñez Librado JL, Martínez EF, Fortoul TI. (2005^a). Bilateral increase of perforated synapses after unilateral dopamine depletion. *Int J Neurosci.* 115(1):79-86.
- Avila- Costa MR, Colín-Barenque L, Montiel Flores E, Aley-Medina P, Gutierrez Valdez AL, Ordoñez Librado JL, Flores Martínez EA, Anaya Martínez V, Mussali Galante P, Fortoul TI. (2005^b). Bromocriptine treatment in a murine Parkinson's model: Ultraestructural evaluation alter dopaminergic deafferentation. *J Neuroscience.* 115:851-859.
- Bahena-Trujillo, R; Flores, G; Arias-Montaña, J.A. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Biomed.* 11:39-60.
- Barbeau. (1981). High-level levodopa therapy in severely akinetic parkinsonian patients twelve years later. En: *Parkinson's disease: current progress, problems and management.* Rinne, V.K; Klinger, M;Stamm, G. (eds.) Elsevier, Amsterdam.229-239.
- Barnham K J., Másters C L., and Bush A I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews* 3, 205-214.
- Bartholini, G; Stadler, H; Gadea-Ciria, M y Lloyd, K.G. (1976). *Neuropharmacology* 15:515-519. En: Sandler, M; Feuerstein, C. y Scatton, B. (eds.). *Neurotransmitter interactions in the basal ganglia.* Raven Press. N.Y.
- Beker, A. B y Jont RJ. (1990). Extrapiramidal disease. En: *Clinical Neurology.* Vol 3. Chap. 38:1-67. Harper and Row.
- Bertarbet Ranjita., Sherer Todd B., MacKenzire Gillian., Garcia-Osuna Monica., Panov Alexander V. and Greenamyre J. Timothy. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature neuroscience,* 3 (12): 1301-1306
- Bertarbet Ranjita., Sherer Todd B. and Greenamyre J. Timothy. (2002). Animal models of Parkinson's disease. *BioEssays* 24: 308-318.
- Biagio Mercuri Nicola and Bernardi Giorgio. (2005). The „magic“ of L-DOPA: why is it the gold standard Parkinson's disease therapy? *TRENDS in Pharmacological Sciences* 26 (7): 341-344.
- Blanchet P., Boucher R., Bedard PJ. (1994). Excitotoxic lateral pallidotomy does not relieve L-DOPA-induced dyskinesia in MPTP parkinsonian monkey. *Brain Res,* 650:32-39.
- Blanchet P.J (1999). Rationale for use of dopamine agonists in Parkinson's disease: Review of ergot derivatives. *Can J Neurol Sci,* 26: S21-S26.
- Blum D., S. Torch N., Lambeng M., Nissou A. L., Benabid R., Sadoul y Verna J.M. (2001) Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 65: 135-172.
- Blunt, S.B; Jenner, P. and Marsden, C.D. (1993). Supressive effect of L-DOPA on dopamine cells remaining in the ventral tegmental area or rats previously exposed to the neurotoxin 6-hidroxydopamine. *Mov Disord.* 8: 129-133.

- Bolam J. P., Hanley J. J., Booth P. A. C. and Bevan M. D. (2000). Synaptic organisation of the basal ganglia. *J. Anat.* 196:527-542,
- Bondy, S. C., Lahiri, D.K., Perreau, V. M., Sharman, K. Z., Campbell, A. and Sharmana E. H. (2004). Retardation of Brain Aging by Chronic Treatment with Melatonin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1035: 197–215
- Bondy Stephen C., Sharman Edward H. (2007). Melatonin and the aging brain. *Neurochemistry International* 50: 571–580.
- Boutin, Jean A., Audinot, Valérie., Ferry, Gilles., and Delagrangé. Philippe. (2005). Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends in Pharmacological Sciences.* 26 (8): 412-419.
- Briones, L., Suh, E., Jozsa, L., Hattar, H., Chai, J., Wadowska M.(2004). Behaviorally-induced ultrastructural plasticity in the hippocampal region after cerebral ischemia. *Brain Research.* 997: 137– 146
- Brusco LI, Marquez M, Cardinali DP. (1998). Monozygotic twins with Alzheimer's disease treated with melatonin: Case report. *J Pineal Res.* 25: 260–3. IN: Reither, R.J., Tan, D., Mayo, J.C., Sainz, R.M., León, J. and Czarnocki, Z. (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanism and pathophysiological implications in human. *Acta biochemica Polonica.* 50 (4): 1129-1146.
- Cadet J.L. y Brannock C. (1998) Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochemistry international.* 32: 117-131.
- Calabresi, P; Mercuri, N.B; Sancesario, G. And Bernardi, G. (1993). Electrophysiology of dopamine-denervated striatal neurons. Implications for Parkinson's disease. *Brain.* 116, 433-452.
- Calon F., Goulet M., Blanchet P. J., Martel J. C., Piercey M. F., Bédard P. J. and Di Paolo T. (1995) Levodopa or D2 agonist induced dyskinesia in MPTP monkeys: correlation with changes in dopamine and GABAA receptors in the striatopallidal complex. *Brain Res.* 680, 43–52.
- Calon F., Rajput Ali H., Hornykiewicz O., Bédard J P., and Di Paola T., (2003). Levodopa-induced motor complications are associated with alterations of glutamate receptors in Parkinson's disease *Neurobiology of Disease* 14: 404–416.
- Calverley R.S.K. and Jones D.G.A. (1987). Serial-section study of perforated synapses in rat neocortex. *Cell Tissue Research.* 247:565-572. En Avila-Costa MR, Colín-Barenque L, Aley-Medina P, Valdez AL, Librado JL, Martinez EF, Fortoul TI. (2005). Bilateral increase of perforated synapses after unilateral dopamine depletion. *Int J Neurosci.* 115(1):79-86
- Calverley, R.K. and Jones D.G. (1990). Contributions of dendritic spines and perforated synapses to synaptic plasticity. *Brain Res Rev* 15:215-249. En: Anglade, P; Mouatt-Prigent, A. and Agid, Y. (1996). Synaptic plasticity in the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease. *Neurodegeneration* 5:121-128.
- Campos- Rufo M. 2002. Melatonina y epilepsia. *Rev neurol* 2002; 35 (Supl 1): S51-S58
- Cardoso, S.M., Moreira, P.I., Agostinho P., Pereira C. and Oliveira C.R. (2005). Neurodegenerative Pathways in Parkinson's disease: Therapeutic Strategies. *CNS & Neurological Disorders.* 4:405-419.
- Carpenter, M.B. (1976). Anatomical organization of the corpus striatum and related nuclei. En Melvin, D y Yahr, M.D (eds). *The basal ganglia.* Raven Press, N.Y.

- Carpenter, B.M. (1981).Anatomy of the corpus striatum and brain stem integrating system. En: Brooks, V. (eds).Hand book of Physiology: The nervous systems, motor control. American Physiological society, Bethesda, M.D.
- Cavazos, J.E; Golarai, G. and Sutulo, T.P. (1991). Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development progression and permanence J. Neurosci, 11:279-2803.
- Cepeda, C and Levine, M. (1998) Dopamine and N-methyl –D-aspartate receptor interactions in the neostriatum. Dev. Neurosci.20: 1-18.
- Chan Phylinda L. S., Nutt John G., and Holford Nicholas H. G. (2005). Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Changes During the First Four Years of Levodopa Treatment in Parkinson's Disease. Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Vol. 32, Nos. 3–4:459-484.
- Chandan k. sen, Savita khanna, and Sashwati roy. (2004). Tocotrienol The Natural Vitamin E to Defend the Nervous System? Ann. N.Y. Acad. Sci. 1031: 127–142
- Cochiolo Jeffrey A., Ehsanian Reza, and Bruck David K. (2000). Acute Ultrastructural Effects of MPTP on the Nigrostriatal Pathway of the C57BL/6 Adult Mouse: Evidence of Compensatory Plasticity in Nigrostriatal Neurons. Journal of Neuroscience Research 59:126–135.
- Colín-Barenque L. (1994). Estudio Morfológico del núcleo caudado del ser humano normal y con enfermedad de Parkinson: Un estudio con el método de Golgi y microscopía electrónica. Tesis para obtener el grado de de Maestría en Neurociencias. ENEP Iztacala UNAM.
- Coté, L. Y Crutcher, M.D. (1991). Motor functions of the basal ganglia and diseases of transmitter metabolism. En: Kandel, E.R. Schwartz, J.H. y Jessell,T.M. (eds). Principles of neural science. Elsevier, U.S.A.
- Cruz, R., Almaguer-Melian, W. and Bergado-Rosado J.A. (2003). El glutatión en la función cognitiva y la neurodegeneración. Rev Neurol 36 (9): 877-886
- Dabbeni-Sala, F., Di santo, S., Chini, D., Skaper. S D. and Giusti. P. (2001). Melatonin protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity in rats: a role for mitochondrial complex I activity. The FASEB Journa. 15: 164-170.
- Davies, J. Y Dray, A. (1976). Substance P in substantia nigra. Brain Res. 107:623-627.
- Dawson T.M. and Dawson V. L. (2003). Molecular Pathways of Neurodegeneration in Parkinson's Disease. Science. 302 (31); 819-822.
- DeLong, M.R. and Georgopoulos, A.P. (1981). Motor Functions of the basal ganglia. En: Brookhard, J: Mounscatle, V.B; Brooks, V.B. y Geiger, S.R. (eds) Mandbook of physiology. American Phsyssiological Society.
- Demier P; Hirsch E:C; Agid Y; Graibel A:M, (1999). Discinesias inducidas por dosis pico de L-dopa en pacientes con enfermedad de Parkinson: una aproximación clínico farmacológico. Brain. 1437-1448
- Dewar, D; Jenner, P. y Marsden, C. (1987). Effects of opioid agonista drugs on the in vitro release of [³H] GABA [³H] Dopamine and [³H]5-Htfrom sclice of rat globus pallidus Biochem, Pharmacol. 36: 1738-1741.
- Di Chiara, G y Morelli, M. (1993). Dopamine-Acetilcoline-Glutamate interactions in the striatum. A Working hypothesis. En: Narabayashi, H; Nagatsu, t; Yanagisawa, N. Y Mizuno, Y. (eds.). Advances in Neurology. Vol. 60. Raven Press, N.Y.
- Di Chiara, G; Morelli, M and Consolo, S. (1994). Modulatory function of neurotransmitters in the striatum: Ach/dopamine/NMDA interactions. TINS, 17(6).

- DiFiglia, M; Aroni, N y Martín, J.B. (1982). Light and electron microscopic localization of immunoreactive Leu-enkefalin in the monkey basal ganglia. *Neurosci.* 5:1581-1596.
- Díaz-Corrales F J., Asanuma M., Miyazaki I., and Ogawa N. (2004). Rotenone induces disassembly of the Golgi apparatus in the rat dopaminergic neuroblastoma B65 cell line. *Neuroscience Letters* 354; 59–63.
- Díaz Martínez A., Pascual Gómez J. y Pazos Carro A. (1998). Terapéutica farmacológica de los movimientos anormales. *Medicine* 7(103): 4809-4822.
- DiMauro S. (1993) Mitochondrial involvement in Parkinson's disease : The controversy continues. *Neurology* 43: 2170-2172.
- Dowd E and Dunnett S. B. (2005). Comparison of 6-hydroxydopamine-induced medial forebrain bundle and nigrostriatal terminal lesions in a lateralised nose-poking task in rats. *Behavioural Brain Research* 159: 153–161.
- Duvoisin, R.C. (1987). To Treat Early or to Treat Late?. *Ann. Neurol.* 22: 2-3. En Otero-Siliceo. 1996. Fondo de Cultura Económica. México. pp 25-32.
- Ebadi Manuchair., Srinivasan Shashi k. and Baxi Mayur D.(1996). Oxidative tress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 48; I-19.
- Elizan, T.S y Casals J. (1983). The viral hypotesis in Parkinsons. *J. Neurol Transm Suppl* 19: 75-88. En Otero-Siliceo. 1996. Fondo de Cultura Económica. México; 25-32.
- Emborg Marina E. (2004). Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. *Journal of Neuroscience Methods* 139; 121–143
- Enochs W. S., Sarna T., Zecca L., Riley P.A. y Swartz H.M. (1994). The roles of neuromelanin, binding of metal ions , and oxidative cytotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease: a hypothesis. *J. Neural. Transm.* 7: 83-100
- Factor S.A., Sanchez-Ramos J.R. and Weiner W.J. (1990). Vitamin E therapy in Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* 53, 457-461. En: Ebadi manuchair., Srinivasan Shashi k. and Baxi Mayur D.(1996). Oxidative tress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* Vol. 48; I-19.
- Feng Zheng., Qin Chuan., Chang Yang., and Jun-tian Zhang. (2006). Early melatonin supplementation alleviates oxidative stress in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Free Radical Biology & Medicine* 40; 101-109.
- Fahn S., Oakes D., Shoulson I., Kiebertz K., Rudolph A., Lang A. *et al.*(2004). Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med*; 351: 2498-508.
- Ferrer-Viant, D., Jorge-Fonseca C., Cutido-Clavel L, García-Rodríguez E. y Arce-Gómez L. (1999). Radicales libres y su papel en la homeostasis neuronal. *MEDISAN* 3(3):5-11
- Fariss Marc W., Zhang Jin-Gang. (2003) Vitamin E therapy in Parkinson's disease. *Toxicology* 189:129-146
- Ferrario, J.E; Delfina, M. A; Stefano, A.V., Zbarsky, V., Douhou, A., Murer, M.G., Raciman-Vozari, R. and Gershanik, O.S. (2003). Effects of orally administered levodopa on mesencephalic neurons undergoing a degenerative process. *Neuroscience Research*. I-6.
- 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.
- Flint Beal M. (2001). Experimental Models of Parkinson's Disease. *Nature reviews*. 2:3252-332.

- Flores Martines E.A (2005). Diferencia entre genero de un modelo de Parkinson en rata provocado por 6-OHDA. Tesis para obtener el grado de de Maestría en ciencias biológicas. ENEP Iztacala UNAM.
- Fox, C.A; Andrade. A:N; Schwyn, R:C and Rafols, S.J.A. (1971). Computer measurements of axis cylinder diameters of radial fibers and "com" bundle fibers. *Comp. Neurol.* 159:201-224.
- Fox, C.A; Rafols, J:A; Cowan,W.M. (1975). Computer measurements of axis cylinder diameters of radial fibers and "comb" bundle fibers. *Comp. Neurol.* 159; 201-224.
- Freud, T.F; Powel, J.F. and Smith, A.D. (1984). Tيروسine hydrosylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience* 13:1189-1215. En: Ingham, C.A; Hood, S.D; Taggart and Aarbutthnott, G.H. (1998). Plasticity of synapse in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathways. *Journal of Neuroscience.* 18(12):4732-4743
- García-Martínez J.C. (2003) La enfermedad de Parkinson vista por un afectado *Rev. Neurol.* 7(4):391-400.
- García-Minet, R.; Alberti-Amador, E. and Castellano-Ortega, M.R. (2003). Terapia génica *ex vivo* en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. *Neurol.* 36(11): 1073-1077.
- García Ramírez M. (2001). Efecto de la lesión dopaminérgica nigro-estriatal y de la L-DOPA sobre los receptores D2 en el globo pálido externo y los receptores D1 en la sustancia negra reticulada de la rata. Tesis para obtener el grado Maestro en Ciencias. CINVESTAV
- Geinisman Y., Morrell F2 and Toledo-Morrell L. (1987). Axospinous synapses with segmented postsynaptic densities" a morphologically distinct synaptic subtype contributing to the number of profiles of 'perforated' synapses visualized in random sections. *Brain Research,* 423: 179-188.
- Gerfen y Young, W.S. (1988). Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix comportaments: An in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain. Res* 460:161-167.
- Gerfen, C.R. (1992). D₁ and D₂ dopamine receptor regulation of striatonigral and striatopallidal neurons, seminars in *The Neurosciences.* 4(2): 109-119.
- Gerlach M. y Rieder PF. (1999). Time secuencias of dopaminergic cell death in Parkinson's disease. Indication for neuroprotective studies. *Advances in Neurology.* 80:219-225.
- Gibb, W.R.C. y Lees, A.J. (1991). Anatomy, pigmentation ventral and dorsal soboculation of the substation nigra, and differential cell death in Parkinson's disease. *J Neurol. Neurosurg Psych.* 54, 388-396.
- Gilmans y Winans, N.S. (1994). Principios de neuroanatomía y neurofisiología clínica de Monter y Gatz. *El manual moderno.* 3^a Edición. México. D.F. pág 183-192.
- Giménez-Roldán, S. y García-Muñozguren S. (2002). Uso de apomorfina en la enfermedad de Parkinson. *Rev Neurol.* 35 (7): 668-674.
- Giroud Benítez .JL (2004). Enfermedad de Parkinson de inicio temprano. *Rev Neurol.* 38 (07); 637
- Glinka, Y., Tipton, K.F. and Youdim, M.B.H. (1998). Mechanism of inhibition of mitochondrial respiratory complex 1 by 6-hydroxydopamine and its prevention by desferrioxamine. *Eur. J. Pharmacol.* 35: 121-129.

- Góngora-Alfaro José L., Moo-Puc, Rosa E., Villanueva Toledo, Jairo., Arankowsky-Sandoval, Gloria., Álvarez-Cervera, Fernando., Pineda-Cortés Juan C., Heredia-López, Francisco J. and Bata-García José L. (2005). La cafeína y los antagonistas de los receptores A2A de la adenosina como posibles adyuvantes de la terapia anticolinérgica en la enfermedad de Parkinson. *Rev Biomed*; 16:99-111.
- Galpern W.R. and Cudkowicz M.E. (2007). Coenzyme Q treatment of neurodegenerative diseases of aging. *Mitochondrion* 7S: S146–S153
- González-Fraguela, M.E., Castellano-Benítez, O. y González-Hoyuela M. (1999). Estrés oxidativo en las neurodegeneraciones. *Rev Neurol* 1999; 28 (5): 504-511
- Graybiel, A.M. (1990). The basal ganglia and the initiation of movement. *Res. Neurol.* 146(10):570-574.
- Gravenland, G; Williams, R:S. and DiFiglia, M. (1985). A Golgi estudio of de human neostriatum neuronds and afferent fibers. *J.Comp. Neurol.* 234: 317-333
- Guerrero-Díaz M.^a Teres., Macías-Montero M.^a Cruz., Prado-Esteban Florentino., Muñoz-Pascual Angélica., Hernández-Jiménez M.^a Victoria y García-Luis Jacinto Duarte. (2006). Enfermedad de Parkinson. Capitulo 49.507-517. En: Tratado de geriatría para residentes. Sociedad Española De Geratría Y Gerontología. Coordinación editorial: International Marketing & Communication, S.A. Madrid España. ISBN: 84-689-8949-5.
- Gutiérrez V.A. (2004). Efecto de la L-DOPA en el estriado y Sustancia nigra de rata lesionada con 6-OHDA: Modelo animal de la enfermedad de Parkinson. Tesis para obtener el grado de Biólogo. ENEP-Iztacala .UNAM.
- Hamdi Anwar. (1998). Melatonin administration increases the affinity of D2 dopamine receptors in the rat striatum. *Life Sciences* (63):23; 2115-2120.
- Hardeland, R. and Pandi-Perumal, S.R. (2005) Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: Actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutrition & Metabolism* 2:22, 1-15.
- Hardeland, R., Pandi-Perumal, S.R.and Cardinali D. P. (2006). Melatonin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38: 313–316
- Harms, Christoph., Iautenschlager, Marion., Bergk, Alexandra., Freyer Dorette., Weih, Markus., Dirnagl, Ulrich., Weber, Joerg R. and Hortnagl, Heide. (2000). Melatonin is protective in necrotic but not in caspasedependent, free radical-independent apoptotic neuronal cell death in primary neuronal cultures. *FASEB J.* 14, 1814–1824
- Henzea, Carmen., Earla Christopher., Sauttera Jurgen., Schmidt Nicole, Themannb Claudia., Hartmann Andreas., Oertel Wolfgang H. (2005). Reactive oxidative and nitrogen species in the nigrostriatal system following striatal 6-hydroxydopamine lesion in rats. *Brain Research* 1052: 97-104.
- Herrera-Marschitz, M; Christensson-Nylander, I; Sharp, T. Staines, W; Reid, M; Hokfeit, T; Terenjus, L. Y Ungersted, U. (1986). Striato-nigral dinorphins and substance P in the rat. *Exp. Brain Res* 64:193-207
- Hoehn, M.M. and Yahar, M.D. (1987). Parkinsonism onset, progresion and mortality. *Neurology*, 17, 427-442. En Otero-Siliceo. 1996. Parkinson enfoque al futuro. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Fondo de Cultura Económica. México. Cap: I.
- Iacovitty, L; Stull, N.D. and Johnston, K. (1997). Matonin rescues rescues dopamine neurons from cell death in tissue culture models of oxidative stress. *Brain Res* 768; 317-326.

- Itokawa-Kaori., Ohkuma-Aya., Araki Nobuo., Tamura Naotoshi. and Shimazu Kunio (2006). Effect of L-DOPA on nitric oxide production in striatum of freely mobile mice. *Neuroscience Letters*.402; 142-144
- Ingham, C.A., Hood, S.D., Taggart and Aarbutnnott, G.H. (1991). A light and electron microscopical study of enkephalin- immunoreactive structures in the rat neostriatum after removal of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *Neurosci.* 42(3).715-730.
- Ingham, C.A., Hood, S.D., Van Maldegem, B., Weenink, A., Arbuthnott. G. (1993). Morphological changes in the rat neostriatum after unilateral lesion of the dopaminergic nigrostriatal pathway, a morphological study. *Exp Brain Res*116:39-49. En Ingham, C.A; Hood, S.D., Taggart. and Aarbutnnott, G.H. (1998). Plasticity of synapse in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathways. *Journal of Neuroscience.* 18(12):4732-4743
- Ingham, C.A. and Hood, S.D., Taggart and Aarbutnnott, G.H. (1998). Plasticity of synapse in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathways. *The Journal of Neuroscience.* 18(12):4732-4743.
- Jaber, M., Dumartin, B.,Saund C., Harwook JK.,Reubert C., Giros B., Bloch B. Y Caro MG. (1999). Diferential regulation of tyrosine hydroxilase in the ganglia basal of mice lacking the dopamine transporter. *Eur. J. Neurosci.* 11:3488-3511.
- Jeffrey A. Cochiolo, Reza Ehsanian, and David K. Bruck (2000). Acute ultrastructural effects of MPTP on the nigrostriatal pathway of the adult mouse: evidence of compensatory plasticity in nigrostriatal neurons. *Journal of Neuroscience Research* 59:126–135
- Jenner, P. (1995). The rationale for the use of dopaminergic agonists in Parkinson's disease. *Neurology* 45 (Suppl 3): S6-S12
- Jiménez- Jiménez, F.J: Ortí-Pareja, J.A. y Molina-Arjona. (1998). Alteraciones mitocondriales en las enfermedades neurodegenerativas. *Revista de Neurología.* 26:112-117.
- Juri C, carlos y Chana C, Pedro (2006). Levodopa en la enfermedad de Parkinson: ¿Qué hemos aprendido? *Rev. méd. Chile* 134 (7): 893-901. ISSN 0034-9887.
- Kawaguchi, Y; Wilson, C.J. Augood, S.J. and Empson ,P.C. (1995). Striatal interneurons: chemical, psysiological and morphological characterization. *TINS* 18(12): 527-535.
- Khaldy–Hoda; Escames-Germaine; León –Josefa; Bikdaouene-Leila. and Acuña-Castroviejo (2003). Synergistic effects of melatonin and deprenyl against MPTP-induced mitochondrial damage and DA depletion. *Neurobiology of Aging* 24; 491-500
- Kerman-Memduh., Cirak-Bayram Ozguner- Fehmi M. Dagtekin-Ahmet., Sutcu-Recep., Altuntas Irfan and Delibas Namik (2005). Does melatonin protect or treat brain damage from traumatic oxidative stress? *Exp Brain Res*163: 406–410.
- Kearns, M.C y Gash, M.D. (1995). GDNF protects nigral dopamine neurons against 6-hydroxydopamine in vivo. *Brain Research* 672:104-111
- Kienzl, E; Jellinger, K; Stachelberger, H. And Linert, W. (1999). Iron as catalyst for oxidative stress in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Life Sciences.* 65(18/19) 1973-1976.
- Koleskinova EE. and SobrovskayaTV. (2003). Parkinson's disease: Mechanism of neuronal death. *Neurophysiology.* 35(1):54-66.
- Korczyn A.D., Brunt E.R., Larsen J.P., Nagy Z., Poewe W.H. and Ruggieri S. (1999) A 3-year randomized trial of ropinirole and bromocriptine in early Parkinson's disease. *Neurology.* 53: 364-370.

- Kundurovic Z. y Sofic E. (2006). The Effects of Exogenous Melatonin on the Morphology of Thyrocytes in Pinealectomized and Irradiated Rats. In: Eds. S.R. Pandi-Perumal, D.P. Cardinali .Melatonin: From Molecules to Therapy. Nova Science Publishers, Inc.
- Langston, J. W; Ballard, P.A y Tetrud, J.W. (1983). Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine analog synthesis. *Science* 219: 979-980. En Otero-Siliceo. (1996). Parkinson enfoque al futuro. Instituto Nacional de Neurología. Fondo de Cultura Económica. México pp 25-32.
- Le W. and Appel SH. (2004). Mutant genes responsible for Parkinso's disease. *Current opinion in Pharmacology*. 4:79-84.
- Leist M. and Nicotera P. (1999) Calcium and cell death. En: E.V. Koliastos y R.R. Ratan (eds) *Cell death and diseases of the nervous system*. Humana press, New Jersey pp. 69-91
- León F.L.I. (1996). Etiología de la enfermedad de Parkinson. En Otero-Siliceo. Parkinson, enfoque al futuro. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Fondo de Cultura Económica. México D.F. 25-34 p.
- León-Josefa., Acuña- Castroviejo Darío., Sainz Rm., Mayo JC., Tan Dun-Xian., and Reiter-Russel J. (2004). Melatonin and mitochondrial function. *Life Science* 75; 765-790.
- León-Josefa., Acuña- Castroviejo Darío., Escames-Germane., Tan Dun-Xian. and. Reiter-Russel J (2005). Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J. Pineal Res.* 38:1-9
- Levitt, M; Spector, S; Sjoerdsma, A. and Udenfriend, S. (1965). Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart. *J Pharmacol.* 23: 1493-1493-501. En: Bahena-Trujillo, R; Flores, G; Arias-Montaño, J.A. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Biomed.* 11:39-60.
- Linazasoro Gurutz (2005). New ideas on the origin of L-DOPA-induced dyskinesias: age, genes and neural plasticity. *TRENDS in Pharmacological Sciences*.26 (8): 391-397.
- Lotharius J, Dugan LL, O'Malley KL. (1999). Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *The Journal of Neuroscience*. 19(4):1284-1293.
- Lotharius Julie and Brundin Patrik. (2002). Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein *Nature Publishing Group* 3:932-942.
- Luo Yongquan and Roth Georges (2000). The roles of dopamine oxidative stress and dopamine receptors signaling in aging and age-related neurodegeneration. *Antioxidants y redox signaling*. 2(3); 449-460
- Luquin, MR; Saldise, L. (1997). Sistema dopaminérgico y muerte neuronal. *Rev Neurol*; 25:S129-40.
- Machado F.M., Bellissimo, M:I., Anselmo-Franci, J., Mendes Angellucci M:E., Canteras N:S. and Cunhaa C:D. (2005). Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations. *Journal of Neuroscience Methods* 148; 78-87
- McMillan Catherine R., Sharma, Rohita; Ottenhof Tom; Niles, Lennard P. (2007). Modulation of tyrosine hydroxylase expression by melatonin in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neuroscience Letters* (2007), doi:10.1016/j.neulet.2007.04.029
- Maharaj, S., Maharaj, H., Daya, S. and Glass, D. (2006). Melatonin and 6-hydroxymelatonin protect against iron-induced neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry*. 96: 78-81

- Maharaj Himant., Maharaj, Deepa Sukhdev., Scheepers, Mark., Mokokong, Ruth. and Daya Santy. (2005^b) L-DOPA administration enhances 6-hydroxydopamine generation. *Brain Research* 1063:180-186
- Maratos, E.C., Jackson, M.J., Pearce, R., Cannizarro, C. and Jenner, P (2003). Both short-and long acting D1/D2 dopamine agonist induce less dyskinesia than L-DOPA in the MPTP lesioned common marmoset. *Experimental Neurology*. 179:90-102.
- Marc W. Fariss, Jin-Gang Zhang (2003). Vitamin E therapy in Parkinson's disease *Toxicology* 189: 129-146.
- Martínez-Cruz, F., Osuna, C. and Guerrero JM. (2006). Mitochondrial damage induced by fetal hyperphenylalaninemia in the rat brain and liver: Its prevention by melatonin, Vitamin E, and Vitamin C. *Neuroscience Letters* 392: 1–4
- Martínez, Díaz A., Gómez -Pascual J.,y Carro Pazos A. (1998). Terapéutica farmacológica de los movimientos anormales. *Medicine*. 7 (103): 4809-4822.
- Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Rodriquez C. (2002) Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci.*; 59: 1706–13.
- Mensah.P.L. (1980). Distribution of the largest neurons in mouse caudate-putamen nucleus: Its positions in large cell-medium cell clusters. *Exp. Brain Res*. 3: 267-271.
- Meshul, C.K., Emre, N., Nakamura, C.M., Allen, C., Donohue, M.C., and Buckman, J.F. (1999). Time dependent changes in striatal glutamate synapses following a 6-hydroxydopamine lesion. *Neuroscience*. 88 (1):1-16.
- Meshul, C.K. Cogen, J.P; Cheng, H.W; Moree, C; Krentz, L. and McNeill, T.H. (2000). Alterations in rat striatal glutamate synapses following a lesion of the cortico- and/o nigrostriatal pathway. *Experimental Neurology*. 65:191-206.
- Michel P.P and Hefti, F. (1990). Toxicity of 6-hydroxydopamine and levodopa for dopaminergic neurons in vitro. *J Neurosci Res*. 26: 428-435.
- Miller, R. Y Beninger, R.J. (1991). On the interpretation of as asymmetries of posture and locomotion produced with dopamine agonista in animals with unilateral depletion of striatal dopamine. *Progress in Neurobiology*. 36: 229-256.
- Mínguez-Castellanos A., Escamilla-Sevilla F. (2005^a). Terapia celular y otras estrategias neuroregenerativas en la enfermedad de Parkinson (I). *Rev Neurol*. 41 (10): 604-614.
- Mínguez-Castellanos A., Escamilla-Sevilla F. (2005^b). Terapia celular y otras estrategias neuroregenerativas en la enfermedad de Parkinson (II). *Rev Neurol REV NEUROL*. 41 (11): 684-693.
- Missale, C; Nash, R.S, Robinson, W.S, Jaber, M. and Caron, G.M.(1998). Dopamine receptors: From structure to function. *Physiological Reviews*.78(1): 189-225.
- Moller M and Baeres FM. (2002). The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res*. 309:139-150.
- Molina J.A., Jimenez-jimenez F.J., Ortí-Pareja. (1999). Complicaciones motoras y psicicas en el tratamiento prolongado con levodopa de la enfermedad de parkinson complicada. *Rev. Neurol*. 28(10): 982-990
- Molloy S, Rowan E N, O'Brien J T McKeith, I G, Wesnes K and D J Burn (2006). The effect of levodopa on cognitive function in Parkinson's disease with and without dementia and dementia with Lewy bodies. *J. Neurol. Neurosurg*.

- Monville Christelle., Torres Eduardo M. and Dunnett Stephen B. (2005). Validation of the L-DOPA-induced dyskinesia in the 6-OHDA model and evaluation of the effects of selective dopamine receptor agonists and antagonists. *Brain Research Bulletin* 68: 16–23.
- Moore, Darren J., West, Andrew B., Dawson, Valina L., and Dawson, Ted M. (2005). *Molecular Pathophysiology of Parkinson's Disease*. Advance on January 25:57-87.
- Mouradian MM. (2002) Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology*. 58:179-184.
- Muriel MP, Agid Y, Hirsch E. (2001). Plasticity of afferent fibers to striatal neurons bearing D1 dopamine receptors in Parkinson's disease. *Mov Disord*. May;16(3):435-41
- Nagatsu, T; Levitt, M and Udenfriend, S. (1964). Tyrosine hidroxilase: the initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem*. 239:2910-17. En: Bahena-Trujillo, R; Flores, G; Arias-Montaño, J.A. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Biomed*. 11:39-60.
- Nam, Eunjoo., Min Lee, Seung, Eun Koh, Seong., Seok Joo, Wan., Maeng Sungho., In Im, Heh. and Sik Kim Yong. (2005). Melatonin protects against neuronal damage induced by 3-nitropropionic acid in rat striatum. *Brain Research* 1046: 90-96.
- Nombela-Merchan, F; Tormo-Ortiz. I y Galán Gutiérrez, T. (2002). Tratamiento farmacológico de la enfermedad de Parkinson. *Revista de la Sociedad Madrileña de Medicina de Familia y comunitaria*. 1(4): 38-42.
- Nomoto-Másahiro and Nagai-Másahiro. (2006). Pharmacological consideration of the symptoms resistant to dopaminergic therapy. *Parkinsonism & Related Disorders*, 12(2): S83-S87
- Obeso JA., Olanow CW., Nut Jg. (2000^a). Basal ganglia, Parkinson's disease and levodopa therapy. *Trends neurosci*. 23 (suppl 10): 1s-126S.
- Obeso, Jose A., Olanow Warren C., and Nutt John G. (2000^b). Levodopa motor complications in Parkinson's disease. *Trends Neurosci*. 23 (Suppl.), S2-S7.
- Obeso José A., Rodríguez-Oroz M. C., Zamarbide I. (2002). Area de Neurociencias. Clínica Universitaria y Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. Capítulo 6 de "Enfermedades Neurodegenerativas". Serie Científica Farmaindustria. Madrid España. [http://www.farmaindustria.es/farmaweb/7pb43811prod.nsf/662dd964667871b5c1256b0c005bcf99/7a77704086cbfa6bc1256bf4002dc58c/\\$FILE/cap_6.pdf](http://www.farmaindustria.es/farmaweb/7pb43811prod.nsf/662dd964667871b5c1256b0c005bcf99/7a77704086cbfa6bc1256bf4002dc58c/$FILE/cap_6.pdf)
- Olanow, C.W and Tatton, W.G. (1999). Etiology and Pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurosci*. 22:123-144.
- Ordóñez-Librado J.L. (2004). Comparación del efecto de la taurina y la bromocriptina en la ultraestructura del núcleo caudado de rata después de la lesión unilateral con 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Tesis para obtener el grado de Biologo. ENEP-Iztacala .UNAM.
- Otero-Siliceo E., Abascal-Arias M.R., Alanís-Quiroga M., et. al. (1996) Parkinson enfoque al futuro. Fondo de Cultura Económica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.
- Oviedo NJ. Y Camejo MI. (2001). La Elatonina ¿Un posible agente teraspeùtico? *Interciencia Venezuela*. 26(003):103-107.
- Paisán-Ruiz., Sáenz A., López de Munain A., Martí I., Martínez Gil A., Martí-Fasso JF and Perez-Tur J (2005). Familial Parkinson's disease: Clinical and genetic análisis of four basque families. *Ann. Neurol*. 57: 365-372.
- Parent, A. (1990). Extrinsic connections of the basal ganglia, *TINS*. 13,7: 254-258.

- Parent, A. and Hazrati, L.N. (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortical-basal ganglia-thalamo-cortical loops. *Brain Res. Rev.* 20:91-127.
- Pastor P. y Tolosa E. (2001) La enfermedad de Parkinson: diagnóstico y avances en el conocimiento de la etiología y en el tratamiento. *Medicina Integral* 37 (3): 104-117.
- Paxinos, G y Watson C. (1986). *The rat brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd edn. Academic Press, New York.
- Perkin, G. (2004). *An atlas of Parkinson's disease and related disorders (The encyclopedia of visual medicine series)*. The Parthenon Publishing Group Inc. New York USA.
- Picconi B, Centonze D, Rossi S, Bernardi G, Calabresi P.(2004). Therapeutic doses of L-dopa reverse hypersensitivity of corticostriatal D2-dopamine receptors and glutamatergic overactivity in experimental parkinsonism. *Brain*.127(Pt 7):1661-1669.
- Pickel, V.M; Chan, J. and Sesack, S.R. (1992). Cellular basis for interactions between catecholaminergic afferents and neurons containing leu –enkephalin-like, immunoreactivity in rat caudate-putamen nuclei. *Journal of Neurosci. Res.* 31: 212-230.
- Piñol-Ripoll-, G., Fuentes-Broto, L., Millán-Plano S., Reyes-González M., Mauri J.A., Martínez-Ballarín E., Reiter R.J. and García J.J. (2006). Protective effect of melatonin and pinoline on nitric oxide-induced lipid and protein peroxidation in rat brain homogenates. *Neuroscience Letters* 405: 89–93.
- Playford, E.D; Jenkins, I.H; Passingham , R.E; Nutt, J; Frackowiak, R.S. and Brooks, D.J. (1992). Impaired mesial frontal and putamen activation in Parkinson's disease: a positron emission tomography study. *Ann Neurol* 32:151-161. En: Bjarkam, C.R; Sorensen, J.C; Sundler, N.A; Geneser, F.A and Ostergaard, k. (2001). New strategies for the treatment of Parkinson's disease hold considerable promise for the management of neurodegenerative disorders. *Biogerontology*. 2: 193-307.
- Qin, Z.H; Chen,J.F. y Weiss,B. (1994). Lesions of mouse striatum induced by 6-hydroxidopamine differentially alter the density, rate of synthesis, and level of gene expression of D1 and D2 dopamine receptors. *J. Neurochem.* Raven Press, N.Y.. 411-420.
- Ramaker C., Van de Beeck J.T.W., Finken J.J.M. and Van Hilten J.J.B. (2000). The efficacy and safety of adjunct Bromocriptine therapy for levodopa-induced motor complications: A systemic review. *Movement Disorders*. 15 (1): 54-64.
- Radad- Khaled, Gille-Gabriele , Rausch-Wolf. (2005). Short review on dopamine agonists: insight into clinical and research studies relevant to Parkinson's disease. *Pharmacological Reports*. 57, 701-712.
- Reid, M.S; Herrera-Marschitz, M; Hökfelt, T; lindefors, N; Persson, H. Ungerstedt, U. (1990). Striato nigral GABA, dinorphin, substance P and neurokinin A modulation of nigrostriatal dopamine release: evidence for direct mechanisms. *Exp. Brain Res.* 82: 293-325.
- Reiter, R.J; (1991) Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Rev.* 12, 151-180
- Reiter, R; Tang, L; García, J. and Muñoz-Hoyos A. (1997). Pharmacological actions of melatonin in oxigen radical pathophysiology. *Life Sci.* 60: 2255-2271.
- Reiter R. J. (2000^a). Melatonin: Lowering the high price of free radicals. *News Physiol. Sci.* 15: 246-250.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Acuña-Castroviejo, D., Burkhardt, S. and Karbownik, M. (2000^b). Melatonin: mechanism and actions as an antioxidants. *Curr Top Biophys* 24: 171-183.

- Reiter, R.J., Tan, D., Mayo, J.C., Sainz, R.M., León, J. and Czarnocki, Z. (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanism and pathophysiological implications in human. *Acta biochemica Polonica*. 50 (4): 1129-1146.
- Rodríguez, M.C; Obeso, J.A. and Olanow, C.W. (1998). Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: A target for neuroprotection. *Ann Neurol*. 44(1); 175-188.
- Rodríguez-Martínez, E., Camacho, A., Maldonado, P.D., Pedraza-Chaverri, J., Santamaría, D., Galván-Arzate, S. and Santamaría, A. (2000). Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain research* 858: 436-439.
- Samadi Pershia, Bédard Paul J. and Rouillard Claude (2006). Opioids and motor complications in Parkinson's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, Volume 27, Issue 10;512-517
- Savitt Joseph M., Dawson Valina L., and Ted M. Dawson (2006). Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *The Journal of Clinical Investigation* 116 (7): 1744-1754.
- Scatton, B. (1987). Excitatory amino acid and GABA influence on rat striatal transmission. En Sandler, M; Feuerstein, C. Y Scatton, B. (eds.) *Neurotransmitter interactions in the basal ganglia*. Raven Press; N.Y. p. 121-131.
- Segura T., Galindo, M.F., Rallo-Gutiérrez B., Ceña V., Jordán J. (2003). Dianas farmacológicas en las enfermedades neurodegenerativas. *Revisión en neurociencias*; editor J.V: Sánchez-Andrés. *Rev Neurol*; 36 (11): 1047-1057.
- Shimohama, S; Sawada, H; Kitamura, Y and Taniguachi, T. (2003). Disease model: Parkinson's disease. *Trends in Molecular Medicine*. 9(8):360-365
- Singh S., Ahmed R., Sagar R.K. & Krishana B. (2006). Neuroprotection of the nigrostriatal dopaminergic neurons by melatonin in hemiparkinsonium rat. *Indian J Med Res* 124: 419-426
- Smith, A.D; and Bolam, J.P. (1990). The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurons. *Tins*. 13(7): 259-265.
- Smith, Y; Bevan, M.D; Shink, E. and Bolam. J.P. (1998). Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience*. 86(2):353-387.
- Srinivasan v; Pandi-Perumal S;R; Cardinali D; Poeggeler B; Hardeland R. (2006). Melatonin in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Behavioral and Brain Functions*. 2:15.
- Soto-Otero, R., Méndez-Alvarez E., Hermida-Ameijeiras A., Muñoz-Patiño A.M., and Labandeira-García J.L. (2000). Autoxidation and neurotoxicity of 6-Hydroxidopamine in the presence of some antioxidants. Potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neurochem* 74:1605-1612
- Srinivasan J. and Schmidt Werner J. (2004) Behavioral and neurochemical effects of noradrenergic depletions with N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine in 6-hydroxydopamine-induced rat model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*, 151, Issues 1-2., 191-199.
- Stocchi, F. y Olanow, C.W. (2003). Neuroprotection in Parkinson's disease: Clinical trials. En Segura, T. Galindo, M.F; Rallo-Gutiérrez, B; Ceña, V. Y Jordán, J. (2003). Dianas farmacológicas en las enfermedades neurodegenerativas. *Neurol*. 36(11): 1047-1057.

- Taylor JL., Bishop C., and Walker P. (2005). Dopamine D1 and D2 receptor contributions to L-DOPA-induced dyskinesia in the dopamine-depleted rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 81: 887 – 893.

- Tirmenstein MA, Hu CX, Scicchitano MS, Narayanan PK, McFarland DC, Thomás HC, Schwartz LW. (2005). Effects of 6-hydroxydopamine on mitochondrial function and glutathione status in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Toxicol In Vitro*. 19(4):471-9

- Truong L, Allbutt H, Kassiou M, Henderson JM. (2006). Developing a preclinical model of Parkinson's disease: a study of behaviour in rats with graded 6-OHDA lesions. *Behavioural Brain Research*, Volume 169, Issue 1: 1-9

- Ungerstedt, U. (1968). 6-Hydroxydopamine induced degeneration of central monoaminergic neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 5; 107-110.

- Ungerstedt, U. and Arbuthnott, G.F. (1970). Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* 24:485-493

- Ungerstedt, U. (1971^a). Dipsia and Aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigrostriatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand. Sup.* 367, 95-121.

- Ungerstedt, U. (1971^b). Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed birotational behavior. *Acta Physiol. Scand. Sup.* 367, 49-93

- Vallone, D., Picetti, R. and Borrelli E. (2000). Structure and function of dopamine receptor. *Neuroscience and Biobehavior Reviews.* 24, 125-132.

- Vanecek Jiri (1998). Cellular Mechanisms of Melatonin Action. *Physiological Reviews.* 78 (3): 687-721.

- Venero, Jose A L. Absi, El-Hadi., Cano Josefina., and Machado Alberto. (2002). Melatonin induces tyrosine hydroxylase mRNA expression in the ventral mesencephalon but not in the hypothalamus. *J. Pineal Res.* 32:6-14

Vivancos-Matellano F. (2006). Ropinirol en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson: actualización. *Rev Neurol.* 42 (9): 542-548

- Voorn P., Roest, J. and Jroenewegen, H.J. (1987). Increase of enkephalin and decrease of substance P immunoreactivity in the dorsal and ventral striatum of the rat after midbrain 6-hydroxydopamine lesion. *Brain Res.* 412: 391-396

- Walkinshaw, G and Waters, C.M. (1995). Induction of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-DOPA, implications for the treatment of Parkinson's disease. *J Clin Invest.* 95, 2458-2464

- Wang H., Katz J., Dagostino P., and Soghomonian J.-J. (2007). unilateral 6-hydroxydopamine lesion of dopamine neurons and subchronic L-DOPA administration in the adult rat alters the expression of the vesicular GABA transporter in different subsets of striatal neurons and in the substantia nigra, pars reticulata. *Neuroscience* 145:727–737

- Weil Z.M., Hotchkiss A.K., Gatién M.L. (2006) Melatonin receptor (MT1) knockout mice display depression-like behaviors and deficits in sensorimotor gating. *Brain Research.* Volume 68, Issue 6: 425-429

- Wichmann, T. y DeLong, M.R. (1993). Pathophysiology of Parkinsonian motor abnormalities. Motor abnormalities. In: Narabayashi, H; Nagatsu, T; Yanagisawa, N. y Mizuno, Y. (Eds.). *Advances in Neurology*, Vol 60. Raven Press, Ltd. New York.

- Wilson, C.J. y Groves, P.M. (1980). Fine structure and synaptic connections of common spiny neuron of the rat neostriatum: A study employing intracellular injection of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 194: 599-615
- Wilson, J.C. (1998). The basal ganglia, In: Gordon M. Shepard (Ed). *The synaptic organization of the brain.* Fourth Edition. Oxford University Press. New York. pp;329-375.
- Willis Gregory L. (2005). The therapeutic effects of dopamine replacement therapy and its psychiatric side effects are mediated by pineal function. *Behavioural Brain Research* 160: 148–160
- Wolters, CH. E; Tissing, G, Bergmans. L.M. y Kuiper, M. (1995). Dopamine agonists in Parkinson's disease. *Neurology (Suppl 3):* S28-S34.
- Wooten, F.G; (1990). Biochemical basis for levodopa therapy. En: *Therapy of Parkinson's disease.* Koller, W.C; Paulson, G; Dekker, M. (eds) N.Y. an Basel. 161-167.
- Yamamoto-Noriko, R., Pierce Christopher, Soghomonian, and Jean-Jacques. (2006). Subchronic administration of L-DOPA to adult rats with a unilateral 6-hydroxydopamine lesion of dopamine neurons results in a sensitization of enhanced GABA release in the substantia nigra, pars reticulata. *Brain Research.* 1123 (1): 196-200
- Yap-Yann Wan., Matthew Whiteman., Cheung Nam Sang. (2006). Chlorinative stress: An under appreciated mediator of neurodegeneration? Article in press
- Zhang K., Tarazi F.I. Y Baldessarini R.J (2001). Nigrostriatal dopaminergic denervation enhances dopamine D4 receptor binding in rat caudate-putamen. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 69: 111-116.