

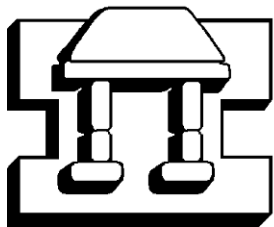


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EFEECTO DE LA MELATONINA Y LA L-DOPA EN RATAS
LESIONADAS CON 6-OHDA A DIFERENTES TIEMPOS

TESIS
PARA OBTENER EL TITULO DE
BIÓLOGO
PRESENTA:
RICARDO GARCÍA RUIZ



IZTACALA

Directora de Tesis: Dra. María Rosa Avila Costa

MÉXICO

2008

Para María

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Doctora María Rosa Avila Costa, por la oportunidad que me dio de ver la naturaleza desde más cerca en la búsqueda de respuestas en un espacio público como la UNAM. A su apoyo como al de los sinodales que revisaron este trabajo, los Doctores, Jaime Barral, Bertha Segura y los Maestros en Ciencias Alfonso Reyes y Jorge Gersenowies.

A las personas que laboran en el laboratorio de Neuromorfología de la FES, las Doctoras Verónica Anaya y Laura Colín, el Maestro Enrique Montiel, Ana, Jesús, Paty, Luisa, Ariadna, Julio Cesar, Fidencio, Armando, José Luís, Alicia, que me ayudaron a dar medicamento, a lavar las cajas de las ratas, con un comentario o con su amistad. A las personas del bioterio por el apoyo con las ratas y demás.

A mis padres María Ruiz y Luis García por su enorme apoyo y paciencia. A mis hermanos, Luis, Graciela, Armando, Mario, Gilberto y Gabriela de los que aprendo tanto. A mis sobrinos Fernando y Denise. A mi familia que hace posible que esté aquí y a la que debo todo.

A la familia García Contreras y Sánchez Contreras, por su ayuda y amistad. A todos los amigos de la carrera y del CCH o de afuera, de los que no acabo de mencionar, pero que han estado conmigo. Son muchos y siempre faltan pero cuenten a Ivan, Ariel, Hugo, Alfonso (donde esté el COBS), Rama, Alejandro (todo el "Zona Norte"), Felipe, Michaca, Fernando "el Tierno", Nashelly, Cesar "Ocho Venado garra de jaguar", Beto, Chechal, Moisés, Adrián, otro Alejandro, Gerardo Alberto, Francisco Cesar, el Hector "Agüifi" Hurtado y los "Zacatuches", Mónica, Verónica (la morenita), Carolina, Vania, Daniel "Denso", Ricardo "Caballo", el "Fa", Mario, Shanik, Seratna, Jorge "Chucky", Paty, el "Bebé", David, el "Poncho", Alfredo, el Hector "Sombras" y Salazar, Memo, Nestor, el "George", Nestor, Braulio, Diana, Carlos, África, América, Nancy, Ivonne, Maribel, Juanita, el profesor Nicolás, Alejandra, Ximena, Elda, Martín, Nely, Pedro, a don Chabelo y su familia de San Francisco, y a la gente de Santa Inés y como siempre no están todos los que son, pero si los que están.

Por último y no menos importante a los profesores que me han formado como estudiante, aunque no del todo ja. De los que cuento a Arcelia, María de los Ángeles, Ángel Lara, Luís Barbo, Martín, Hugo, Diego Arenas y ya estuvo. A Fungi y a Plantae. Gracias a las ratas, el fin de su "vida" servirá para algo importante. Gracias a todos.

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
2.1.	Los ganglios basales en el contexto del sistema motor	2
2.2.	Neuroanatomía funcional de los ganglios basales	4
2.3.	Enfermedad de Parkinson	9
2.3.1.	Etiología	11
2.3.2.	Patogenia	12
2.3.3.	Consideraciones anatómicas y funcionales	13
2.3.4.	Neuroquímica de la EP	16
2.4.	Modelos experimentales de la EP	18
2.4.1.	Modelo con 6-OHDA	18
2.4.2.	Modelo con MPTP	21
2.4.3.	Modelo con Reserpina	21
2.4.4.	Modelos con contaminantes ambientales	22
2.4.4.1.	Maneb	22
2.4.4.2.	Paraquat	22
2.4.5.	Modelos transgénicos	23
2.5.	Tratamientos	24
2.5.1.	Terapias de reemplazo	24
2.5.1.1.	Agonistas dopaminérgicos	26
2.5.2.	Antioxidantes	26
2.5.3.	Otros agentes farmacológicos	29
2.5.4.	Otras alternativas	32
2.5.5.	Terapia génica	33
3.	JUSTIFICACIÓN	33
4.	OBJETIVO GENERAL	33
4.1.	Objetivos particulares	34
5.	MATERIAL Y MÉTODOS	34
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
7.	CONCLUSIÓN	59
8.	LITERATURA CITADA	60
9.	APÉNDICE	86
9.1.	Perfusión intracardiaca vía aórtica	86
9.2.	Inmunocitoquímica anti-TH	87
9.2.1.	Gelatinización de portaobjetos	88
9.3.	Impregnación con nitrato de plata, método de Golgi	88

1. RESUMEN

Del estudio de los padecimientos de los ganglios basales como la enfermedad de Parkinson (EP) han surgido modelos animales experimentales como la lesión estereotáxica con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), una toxina selectiva de las neuronas catecolaminérgicas. En la EP, la deficiencia de dopamina, manifestada por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* compacta es tratada hoy en día por reemplazo farmacológico con L-Dopa. Esta terapia brinda efectos benéficos a corto plazo, sin embargo con el tiempo produce efectos nocivos. En el presente estudio nos propusimos comparar el efecto de la melatonina sola y en combinación con L-dopa sobre la conducta motora y la citología del cuerpo estriado y sustancia *nigra* después de 168 días de tratamiento en ratas Wistar hembras, lesionadas unilateralmente con 6-OHDA en el haz medial del cerebro anterior que se distribuyeron en cinco grupos de 6 organismos cada uno: Control (I); Lesión sin tratamiento (II); Lesión+L-Dopa (III); Lesión+L-Dopa/Melatonina (IV) y Lesión+Melatonina (V). El grupo III mostró mayor pérdida de espinas dendríticas que los demás grupos y beneficio conductual los primeros 42 días de tratamiento, decayendo posteriormente casi al nivel del grupo más afectado en la conducta y con menos neuronas inmunopositivas a tirosina hidroxilasa (II). El grupo IV mostró el mejor desempeño en las pruebas conductuales hasta el final del estudio, con excepción de los erguimientos en el campo abierto en el que el tratamiento solo con melatonina (V) fue más estable a niveles basales que la combinación terapéutica. El grupo V tuvo buen desempeño conductual comparado con el grupo II y III solo superado por el grupo V. Se encontró menor pérdida de espinas dendríticas y más neuronas inmunorreactivas a tirosina hidroxilasa en el grupo IV seguido del grupo V. Al parecer los procesos ocurridos entre los 56 y 84 días de tratamiento son claves en la definición del beneficio o perjuicio determinado para cada tratamiento. Nuestros resultados sugieren que la melatonina en combinación con L-Dopa puede ayudar a disminuir el daño citológico y conductual producido por la 6-OHDA después de 168 días de tratamiento oral de forma más efectiva que sin la combinación de ambas.

Palabras clave: Ganglios basales, enfermedad de Parkinson, Sustancia *nigra*, Melatonina, L-Dopa

2. INTRODUCCIÓN

El movimiento voluntario normal de una persona está regulado por zonas específicas del cerebro. Diversas observaciones clínicas a lo largo del tiempo sugieren que estructuras como los ganglios basales (GB) están implicadas en el control del movimiento y en la manifestación de sus trastornos (García-Rill, 1986). El estudio anatómico de estos ganglios ha incluido el análisis de la anatomía comparada de la organización segmental del Sistema Nervioso Central (SNC); de la embriología comparada de la organización transversal y longitudinal del tubo neural y del análisis genético de la embriogénesis cerebral (Swanson, 2000). Funcionalmente, estudia la actividad fisiológica que cada estructura ejerce sobre otra y de las relaciones entre ellas cuando no poseen desarrollo embriológico común o se encuentran espacialmente lejanas (Talos *et al.*, 2008).

2.1. Los ganglios basales en el contexto del sistema motor

En el SNC (el cerebro y la médula espinal) se agrupan en diferentes subsistemas como el sistema motor (SM). La organización de tales subsistemas se basa en el “conexionismo celular”, inspirado en las ideas de Wernicke, Sherrington y Cajal. La “Doctrina de la neurona” aún vigente, indica que la neurona es la unidad anatómica y funcional fundamental de señalización del SNC y cada neurona se distingue entre otras por sus procesos (dendritas y axón), de tal manera, por el “Principio de conectividad celular específica”, cada neurona está conectada con determinadas neuronas pero no con otras y éstas se organizan en grupos neuronales específicos formando entidades anatómicas como la corteza motora primaria, o algún núcleo subcortical. Cada entidad está implicada en la señalización específica para determinada función cerebral a través de las sinapsis en un proceso dependiente del potencial de acción, un mecanismo universal de transmisión unidireccional de señales (por el “Principio de polarización dinámica”, a través de un aparato emisor, uno receptor y uno de distribución) producto de la excitación de la membrana postsináptica inducida por ciertos neurotransmisores (Kandell *et al.*, 1997). El efecto fisiológico particular, ya sea la depolarización de la membrana postsináptica (excitación) o bien su hiperpolarización (inhibición), depende de las características químicas del neurotransmisor, su tipo de receptor y de la presencia de determinados iones y otras moléculas en la hendidura sináptica. El glutamato y el ácido gamma-amino butírico (GABA) son los neurotransmisores más comunes en el sistema nervioso y producen efectos generalmente excitatorio e inhibitorio respectivamente (Kandell *et al.*, 2000). Algunos receptores de neurotransmisores pueden expresarse como diferentes subtipos mostrando especificidad farmacológica a ligandos experimentales agonistas o antagonistas determinados. Un ejemplo de ello es el receptor de GABA tipo A (ionotrópico inhibitorio) y el tipo B (metabotrópico excitatorio). Se conoce que el receptor GABA_B interacciona con GABA dependiendo de la concentración

extracelular de iones de Ca^{2+} o Mg^{2+} (Bradford, 1988) a diferencia del receptor GABA_A que puede incrementar su afinidad por el GABA al activarse los receptores de benzodiazepinas acoplados a los receptores de GABA_A (Tenn y Niles, 1995).

Las rutas de comunicación neuronal se forman por las fibras o tractos de cada entidad anatómica, por ejemplo la ruta nigro-estriatal, se compone de fibras conocidas anatómicamente en conjunto como haz medial del cerebro anterior o “mfh” por sus siglas en inglés. Estas fibras se originan de somas de neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra* parte compacta (SNc) a nivel del mesencéfalo que se proyectan hacia el cuerpo estriado a nivel del telencéfalo, regulando su actividad través de la interacción de la dopamina (DA) liberada en sus terminales axónicas y sus receptores postsinápticos de las familias D_1 o D_2 . Por lo tanto una función particular como el movimiento voluntario se puede analizar funcionalmente por sus componentes (entidades) organizados en sistemas, en este caso el sistema motor, que forman rutas de señalización por vías de neurotransmisores específicos y sus receptores de determinado efecto fisiológico (Talos *et al.*, 2008).

Funcionalmente el sistema motor se separa en dos subsistemas: el sistema motor piramidal (SMP) y el sistema motor extrapiramidal (SME), el primero se relaciona con el movimiento voluntario y el segundo con la iniciación motora (Kandell *et al.*, 2000). Sin embargo algunas entidades simultáneamente participan en diferentes redes neuronales en ambos subsistemas, así, el SMP coincide en la corteza con el SME, por tal motivo la diferenciación resulta en ocasiones confusa. El SMP se compone de dos principales tipos de neuronas: Las neuronas motoras superiores (NMS) y las neuronas motoras inferiores (NMI). Las NMS son neuronas piramidales gigantes de la capa piramidal interna (V) de la corteza motora primaria en el giro precentral y la franja motora (Figura 1). Los somas de las NMI se localizan en el tallo cerebral a nivel del núcleo motor de los nervios craneales y en el asta anterior del cordón espinal (Talos *et al.*, 2008).

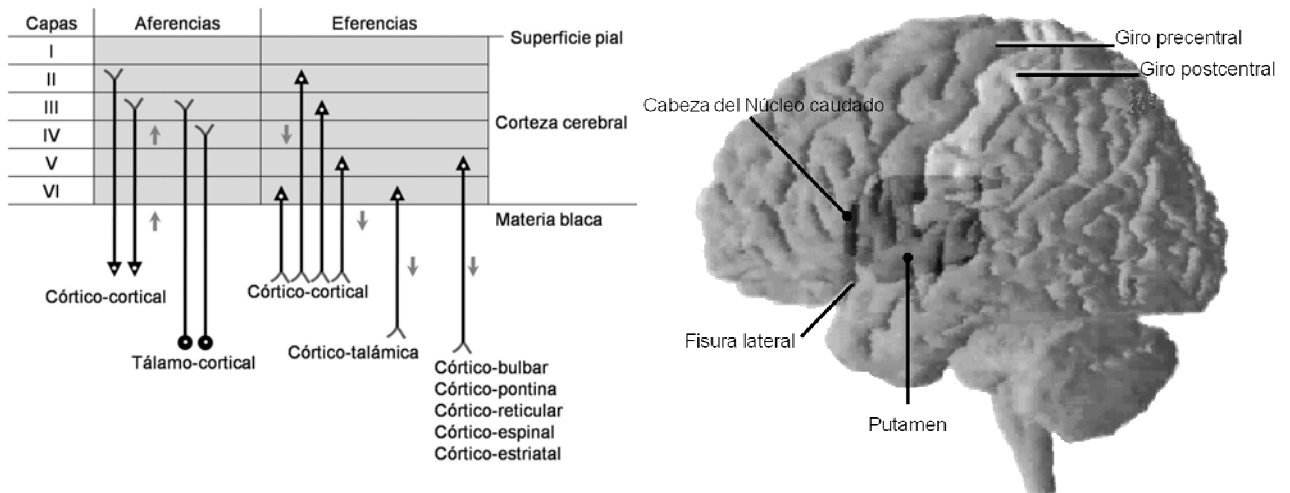
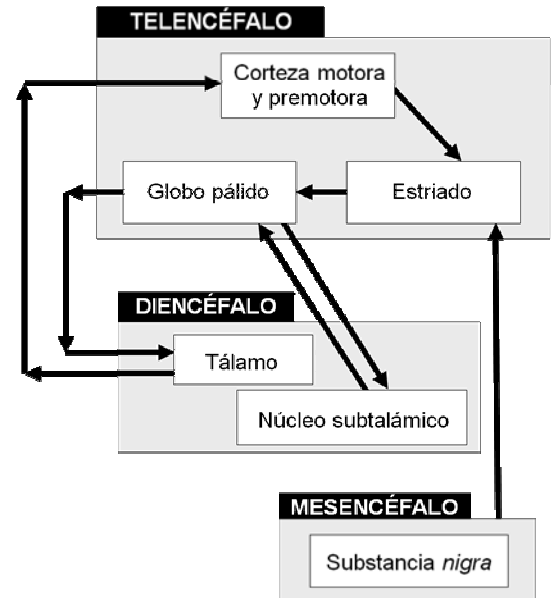


Figura 1. Representación esquemática de la organización citológica de la corteza mostrando las principales aferencias y eferencias y la capa en la cual se encuentran (Izquierda). Cerebro humano mostrando la corteza motora primaria en el giro precentral en la parte posterior del lóbulo frontal, limitado por el surco central, la fisura longitudinal y la fisura lateral. En la porción subcortical se aprecia el cuerpo estriado (círculos negros) integrado por el núcleo caudado y el putamen (Derecha). Modificado de Sundsten, 1994.

El SME (Figura 2) es un conjunto de circuitos paralelos de unión de estructuras subcorticales con la corteza motora. Sus principales componentes son el cuerpo estriado, el globo pálido (GP), el núcleo subtalámico (NST), el núcleo ventral anterior del tálamo y la sustancia *nigra* (SN) todos pertenecientes a la categoría anatomofuncional de los GB (Talos *et al.*, 2008).

Figura 2. Representación esquemática de algunas estructuras subcorticales relacionadas con el inicio del movimiento voluntario, funcionalmente conocido como Sistema Extrapiramidal. Estructuralmente, se ha determinado que el cuerpo estriado y el globo pálido forman parte del telencéfalo; el tálamo y el núcleo subtalámico del diencefalo y la sustancia *nigra* del cerebro medio. Modificado de Talos *et al.*, 2008.

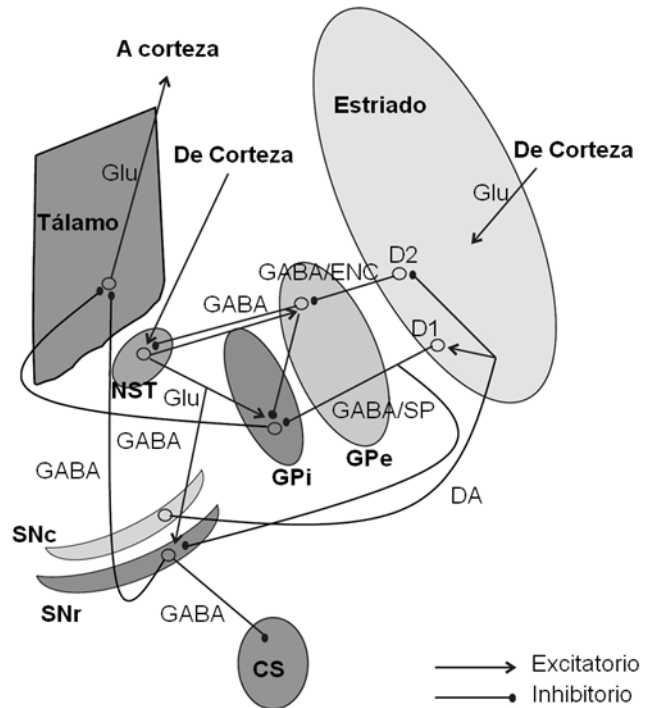


2.2. Neuroanatomía funcional de los ganglios basales

La mayoría de las clasificaciones coinciden en nombrar como parte de los GB, al globo pálido, la sustancia *nigra*, el cuerpo estriado y el núcleo subtalámico (NST). Se conoce que la parte interna del globo pálido (GPi) o núcleo entopeduncular en roedores y principalmente la porción reticulada de la sustancia *nigra* (SNr) actúan como dos núcleos de “salida” de señales. El NST y

principalmente el cuerpo estriado, como núcleos de “entrada” de los GB (Utter y Basso, 2008) (Figura 3).

Figura 3. Representación esquemática simplificada de los ganglios basales y sus aferencias y eferencias. GPe, globo pálido externo; GPi, globo pálido interno; CS, colículo superior; SNc, sustancia *nigra* parte compacta; SNr, sustancia *nigra* parte reticulada; NST, núcleo subtalámico; DA, dopamina; D1, receptor de dopamina tipo 1; D2, receptor de dopamina tipo 2; Glu, glutamato; ENC, encefalina; SP, sustancia P. Modificado de Utter y Basso 2008.



Los GB influyen fisiológicamente en el tálamo sobre el procesamiento cortical de la información motora, sensorial y cognitiva (Hoover y Strick, 1999; Middleton y Strick 2002), en el colículo superior sobre los movimientos de los ojos y la cabeza (Hikosaka *et al.*, 2000) y en el NPP sobre el procesamiento y ejecución del movimiento (García-Rill, 1986) y el control de la postura a través del GPi y la SNr (Takakusaki *et al.*, 2003). Cuando hay daño moderado en los GB se presentan deficiencias de ejecución en pruebas de aprendizaje estímulo-respuesta, alterando la memoria no declarativa asociada al cuerpo estriado (Shohamy *et al.*, 2008) a diferencia del procesamiento de la memoria declarativa dependiente del sistema hipocampal (Boix-Trelis *et al.*, 2007) y los lóbulos temporomediales (MTL) (Shohamy *et al.*, 2008).

Bioquímica y anatómicamente el cuerpo estriado es una estructura heterogénea con dos compartimentos. Uno, el estriosoma, que se caracteriza por grupos celulares como “islas” de débil marcaje para acetilcolinesterasa a diferencia del otro compartimento, la “matriz”, con fuerte marcaje para ésta. Ambos compartimentos poseen diferentes eferencias y aferencias, así como segundos mensajeros, neuropéptidos y receptores. La mayoría de las interneuronas estriatales se encuentran en la matriz y en el límite entre matriz y estriosoma (Tisch *et al.*, 2004; Schwarting y Huston, 1996). La porción rostral del cuerpo estriado es una estructura que se muestra anatómicamente como una sola, en la que se incluyen el núcleo caudado y el putamen. Hacia su porción caudal es

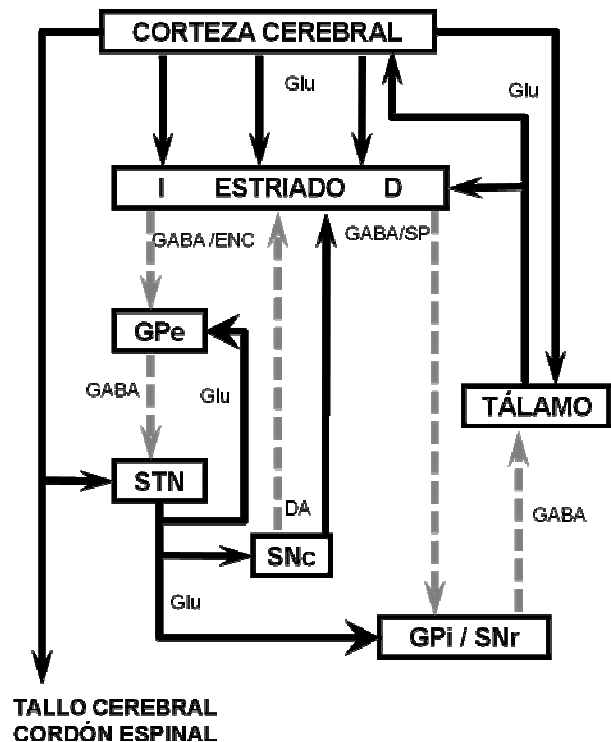
separado por el haz de fibras de la cápsula interna en primates (Utter y Basso, 2008). Aproximadamente el 95% de la población neuronal del estriado son las neuronas espinosas medianas (NEM), sus prolongaciones forman sinapsis con interneuronas del estriado y con neuronas del tálamo, GP y SNr. 50% de las NEM estriatales expresan receptores de DA de las familias D1 y D2, de las cuales aproximadamente el 20% expresa los subtipos D1 a D5 (Caillé *et al.*, 1996) y la expresión de los D1 predomina sobre los D2 en proporción 3:1 (Tenn y Niles 1995).

Las NEM operan como integradoras de la información cortical y talámica, respondiendo en puntos de activación que permiten la estimulación transitoria de otras estructuras de los GB antes de ejercer su inhibición. Reciben aferencias corticales directas o de las interneuronas, de las cuáles se conocen dos grupos principales, interneuronas colinérgicas e interneuronas GABAérgicas, caracterizables estas últimas según la coexpresión de sustancias como parvalbúmina, calretinina, o somatostatina. Las interneuronas estriatales responden a estímulos visuales y auditivos condicionados (Aosaki *et al.*, 1995) y actúan en el control del movimiento (Apicella, 2007), incluso procesan información sobre la ubicación espacial (Ravel *et al.*, 2006) y el análisis de la significancia motivacional para elegir la realización de un movimiento o bien su supresión (Lee *et al.*, 2006). Al parecer existe un patrón de distribución y degeneración de las espinas dendríticas de las NEM en el cuerpo estriado. Se piensa que las sinapsis proximales al soma están predominantemente formadas por neuronas intrínsecas del estriado, mientras que las distales están formadas con las neuronas de la corteza motora en la cabeza de la espina y en el cuello de la misma con neuronas dopaminérgicas de la SN (Li *et al.*, 2003; Ingham *et al.*, 1998).

El estriado recibe aferencias dopaminérgicas del área retrorubral (A8), de la SNc (A9) y el área tegmental ventral (ATV o A10). La parte ventral de estriado recibe aferencias del ATV y en menor proporción de la SNr. Los axones dopaminérgicos aferentes al estriado presentan bifurcaciones que pueden dirigirse al GP, NST, y la corteza primaria. En el estriado las terminales dopaminérgicas pueden formar sinapsis con interneuronas colinérgicas y GABAérgicas ejerciendo efectos moduladores sobre éstas de manera que pueden regular la liberación de glutamato de las aferencias corticales y viceversa (Tisch *et al.*, 2004). La regulación directa de las NEM del estriado sobre el GPi y la SNr por GABA y coexpresión de dinorfina y sustancia P es mediada por receptores D1. La vía indirecta de las NEM del estriado al GPe (o globo pálido en roedores) además de ser GABAérgica también coexpresa met-enkefalina y es mediada por receptores D2. El GPe se proyecta inhibitoriamente con GABA sobre el NST, mismo que ejerce control excitatorio glutamatérgico sobre el GPi, éste envía GABA al tálamo y éste a su vez se proyecta

glutamatérgicamente a la corteza y la última al estriado mandando también glutamato al estriado (Matell y Meck, 2004) (Figura 4).

Figura 4. Conexiones anatómicas implicadas en la ejecución del movimiento. La corteza se proyecta desde zonas somatotópicamente específicas hacia el estriado, donde forma sinapsis excitatorias glutamatérgicas con NEM. La vía indirecta (D) de control dopaminérgico (DA) que parte de la SNc al putamen, de éste al GPi y el tálamo es GABAérgica. El tálamo a su vez envía glutamato (Glu) al estriado y la corteza. La vía indirecta (I) del estriado al GPe y de éste al NST es GABAérgica, El NST envía glutamato al GPe, la SNc y al GPi. Las conexiones excitatorias se muestran con líneas continuas negras, las inhibitorias con líneas punteadas grises. ENC, encefalina; SP, sustancia P. Modificado de Avila-Costa *et al.*, 2007a.



El estriado tiene neuronas dopaminérgicas intrínsecas, son inmunorreactivas a tirosina hidroxilasa (TH) y se han encontrado en ratones, ratas, monos y humanos y existen reportes de que aumentan bilateralmente en número como mecanismo compensatorio al denervar experimentalmente la vía nigroestriatal unilateralmente aunque en humanos no se ha comprobado en casos de EP (Cossette *et al.*, 2005). La DA juega un papel importante en la regulación de los GB, particularmente en el sistema nigroestriatal determina las respuestas de refuerzo (Schultz, 1998) y en los sistemas de DA mesocorticales y mesolímbicos influye en procesos de aprendizaje y motivación emocional. La regulación dopaminérgica de los GB que se origina en la SN se presenta por dos vías: la directa y la indirecta. La vía directa depende de receptores metabotrópicos de DA agrupados en la familia de receptores tipo D1 (subtipos D1 y D5) que están acoplados a proteínas Gs que estimulan la adenilciclase y la formación de AMPc como principal mecanismo de transducción de señales. Su efecto funcional es la facilitación el movimiento. La vía indirecta depende de la familia de receptores de DA tipo D2 (subtipos D2, D3 y D4) que inhiben la adenilciclase y la formación de AMPc, activan canales de K⁺ y reducen la entrada de iones de Ca²⁺ a través de canales dependientes del voltaje, efectos mediados también por proteínas G (G_{ai} y G_{ao}), su efecto en el movimiento es inhibitorio (Wong *et al.*, 1999).

Las principales aferencias glutamatérgicas al estriado provienen de la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala. Conexiones de neuronas serotoninérgicas provienen del núcleo dorsal del Raphe e histaminérgicas del núcleo tuberomamilar (Alexander *et al.*, 1986; Shohamy *et al.*, 2008) y del núcleo talámico (Smith *et al.*, 2004). La representación somatosensorial de la corteza es reorganizada en el estriado donde la información cortical es procesada y enviada de nuevo a la corteza motora a través de las NEM GABAérgicas que también liberan dinorfina y sustancia P en el segmento interno del globo pálido (GPi) y el núcleo talámico ventral anterior (Alexander *et al.*, 1986). Se han identificado al menos cinco circuitos paralelos de retroalimentación estriado cortical: motor; oculomotor, dorsolateral prefrontal o asociativo, lateral orbitofrontal y cingulado anterior (Alexander *et al.*, 1986). Tales circuitos son parcialmente cerrados dado que las eferencias corticales hacia el estriado en el caso del circuito motor surgen tanto del área motora primaria, como de la somatosensorial, la premotora y la motora suplementaria a pesar de ser ésta última el principal objetivo de las aferencias estriatales a través del tálamo. Exceptuando el circuito motor y el oculomotor, se piensa que los otros tres circuitos podrían influir en procesos como el aprendizaje (Laubach, 2005), emocionales y motivacionales (Matell y Meck, 2004; Tisch *et al.*, 2004). Existen al menos tres grandes territorios anatómicos y funcionales en el estriado, el sensorimotor, el asociativo y el límbico (Figura 5). El sensorimotor abarca principalmente la porción dorsolateral del putamen y una pequeña parte dorsolateral del caudado. Recibe las aferencias corticales de la corteza motora primaria, la corteza somatosensorial en el giro postcentral, la corteza premotora y el área motora suplementaria. El territorio asociativo se encuentra medial al territorio sensorimotor, en gran parte del caudado y la parte rostral del putamen, recibe aferencias corticales frontales y temporales, parietales inferiores, preoccipitales y parahipocampales. El territorio límbico se localiza en la parte ventral del caudado y putamen, el núcleo accumbens y algunas porciones del tubérculo olfatorio, recibe aferencias de la corteza límbica, paralímbica, la amígdala y el hipocampo. La información límbica puede llegar al estriado directamente desde la amígdala, el tálamo y la corteza prefrontal (orbitofrontal y cingulada anterior) al estriosoma incluso desde la SNc (Schultz *et al.*, 1993; Koopel y Greenberg, 2007; Utter, 2008).

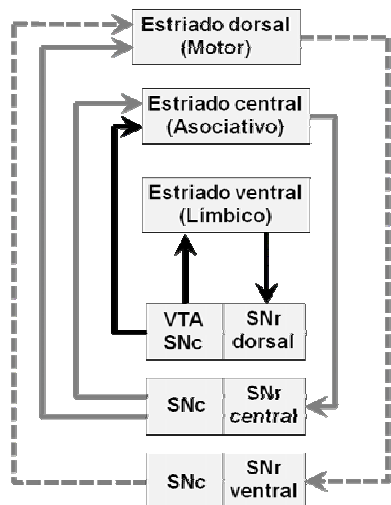
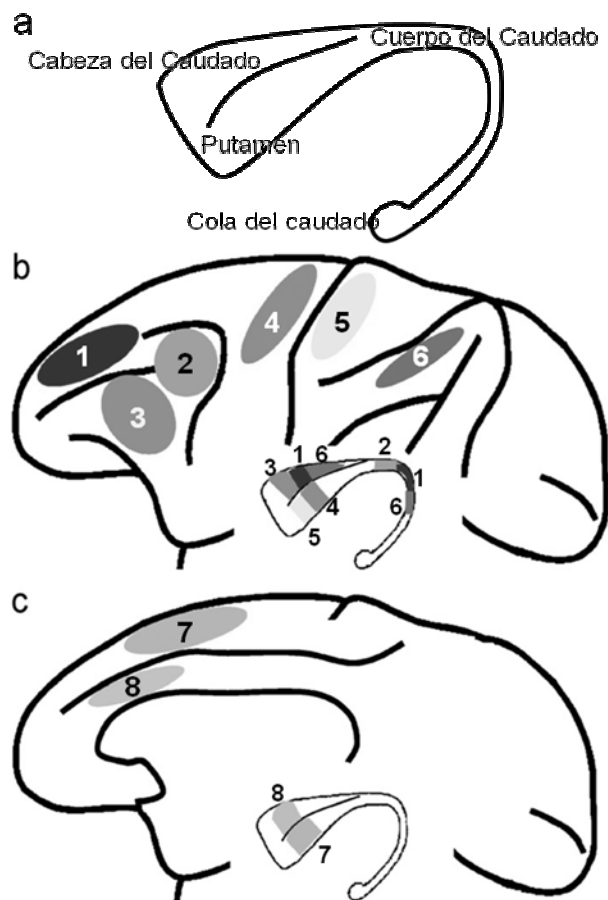


Figura 5. Representación esquemática de la integración de la información de los GB en la SN (izquierda). Anatomía del estriado: putamen y cabeza, cuerpo y cola del núcleo caudado (a); porción lateral (b) y medial (c) (derecha). Las zonas marcadas indican las áreas innervadas por la corteza del mismo número. 1, corteza prefrontal lateral dorsal; 2, campo frontal ocular; 3, corteza orbitofrontal lateral; 4, corteza motora; 5, corteza somatosensorial; 6, corteza parietal posterior; 7, área motora suplementaria; 8, corteza cingulada anterior. Modificado de Alexander *et al.*, 1986 y de Kopell y Greenberg, 2008.



Por otra parte en el mesencéfalo ventral hay tres grandes poblaciones de neuronas dopaminérgicas agrupadas en las regiones A8, A9 y A10, que conforman el sistema mesoestriatal dopaminérgico. Además de DA liberan colecistoquinina. El ATV inerva al núcleo accumbens, el tubérculo olfatorio, la corteza medial frontal, el septum lateral, la amígdala y el estriado medial. La SNc inerva el caudado y putamen. El área retrorubral inerva la cola del caudado. La parte ventral de este sistema mesoestriatal parte del ATV a la parte ventral del estriado. La parte dorsal del sistema se origina en la SN e inerva principalmente la parte dorsal del caudado y putamen. La SNc es una estructura cuyo arreglo poblacional (somas) se condensa principalmente en su porción dorsal, mostrando dendritas generalmente orientadas horizontales dentro de la SNc misma y terminales dirigidas a la matriz ventral del caudado y putamen. La población de la capa ventral de la SNc son neuronas que proyectan sus dendritas verticalmente hacia la SNr, donde al parecer son innervadas por neuronas GABAérgicas del estriado; sus terminales se dirigen hacia el estrioso de la porción dorsal del caudado y putamen. Las fibras dopaminérgicas ascendentes de la ruta nigroestriatal se proyectan mayoritariamente en el hemisferio ipsilateral, a pesar de que una proporción cercana al 5% de las fibras ascendentes de un hemisferio se unen a las ascendentes del hemisferio contralateral (Schwartzing y Huston, 1996).

2.3. Enfermedad de Parkinson

Las exploraciones necroscópicas de pacientes con enfermedad de Parkinson (EP), Huntington y hemibalismo revelaron alteraciones anatomopatológicas en los GB. Estas enfermedades tienen ciertas alteraciones comunes como temblor y otros movimientos involuntarios, cambios en la postura y tono muscular, además de escasez y lentitud de movimientos sin parálisis total. La EP es conocida por sus síntomas desde hace mucho tiempo, se tiene registro de una detallada descripción de la “Kampavata” (Kampa=temblor, vata=humor responsable del movimiento y las sensaciones) en la “Ayurveda” (Ayu=vida; veda =ciencia), un sistema médico hindú que data de 4500 años A.C. y posteriormente en “Charaka Samhita”, documento médico hindú que data de 1000 a.C. (Kaplan, 2004). En los textos del *Corpus Hippocraticum* en la Grecia antigua Aulus Cornelius Celsus (entre 25 y 35 D.C.) y por su parte Galeno (198 D.C.) hacen una descripción de este temblor en reposo y en acción, así como de sus cambios posturales (Taha, 2007). Sin embargo es en 1817 cuando la EP toma importancia como una patología neurológica a partir de su descripción por parte del paleontólogo, farmacéutico, cirujano y escritor político James Parkinson. A sus 62 años de edad publicó “An essay on the Shaking Palsy”, en donde denomina “parálisis agitante” a los signos y síntomas que observa en seis casos clínicos. Define la enfermedad como “movimiento involuntario tremulante con disminución parcial de la potencia muscular, en parte, no durante la acción y aún apoyado, con una tendencia a inclinar el tronco hacia delante y a pasar de un paso de marcha al de correr. Los sentidos y el intelecto permanecen intactos” (Michelli, 1998).

La EP fue la primera afección del sistema nervioso identificada como enfermedad molecular causada por un defecto específico del metabolismo de un neurotransmisor, la DA. A comienzos de la década de 1960 se encontraron niveles bajos de DA en pacientes con EP, así como alteraciones morfológicas en las células dopaminérgicas. Se encontró pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra*, el locus coeruleus y proliferación de células gliales en las zonas afectadas (Grandas, 2003, Hattori y Yoshicuni, 2004). En casos de EP sin tratamiento se ha observado que el paciente se ve obligado a permanecer en cama, le resulta difícil lograr una posición cómoda y en estados avanzados se desarrollan contracturas en articulaciones requiriendo mayores cuidados concluyendo en la muerte por marasmo (malnutrición energética y proteínica severa) bronconeumonía o embolia de pulmón (García y Meseguer, 2002).

Esencialmente en la EP se manifiestan hipercinesias (temblor), acinesias (falta de movimientos asociados y de mímica), hipertonías en forma de espasticidad plástica (sin tendencia a retomar la posición inicial de una extremidad al moverla pasivamente) y elástica (con tendencia a retomar la

posición inicial), y disfunciones del sistema vegetativo manifestando sialorrea o ptialismo, (producción excesiva de saliva), constipación (estreñimiento), polaquiuria (frecuencia miccional), sudoración y secreción sebácea. Alteraciones psiquiátricas (demencia, alucinaciones, psicosis) y cognoscitivas (lentitud del pensamiento y la alteración para llevar a cabo ciertas tareas de planeación o secuenciación) o la combinación de cualquiera de ellas (Bloem *et al.*, 2006; Martínez-Martin, 2006; Obeso *et al.*, 2002). La depresión puede alcanzar una frecuencia de hasta un 50% durante la evolución natural de la enfermedad, sin embargo suele aparecer tempranamente e inclusive puede preceder a la aparición de los síntomas motores (Ravina *et al.*, 2007). En ocasiones las manifestaciones psiquiátricas pueden ser más incapacitantes que los trastornos motores ligados a los medicamentos o a la enfermedad misma (González-Torres y Armendariz-Borunda, 2005). La ansiedad es una manifestación frecuente después de la depresión, considerando su prevalencia de un 35 a 40%. Las alteraciones visuales se dan desde las primeras fases de la enfermedad y se presenta desbalance en la síntesis de DA y melatonina en la retina. Normalmente la melatonina inhibe la síntesis de DA en la fase oscura y la DA inhibe a la de melatonina en la fase luminosa por interacción con el receptor D4. En la EP, ante la disminución de DA se pierde agudeza visual, sensibilidad al contraste, capacidad de discriminación de los colores y adaptación a la oscuridad o a la luz (Djamgoz *et al.*, 1997).

Las alteraciones sexuales como impotencia, pérdida de interés y dificultades para tener relaciones sexuales (Uthayathas *et al.*, 2007) son frecuentes junto con la dificultad para conciliar el sueño, su interrupción con despertares frecuentes y problemas para quedarse dormido nuevamente, incomodidad durante el sueño, pesadillas, movimientos constantes y somnolencia diurna. El temblor corporal disminuye durante el sueño, sin embargo, no desaparece en su totalidad. Los medicamentos utilizados para el control del padecimiento también pueden alterar el sueño (Koller *et al.*, 1995). Hay trastornos deglutorios, disartria (debilidad e incoordinación del habla), lentitud en el inicio del habla, voz monótona con modulación disminuida e incomprensible (Torres *et al.*, 2001).

La EP es la principal patología crónica degenerativa del SNC en México (Rodríguez y Hernández-Cruz, 2006) y una de las principales causas de atención médica en personas mayores de 64 años (Sandoval y Richard, 2007). Datos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, de la Secretaría de Salud, señalan que en México 50 de cada 100 mil personas pueden presentar este padecimiento (Secretaría de Salud, 2006a). Una de cada 40 personas está en riesgo de desarrollarla en el transcurso de su vida (Secretaría de Salud, 2006b). Con base en cifras del INEGI, se ha estimado que en México podría haber cerca de 140 000 personas con EP (Ramírez

et al., 2006). En la ciudad de México en 2005 se encontraba como la décima octava causa de muerte en importancia en hombres mayores de 65 años y la vigésima en mujeres en el mismo rango de edad (INEGI, 2005).

Algunos reportes declaran mayor incidencia de EP en hombres que en mujeres en proporción 1.2-1.7:1 respectivamente (Swerdlow *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2007), sin embargo varios estudios de incidencia o prevalencia de la enfermedad muestran diferentes variantes metodológicas que podrían modificar la interpretación de estos datos. Por ejemplo la sobre o sub representación de personas con EP espontáneo, la edad comprendida en el estudio, la certeza del diagnóstico de EP, las limitantes geográficas e incluso raciales (Burn, 2007). A pesar de la diversidad de resultados, un punto importante y frecuente en gran parte de los estudios es la relación entre el inicio de la EP y el sexo, generalmente comenzando algunos años después en mujeres que en hombres, lo que se atribuye a la postmenopausia y la reducción en la síntesis de estrógenos (Haaxma *et al.*, 2007).

2.3.1. Etiología

Constantin von Economo, un neurólogo austriaco, documentó varios casos de parkinsonismo entre 1916 y 1926 como secuela de una pandemia de encefalitis letárgica (Guitera *et al.*, 1996) y a partir de entonces algunos investigadores propusieron la relación de algunos agentes patógenos en la etiología del parkinsonismo. Se encontró mayor concentración de anticuerpos para el virus del herpes simple en el líquido cerebroespinal de pacientes con enfermedad de Parkinson (Marttila *et al.*, 1977) lo que fortaleció esta teoría a pesar de ser debatida por la escasa significancia de resultados experimentales posteriores (Hemling *et al.*, 2003). De igual manera se ha encontrado mayor cantidad de anticuerpos para bacterias como *Nocardia* spp. con resultados igualmente discutibles (Hubble *et al.*, 1995). Otro estudio propuso la influencia del virus de la influenza A y otros virus en la formación de cuerpos de Lewy y la consecuente muerte de las células de la SNc, sugiriendo que incluso podrían afectarse células del hipocampo y cerebelo (Takahashi y Yamada 1999). La exposición crónica a algunos elementos como el manganeso (Mn) en trabajadores coreanos expuestos fue rechazada inicialmente como posible factor de riesgo para EP (Park *et al.*, 2006). Algunos otros compuestos se han utilizado para desarrollar modelos animales de EP por sus efectos parkinsonianos o de promoción de éstos como el Mn mismo como autooxidante de L-Dopa exógena, la reserpina, el Maneb, el Paraquat o la rotenona (Serra *et al.*, 2000; Betarbet *et al.*, 2002; Corti *et al.*, 2005). Determinadas mutaciones genéticas podrían estar implicadas en la etiología de la EP, como polimorfismos en interleucinas IL-1h, parkinas y α -sinucleína. Eventos proinflamatorios

posteriores a traumatismos, exposición viral o bacteriana en el desarrollo prenatal también han sido objeto de estudio (Ringheima y Conant, 2004).

La línea de investigación en el estrés oxidativo ha aportado mucha información sobre la EP, a través del estudio de los radicales libres que promueven estrés oxidativo en las células dopaminérgicas cuando su producción está en desbalance con sus sistemas de neutralización con la consecuente muerte neuronal por peroxidación lipídica, liberación de glutamato y óxido nítrico, oxidación de proteínas, del DNA o de catecoles en el mesencéfalo. La oxidación de los catecoles produce semiquinonas electrofilicas, quinonas, (H_2O_2) y especies reactivas de oxígeno (ROS) como O_2^{\cdot} (Chen *et al.*, 2001; Asanuma *et al.*, 2004). Los radicales libres son productos normales del metabolismo de las células aeróbicas generados esencialmente a partir de tres fuentes endógenas: por reacciones REDOX como productos intermediarios de metabolización de medicamentos; por activación del sistema inmunológico o por producción de neurotransmisores y hormonas. El ambiente es una fuente exógena por reacciones de gases producto de la combustión, radiación solar, ozono, etcétera. Estos factores pueden generar reacciones en cadena que producen más radicales libres (Avila-Costa, 2001).

2.3.2. Patogenia

La EP es predominantemente de carácter idiopático y aún las mutaciones en genes específicos como de α -sinucleína, DJ-1, PINK1 o LRR K2, están asociadas con el fenotipo de EP idiopática, además de que la sola alteración en uno de estos genes no muestra el complejo espectro de signos a nivel citológico, fisiológico, funcional o conductual que se observan en EP (Bordelon y Fahn, 2006). Polymeropoulos (1997) describió en una familia afectada con la enfermedad, una mutación en el gen que codifica para la α -sinucleína. Este hallazgo fue corroborado un año más tarde por Krüger en el estudio de otra familia (Krüger *et al.*, 1998). Singleton y colaboradores (2003) estudiando una familia con el padecimiento de la enfermedad y demencia con cuerpos de Lewy de herencia autosómica dominante, encontraron que el locus por triplicado de la α -sinucleína era la constante en cada miembro. Los depósitos de material proteico conocidos como cuerpos de Lewy están formados principalmente de la α -sinucleína y otras proteínas altamente fosforiladas en el citoplasma de neuronas catecolaminérgicas en el locus coeruleus, el núcleo dorsal del Raphe, neuronas remanentes de la SNc, el NPP, el hipotálamo, el núcleo intermedio lateral de la médula espinal y en neuronas colinérgicas del núcleo basal de Meynert (en ratas núcleo basal magnocelular). El hecho de encontrar la enzima superóxido dismutasa (SOD) dentro de cuerpos de Lewy sugiere procesos oxidativos en su formación (Maguire-Zeiss *et al.*, 2005). En condiciones normales la α -sinucleína

regula la actividad de la TH manteniéndola en estado inactivo no fosforilado, además de regular la concentración del transportador de dopamina (DAT) en el citoplasma. Sin embargo la alteración del gen de α -sinucleína promueve la formación de inclusiones protofibrilares, éstas a su vez pueden formar aberturas en la membrana mitocondrial a manera de poros, exponiéndola al desbalance homeostático y toxicidad extracelular (Corti *et al.*, 2005).

Valente en 2004 encontró que una forma hereditaria de comienzo temprano se debe a mutaciones en el gen PINK1 (cinasa 1 PTEN-inducida). Su herencia es de forma autosómica recesiva y es la primera proteína localizada en la mitocondria pero codificada por el DNA nuclear que se encuentra implicada en la patogénesis de la EP. En condiciones normales fosforila diferentes sustratos en la mitocondria permitiéndole regular distintas funciones y mantener el potencial membranar. Es un precursor de cinasas cuyos dominios, cuando son mutados contribuyen al fenotipo de EP. DJ-1 es una proteína con locus de herencia autosómica recesiva y posee varias propiedades como ser antioxidante en células expuestas a estrés oxidativo anclándose en la superficie externa de la mitocondria. La Parkina (Ubiquitina E3 ligasa) es una proteína de herencia autosómica recesiva que en condiciones normales ejerce protección en la mitocondria dependiente de ceramida. Anclada al exterior de la membrana retrasa la liberación de citocromo *c*, la activación de la caspasa 3 y el rompimiento de la membrana misma, incluso controla la homeostasis mitocondrial regulando sustratos externos y mantiene los niveles normales de α -sinucleína por ubiquitilación. El gen para ubiquitinacarboxiterminal-hidrolasa 1 (UCHL 1) un componente del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) que degrada las proteínas alteradas, está mutado en pacientes con EP y sus familiares, transmitiéndose de manera autosómica dominante, de manera que posiblemente depende del número de copias del gen mutado para la manifestación de la patología (Corti *et al.*, 2005).

Entre los factores ambientales desencadenantes de la EP se conocen sustancias como algunos pesticidas que pueden inhibir el primer complejo enzimático de la cadena transportadora de electrones (CTE) en la mitocondria (Betarbet *et al.*, 2000). La administración crónica de un inhibidor lipofílico del complejo I en la CTE como la rotenona, puede producir muchas de las manifestaciones de la EP, incluyendo los cuerpos de Lewy (Alam *et al.*, 2004). Las neuronas dopaminérgicas poseen alta susceptibilidad al estrés oxidativo producido por especies ROS como los radicales hidroxilo (OH^\cdot), superóxido (O_2^\cdot), el óxido nítrico (NO^\cdot) y moléculas como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que pueden generar radicales libres (Hunot *et al.*, 1996). La acumulación citoplasmática de neuromelanina, presencia de terminaciones calbindina positivas (nigrosomas) aunado a la calbindina intrínseca de neuronas dopaminérgicas, la presencia de células gliales

glutación peroxidasa (GPx) positivas y la mayor concentración de receptores dopaminérgicos en contraste con la menor presencia de receptores aminérgicos vesiculares en las zonas vulnerables agudizan esta susceptibilidad (Grandas, 2003). En la EP hay incremento de en los niveles de fierro en la SN, un agente catalítico para la formación de OH⁻ por la reacción de Fenton. También se ha encontrado incremento en la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y disminución de glutatión en el mesencéfalo (Chen *et al.*, 2001; Asanuma *et al.*, 2004).

2.3.3. Consideraciones anatómicas y funcionales

La EP presenta histopatológicamente degeneración de las neuronas de la SNc. La sintomatología es evidente, manifestando trastornos funcionales progresivos, caracterizados por síntomas como acinesia, rigidez muscular y temblor de reposo cuando el proceso degenerativo de la SNc ha avanzado al 70% de pérdida de la población neuronal en ocho años aproximadamente (Fleming *et al.*, 2005; Noback *et al.*, 2005). Se estima que la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNc y la depleción de DA en el estriado avanza en 5 a 10% por año, sin ser constante (Monville *et al.*, 2005). Las alteraciones en paralelo de otras rutas de neurotransmisores se presentan como secuela de la disfunción dopaminérgica afectando en el locus coeruleus la ruta norepinefrinérgica, en el NPP, colinérgica y en el núcleo dorsal del Raphe, serotoninérgica. La actividad estriatal, talámica y de la corteza se alteran de manera que el proceso puede prolongarse ante eventos inflamatorios o vasculares secundarios. La muerte neuronal se extiende a otras estructuras como el ATV (55% de la población neuronal), en el área perirrubral (31%), en el área retrorrubral (34%) y en la sustancia gris periacueductal (7%) (Grandas, 2003) y en la corteza, el locus coeruleus y el estriado. En la SN puede apreciarse pérdida de espinas dendríticas (Fiala *et al.*, 2002).

La actividad inhibitoria del GPi sobre el tálamo se incrementada por la carencia de regulación inhibitoria por la SN aumentando en consecuencia la inhibición de la corteza. Normalmente la inhibición del GPi a través del núcleo anterior talámico sobre la corteza motora está determinada por lapsos alternados de activación entre las vías dopaminérgicas directas e indirectas. Los movimientos voluntarios solo pueden iniciarse si la activación de la vía directa es mayor que la indirecta. En desordenes hipocinéticos como la EP la activación de la vía directa es menor a la normal mientras que en los hiperkinéticos como Corea o hemibalismo es mayor a la normal (Talos *et al.*, 2008). La DA estriatal juega un papel regulador en ambas vías, al carecer de este regulador las proyecciones GABAérgicas estriatales son sobreestimuladas, manifestándose en varias alteraciones como un paso “congelado” lento y aumento en la fase de apoyo al caminar. La dicinesia en el paso en pacientes con EP se considera una discapacidad a nivel de la corteza

premotora y áreas suplementarias en el planeamiento y programación de la acción (Hanakawa *et al.*, 1999). En pacientes tratados con L-Dopa, se exagera la sintomatología con episodios de dicinesia o acinesia agudos relacionados con la toma del fármaco (Gálvez, 2005). La dicinesia inducida por la terapia con L-Dopa puede clasificarse como de tipo coreiforme (hipercinética, sin ritmo e impredecible, o con movimientos amplios como de baile) o de tipo distónica (sostenida, de contracciones musculares anormales) (Monville *et al.*, 2005). En modelos animales agudos de dicinesia los movimientos involuntarios anormales o “Mia” se inducen con L-Dopa y son homólogos a los realizados durante los episodios de dicinesia en humanos (Winkler *et al.*, 2002) (Figura 6).

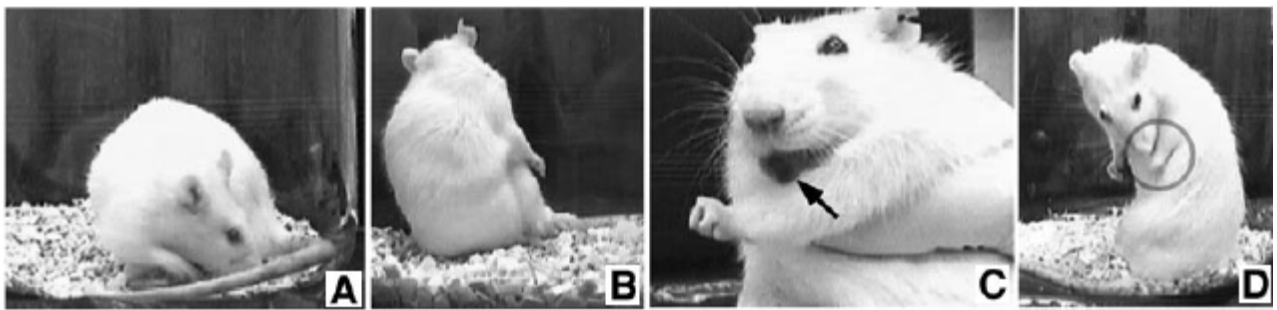
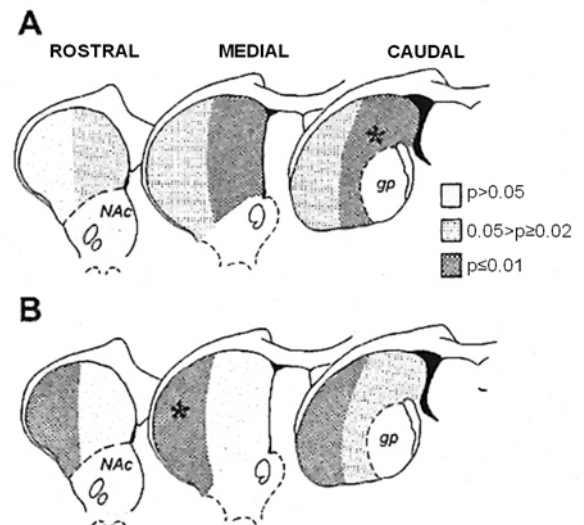


Figura 6. Manifestación de Mia locomotoras (A), axiales (B), orolinguales (C) y de la extremidad anterior (D). A, movimientos circulares hacia el lado contralateral a la lesión., solo se consideran aquellos en los que se utilizan las cuatro extremidades, sin considerarse aquellos en los que la rata cae pasivamente. B, Movimientos giratorios de la parte superior del tronco y el cuello hacia el lado contralateral a la lesión. La torsión del cuerpo es de máxima hasta 90°, causando la pérdida del balance. C, La rata abre y cierra la quijada haciendo muecas, la lengua se tuerce pronunciadamente hacia el lado contralateral a la lesión. A menudo con ligeros mordisqueos a la piel de la pata contralateral (flecha). D, El círculo indica los movimientos de la extremidad con parkinsonismo (izquierda), sin sentido de arriba hacia abajo en el plano sagital, frontal o en ambos, también hay supinación-pronación de la pata y contracción de los dígitos. Modificado de Winkler *et al.*, 2002.

Hay una relación importante entre la topografía de la depleción dopaminérgica en el estriado y la particular manifestación de los Mia, en la cual la porción caudal y medial estriatal sintomatológicamente es más evidente (Andersson *et al.*, 1999) (Figura 7).

Figura 7. Esquematación del análisis de correlación en la manifestación de Mia determinados y la expresión de proteínas Fos-B condicionantes de esta alteración, en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA tratadas con L-Dopa. A, sección medial y principalmente medial-caudal relacionada con Mia locomotoras. B, Porción lateral y principalmente la sección media relacionada con Mia axiales, orolinguales y de la extremidad anterior. (*) Mayor correlación. Globo pálido (gp), núcleo accumbens (NAc). Modificado de Andersson *et al.*, 1999.



La acinesia en el paso se ha relacionado con el NPP a través de la iniciación y modulación del movimiento además de las alteraciones en otros movimientos estereotipados (Pahapill y Lozano, 2000). Dado que la estimulación de la SNr bloquea la atonía muscular promovida por el NPP, se ha inferido que la reducción en la inhibición sobre las motoneuronas α y γ produce rigidez muscular (Takakusaki, 2008). La mayoría de las neuronas motoras corticales alteran sus propiedades de descarga cuando un sujeto caminando encuentra obstáculos en su camino. Este proceso requiere de gran precisión visomotora para la realización de movimientos voluntarios. La retroalimentación de los circuitos córticobasales interviene en estos casos para regular la rapidez y cantidad de movimientos necesarios. Por otro lado las conexiones entre los GB y el tallo cerebral regulan el tono y la postura muscular además de los movimientos rítmicos automáticos de las extremidades durante la locomoción (Takakusaki *et al.*, 2004) (Figura 8).

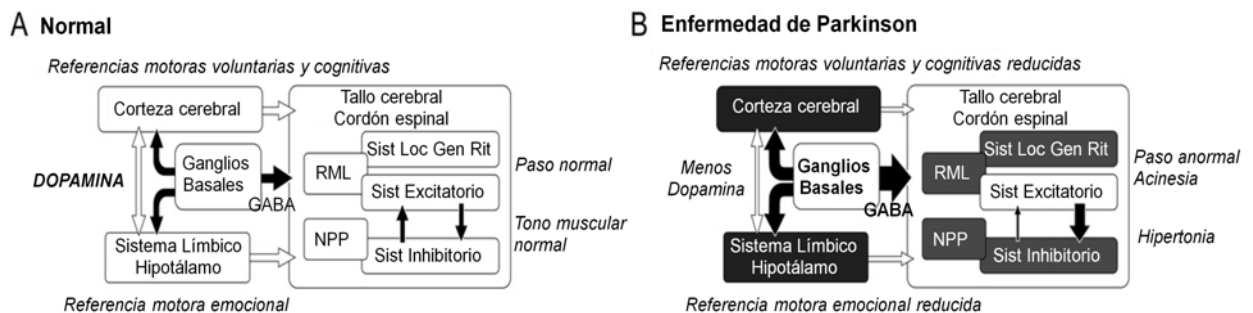


Figura 8. Modelo simplificado del control del cerebro anterior en la actividad locomotora. (A) Normal. En estas condiciones la influencia locomotora mantiene el balance excitatorio e inhibitorio cortical hacia el tallo cerebral. Las referencias cognitivas y motivacionales para el movimiento son normales. En la EP (B) la pérdida de DA puede incrementar la inhibición de los GB, inhibiendo el cerebro anterior (la neocorteza y el sistema límbico) y el tallo cerebral. La excesiva inhibición sobre la región mesencefálica locomotora (RML) y la inhibición indirecta de las áreas motoras corticales inducen acinesia y alteraciones en el paso. La excesiva inhibición sobre el NPP inhibe la actividad del sistema de inhibición del tono muscular produciendo rigidez. Hay reducción de referencias motivacionales y cognitivas del movimiento. Las flechas blancas indican excitación, las oscuras inhibición. Las flechas gruesas indican mayor actividad, las delgadas menor actividad de transmisión. Los recuadros oscuros indican estructuras con menor excitabilidad. Sist Loc Gen Rit: Sistema locomotor generador del ritmo, en el tracto medular reticuloespinal y los generadores centrales del cordón espinal. Sistema excitatorio: proveniente del locus coeruleus, núcleo del Raphe y el sistema excitatorio reticuloespinal. Modificado de Takakusaki 2008.

2.3.4. Neuroquímica de la EP

La biosíntesis de DA (Figura 9) en el SNC, parte del aminoácido tirosina disponible a partir de depósitos tisulares y a través de la barrera hematoencefálica por el sistema de transporte de aminoácidos neutros por su naturaleza hidrofóbica (Holligan *et al.*, 2004). La TH es la enzima limitante de la síntesis de catecolaminas (Nagatsu *et al.*, 1964). Parece ser la más lenta en la secuencia de síntesis y su mecanismo de regulación a corto plazo (segundos a minutos) es por el

producto final L-Dopa o DA. Posteriormente a la formación de la L-DOPA, ésta es decarboxilada a DA por la L-aminoácido aromático decarboxilasa en una reacción que precisa de piridoxal fosfato. Esta enzima puede inhibirse farmacológicamente con α -metildopa. La administración de L-Dopa exógena en pacientes con EP requiere de formulaciones que incluyen carbidopa u otros inhibidores de enzimas del metabolismo primario de manera que se permita la mayor asimilación de L-Dopa a nivel del SNC (Bradford, 1988). La DA, se sintetiza en el citoplasma de las terminales dopaminérgicas donde puede ser liberada directamente al espacio sináptico o bien ser transportada al interior de las vesículas sinápticas para ser liberada por exocitosis al fusionarse la membrana vesicular con la sináptica. Este proceso se lleva a cabo en varias etapas y depende de varias proteínas como el DAT (Reith *et al.*, 1997) y un gradiente electroquímico generado por una bomba ATPasa de protones (H^+) (Bahena-Trujillo *et al.*, 2000).

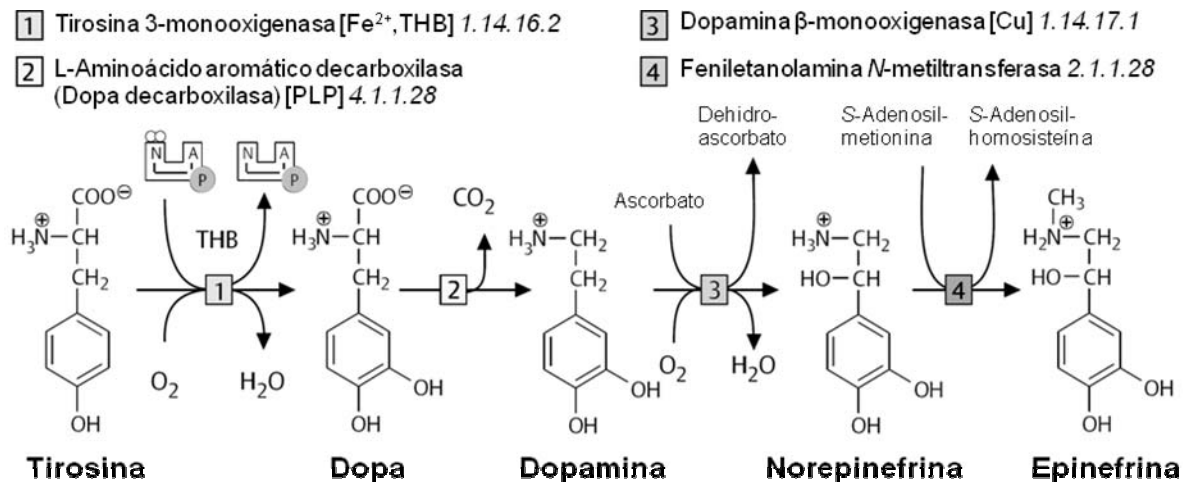


Figura 9. Biosíntesis de catecolaminas a partir de aminas biogénicas con un grupo catecol (anillo de benceno con dos hidroxilos) y una cadena de etilamina o uno de sus derivados. La hidroxilación del anillo aromático de tirosina produce Dopa o 3,4-dihidroxifenilalanina. Para tal reacción intervienen iones de Fe^{2+} , O_2 , NADPH y la coenzima tetrahydrobiopterina (THB). La reacción es catalizada por la enzima TH (1). La decarboxilación de Dopa produce DA. Para tal reacción se precisa de piridoxal fosfato (PLP). La reacción es catalizada por la enzima DDC (2). En neuronas dopaminérgicas la síntesis termina aquí. En glándula adrenal y neuronas adrenérgicas la hidroxilación de DA produce NE. Para la reacción interviene el ácido ascórbico como coenzima de transferencia de hidrógeno, piridoxal fosfato y cobre como cofactores. La enzima que cataliza la reacción es la D β M (3). Finalmente la N-metilación de la NE produce E. La coenzima para esta reacción es la S-adenosilmetionina. La reacción se cataliza por la enzima FNMT (4). Modificado de Koolman y Rohem 2005.

Los catecoles y las catecolaminas ejercen inhibición retrógrada por competencia por el sitio de enlace de TH a la pteridina u oxidando a la pteridina evitando la activación de la TH. La forma activa es la TH reducida a partir del paso de átomos de hidrógeno desde la pteridina (en la forma tetrahydropteridina, THB o BH_4) producida por la enzima quinonoide dihydropteridina reductasa y

de la cual la enzima limitante en la síntesis de BH₄ es la guanosina trifosfato ciclohidrolasa I (GTPCHI). La reacción utiliza como cofactor el NADH o NADPH. Otro mecanismo de regulación de la TH es a través de la fosforilación de la enzima, mediada por el AMPc (Wessels-Reiker *et al.*, 1991) que al parecer incrementa la afinidad de la enzima fosforilada a la pteridina, con mayor dependencia del pH, sin cambio en la velocidad máxima (V_{max}). El ión Ca²⁺ también activa la TH en un mecanismo de mayor V_{max}, sin cambio en las afinidades para TH o el cofactor pteridina a través de la fosforilación de la TH o sus cofactores mediada por calmodulina (Bradford, 1988). Farmacológicamente la TH se puede inhibir por fármacos como α-metil-*p*-tirosina (Porter *et al.*, 1966), o melatonina (en el estriado, hipotálamo o tallo) e incrementada por haloperidol (Vriend y Dreger 2006). A largo plazo (días) la TH se controla farmacológica o endocrinológicamente por la síntesis de la misma enzima (Bradford, 1988). Otros neurotransmisores pueden también modular la actividad de la TH activando receptores A2 para adenosina en las terminales nerviosas dopaminérgicas y NMDA para glutamato, o inhibirla por receptores para GABA_B (Bahena-Trujillo *et al.*, 2000).

La acción de la DA termina principalmente al recapturándose por el DAT hacia el interior de la terminal aunque bajo ciertas condiciones el transportador opera en sentido inverso liberando DA al exterior (Bradford, 1998). El DAT es una proteína dependiente de Na⁺ y Cl⁻, con varios sitios de fosforilación, cotransporta la DA al interior de la terminal con dos iones de Na⁺ y un ion Cl⁻, es susceptible de inhibición por fármacos como GBR-12909, nomifensina, mazindol, cocaína y anfetamina. Su función puede ser modulada por segundos mensajeros como el diacilglicerol por activación de la proteína cinasa C (PKC) y el ácido araquidónico. Es también responsable de la captura de las neurotoxinas 6-OHDA y MPTP (Schwartzing y Houston, 1996; Betarbet *et al.*, 2002). La DA recapturada es convertida por la enzima monoamino-oxidasa A (MAO-A) en ácido dihidroxifenilacético (DOPAC). LA MAO-A está presente en tejido glandular, hígado, riñones, intestinos y en menor medida en el cerebro, donde se encuentra en el interior de la terminal nerviosa. Utiliza como cofactor flavín adenin dinucleótido (FAD) y puede ser inhibida farmacológicamente con clorgilina. El DOPAC liberado al exterior de la terminal es convertido en ácido homovanílico (HVA) por la enzima catecol-*O*-metiltransferasa (COMT) por metilación, principalmente en el citoplasma. La COMT se encuentra en el hígado, riñón y el cerebro donde esencialmente se encuentra en el citoplasma de neuronas y glía. MAO-B presente en la glía puede ser inhibida por selegilina irreversiblemente. La MAO que se encuentra extracelularmente es la principal forma de inactivación de catecolaminas liberadas de las terminales nerviosas. Requiere de cationes divalentes de Co²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ o Cd²⁺ (Bradford, 1988).

La regulación de la liberación de DA por autorreceptores está mediada por la inhibición de la formación de AMPc y de la apertura de canales de Ca^{2+} . La reducción en la formación de AMPc disminuye la actividad de la proteína cinasa A (PKA) que fosforila a las sinapsinas I y II, por lo que las vesículas tienden a estar unidas al citoesqueleto disminuyendo la probabilidad de fusión de las vesículas (Missale *et al.*, 1998). Otra forma de inhibir la liberación de DA es reduciendo la producción de ATP o por la oxidación de la proteína SNARE (*N*-etilamida-sensible a la fusión de proteínas al receptor, soluble) o incrementando la fosforilación de las proteínas de unión a Ca^{2+} (Chen *et al.*, 2001). La DA no capturada en la terminal dopaminérgica es metabolizada en HVA por la acción secuencial de las enzimas COMT y MAO-A. Los derivados inactivos metilados llegan al torrente sanguíneo y son excretados del organismo. En el cerebro de la rata el principal metabolito de la DA es el DOPAC, en tanto que en primates lo es el HVA (Bahena-Trujillo *et al.*, 2000).

En la EP se presentan alteraciones en los mecanismos antioxidantes detoxificadores de radicales libres, por ejemplo en la alteración en la síntesis de enzimas barredoras de radicales libres como GPx y SOD (Lin y Ho, 2000). En la SNc la actividad del complejo I de la CTE disminuye (Janetzky *et al.*, 1994) y puesto que la hidrólisis enzimática de las aminas biogénicas se da en las mitocondrias neuronales y gliales, las células sufren estrés oxidativo (Grandas, 2003). Los ácidos grasos poli insaturados en la membrana se reducen como sustrato de las ROS produciendo altos niveles de malondialdehído e hidroperóxidos lipídicos como producto del aumento en la peroxidación lipídica neuronal. Se han encontrado altos niveles de indicadores de daño al ADN como 8-hidroxi-guanina y 8-hidroxi-2-desoxiguanina y aumento en la producción de 4-hidroxi-nonal (HNE) principalmente en la SNc y en el líquido cerebrospinal, dicho compuesto interviene en la activación de caspasas apoptóticas (Smith y Cass, 2007).

2.4. Modelos experimentales de la EP

Distintas sustancias con actividad específica en el SNC pueden producir alteraciones citológicas, de comportamiento, químicas o genéticas similares a las encontradas en la EP. La utilidad de cada modelo depende del objetivo de la investigación y ninguno puede recrear todas las manifestaciones patológicas de la EP por la diversidad de factores causantes del padecimiento que aun no se conocen en su totalidad.

2.4.1. Modelo con 6-OHDA

El primer compuesto químico sintético desarrollado, cuyos efectos se manifiestan específicamente sobre rutas catecolaminérgicas es la 6-Hidroxi-dopamina (2,4,5-trihidroxi-fenilamina, 2,5-

dihidroxitiramina o 6-OHDA) debido a que es afín al sistema de transporte de catecolaminas. Sobre esta toxina que no atraviesa la barrera hematoencefálica, inicialmente se describió su capacidad para suprimir norepinefrina (NE) en órganos periféricos como el corazón (Porter *et al.*, 1963). Se encuentran pequeñas cantidades de 6-OHDA en tejidos periféricos y en el cerebro como metabolito de la DA (Maharaj *et al.*, 2005) y en orina de pacientes con EP tratados con L-Dopa (Andrew *et al.*, 1993). Después de su administración a altas dosis de 10 a 30mg/kg vía intraperitoneal e intravenosa en gatos, cuyos y ratones, disminuye la concentración de NE en el corazón de una hora hasta una semana posterior a la inyección y reducción de NE en el ganglio superior cervical de ratón e hipotálamo de gato (Lavery y Sharman 1965).

En 1968 con los trabajos de Ungerstedt se propuso por primera vez como un posible modelo para estudiar su efecto sobre las neuronas dopaminérgicas y norepinefrinérgicas en el SNC. Utilizó la inyección unilateral estereotáxica para administrar 8µg de 6-OHDA en 4µl de solución de ácido ascórbico en el cuerpo estriado, la SN y la porción dorsolateral del núcleo interpeduncular de ratas encontrando que produce marcada asimetría motora similar a la provocada por la administración unilateral estereotáxica en el estriado de DA, apomorfina o NE por giro contralateral a la lesión en ratas pre tratadas con nialamida (Ungerstedt *et al.*, 1969). A partir de entonces se ha utilizado en una amplia gama de estudios como un modelo animal de la EP con aplicación en ratones, gatos, perros, monos y principalmente en ratas (Cenci *et al.*, 2002). La inyección estereotáxica es viable en el estriado, el mfb y la SN (Hokfelt y Ungerstedt, 1973; Perese *et al.*, 1989; Schwarting y Huston, 1996). Las neuronas dopaminérgicas comienzan a degenerar en menos de 24 horas después de la inyección, reduciendo la DA dos o tres días después (Hokfelt y Ungerstedt, 1973). La magnitud del daño depende del sitio de administración, la dosis administrada y las diferencias entre especies (Breit *et al.*, 2007). La pérdida de neuronas inmunorreactivas a TH y el déficit conductual, como el giro inducido por apomorfina, la postura asimétrica, balance y locomoción es dosis dependiente por lo que mayores concentraciones de la toxina muestran mayores efectos sobre la citología y la conducta que concentraciones menores a pesar de que los síntomas se generalizan cuando la pérdida de células dopaminérgicas llega al 70% en cualquier caso (Truong *et al.*, 2006).

Se puede obtener el 80 a 90% de pérdida de neuronas dopaminérgicas correlacionables con determinados cambios conductuales. Se observa degeneración retrógrada lenta en SNc si es inyectada en estriado. Produce inicialmente decremento de inmunorreactividad a TH de las neuronas dopaminérgicas y degeneración de las mismas (Przedborski *et al.*, 1995). En el estriado la degeneración por la 6-OHDA administrada en el mfb comienza a manifestarse marcadamente entre

los 7 y 14 días posteriores a la lesión. Se conoce que ante la disminución de los impulsos en las neuronas dopaminérgicas por la lesión del tracto nigroestriatal se activa la actividad de la TH. La porción dorsolateral del estriado presenta algunas terminales de neuronas remanentes TH-positivas por más tiempo, lo que corresponde topográficamente con las neuronas dopaminérgicas remanentes en la SNc que inervan esta parte del estriado y que son las últimas en degenerarse después de la lesión en el mfb (Labandeira-García *et al.*, 1996). Se ha propuesto que el efecto máximo de la toxicidad de la 6-OHDA se da entre las primeras 6 a 48 horas afectando primero la SNc ventrolateral y después la dorsolateral (Zuch *et al.*, 2000).

Funcionalmente la lesión con 6-OHDA produce rigidez, alteraciones al caminar, dicinesias fluctuantes, acinesia bilateral a pesar de que generalmente se aplica la inyección unilateral (Cenci *et al.*, 2002). La asimetría motora se manifiesta como movimientos giratorios hacia el lado ipsilateral o contralateral a la lesión luego de la administración de fármacos como apomorfina o anfetamina, ya sea por la diferencia fisiológica en la concentración de DA existente en cada hemisferio o por la inducción de la liberación de DA de neuronas remanentes. El conteo del giro inducido farmacológicamente es utilizado como referente del grado de lesión (Ungerstedt, 1968). Este modelo se ha relacionado con el estrés oxidativo por la producción de peróxido de hidrógeno y su radical hidroxilo (OH[•]) o superóxido (O₂^{•-}) en presencia de hierro. Se sabe que la inyección estereotáxica de soluciones de hierro produce efectos muy similares a los obtenidos con 6-OHDA, por lo que su efectividad está relacionada con moléculas de hierro por la reacción de Fenton. Esta neurotoxina produce disminución de la actividad de la SOD y la concentración de glutatión reducido (GSH) (Perumal *et al.*, 1992) e incremento de niveles de malondialdehído en el estriado (Kumar *et al.*, 1995), toxicidad en la CTE por producción de O₂^{•-} (Glinka *et al.*, 1998) e inhibición de la enzima NADH deshidrogenasa en el complejo I y la citocromo *c* oxidasa en el complejo IV mitocondrial (Glinka y Youdim, 1995).

La susceptibilidad a la toxina es menor en hembras que en machos principalmente por la influencia del 17β-estradiol (Murray *et al.*, 2003), además los procesos de compensación difieren según la edad en que se produzca el daño (Abrous *et al.*, 1990). Durante las primeras dos o tres semanas de vida, el cerebro de las ratas posee gran capacidad de reorganización, en consecuencia si la lesión es producida entre los 3 y 7 días de edad no produce déficit motor contralateral como en ratas mayores de 21 días y en adelante, sin que se conozcan los mecanismos de esta baja susceptibilidad a la toxina en organismos neonatos (Abrous *et al.*, 1992). La lesión altera la síntesis de muchas sustancias en el estriado además de la supresión de DA, como sustancia P, y preproencefalina

(Romero *et al.*, 2000), receptores de endocannabinoides (Zeng *et al.*, 1999), factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) (Sharma *et al.*, 2006), receptores específicos de GDNF como los GFR α (1a 4, pero preferencialmente $\alpha 1$), proteína c-RET (Marco *et al.*, 2002; Kozlowski *et al.*, 2004) entre otras. La administración de quelantes de Fe como vitamina E (Perumal *et al.*, 1992), Selegilina, un inhibidor de MAO-B (Knoll, 1986) previene efectos neurotóxicos parciales o completos. Algunas desventajas del modelo son que es invasivo, no presenta inclusiones celulares, no afecta el locus coeruleus y es un modelo agudo de degeneración. Sus características lo hacen viable en estudios para probar transplantes celulares, factores de crecimiento, fármacos antiapoptóticos, etcétera.

2.4.2. Modelo con MPTP

Desarrollado a partir del descubrimiento de que la intoxicación accidental en adictos a heroína contaminada con 1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) produce síntomas muy marcados similares al parkinsonismo esporádico (Langston *et al.*, 1999). A partir de entonces se probó en animales experimentales que la toxina produce degeneración nigroestriatal en ratones, gatos, perros, cujos y primates (Cenci *et al.*, 2002). A pesar de esto la susceptibilidad a la toxina varía entre especies y cepas. La MPTP cruza la barrera hematoencefálica, pero no es neurotóxica como tal. Se metaboliza en los astrocitos como un metabolito activo por la monoaminoxidasa tipo B (MAO-B), el ion 1-metil-4fenil-2,3-dihidropiridinium o MPP⁺. Este ion es afín al DAT afectando selectivamente a las neuronas dopaminérgicas (Betarbet *et al.*, 2002). Se piensa que el efecto tóxico de su forma iónica es la inhibición del complejo I de la CTE en la respiración mitocondrial. En la terminal sináptica el MPP⁺ es un potente inhibidor de la oxidación de sustratos ligados al NAD⁺ mitocondrial (Rohkamm, 2004; Perlmutter y Tabbal, 2004).

La mayoría de los estudios mediante este modelo utilizan la administración sistémica del MPTP, ya sea vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular. La exposición aguda disminuye del 50 al 93% la población de neuronas dopaminérgicas de la SNc reduciendo hasta el 99% de DA en el estriado. Produce bradicinesia, rigidez, disminución de DA y sus metabolitos en el estriado (Perlmutter y Tabbal, 2004), aumento en el daño oxidativo producto de peroxidación lipídica (Rios y Tapia, 1987; Franco *et al.*, 2007), aumento de 3-nitrotirosina o 3NT y disminución en la concentración de antioxidantes como GSH (Franco *et al.*, 2007). Una desventaja que presenta el modelo es la reversibilidad del daño a dosis bajas en algunas especies por lo que se requiere una exposición aguda, produciendo daño drástico sobre las vías dopaminérgicas. La selectividad del daño se limita a las células que expresan el DAT (Reith *et al.*, 1997).

2.4.3. Modelo con Reserpina

La reserpina es un alcaloide de la planta *Rauwolfia serpentina* utilizada tradicionalmente en la India, es como hipnótico y tranquilizante. Se aisló de la planta en 1951 y posteriormente se supo que disminuye la DA si se administra sistémicamente provocando estados acinéticos en conejos (Carlsson *et al.*, 1957). El tratamiento con L-Dopa revierte este efecto, sugiriendo que su recuperación depende de la DA. En 1963 Hornikiewicz comprobó este hecho en humanos y a partir de entonces surgió el modelo animal con reserpina, modelo en el cual se confirmó la condicionante de insuficiencia de DA estriatal para la manifestación de problemas motores (Alamo *et al.*, 2004). La administración sistémica de reserpina suprime de DA a las terminales nerviosas e induce estado hipocinético en roedores y déficit de movimiento por pérdida en la capacidad de almacenamiento de DA en las vesículas intracelulares (Kirpekar *et al.*, 1963). Algunas desventajas que presenta son, por un lado la reversibilidad en los cambios acinéticos y la carencia de cambios morfológicos en las neuronas dopaminérgicas. No se recomienda en estudios farmacológicos dado que en modelos animales, los fármacos capaces de revertir los efectos de la toxina no son aplicables en la EP. Produce hipotermia y liberación de catecolaminas inespecíficamente (Carlsson *et al.*, 1967). A pesar de esto se utiliza en investigación en la prueba de agentes de reemplazo dopaminérgicos en el estriado incluida la L-Dopa y otros agonistas.

2.4.4. Modelos con contaminantes ambientales

2.4.4.1. Maneb

El manganeso etilenbisdiocarbamato o Maneb es un fungicida con efecto tóxico sobre el sistema dopaminérgico que sustenta la hipótesis ambiental de la EP. En ratones expuestos a dosis de 200 a 1000mg/kg vía intraperitoneal se encontró que deprimía su conducta motora y agresiva e incrementaba el tiempo de sueño inducido con barbitúricos y catatonía con haloperidol, proponiéndose como un depresor del SNC a través de las vías dopaminérgicas (Morato *et al.*, 1989). Se ha encontrado que puede producir estrés oxidativo en las vías catecolaminérgicas por catalización de la oxidación de DA y NE (Fitsanakis *et al.*, 2002), e incremento en la concentración de serotonina en el estriado de manera dosis dependiente (Nielsen *et al.*, 2006). Produce exacerbación del proceso neuroinflamatorio y degenerativo (Cicchetti *et al.*, 2005). En ratas expuestas diariamente a Maneb, se observa disminución de actividad motora aunada a la disminución de DA en el estriado, aumento en la recaptura de DA en el estriado y disminución de neuronas inmunorreactivas a TH de la SNc (Barlow *et al.*, 2007). En algunas zonas geográficas se ha utilizado junto al Paraquat en cultivos promoviendo mayor riesgo a desarrollar EP. Puede

potenciar el efecto del MPTP y en combinación con Paraquat posee mayor efecto que solo, en la síntesis de complexina-I, α -enolasa y GMF- β involucradas en el fenotipo de EP de ratón (Patel *et al.*, 2007).

2.4.4.2. Paraquat

El 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinium o Paraquat es un herbicida cuya molécula similar a la de MPP⁺ cruza la barrera hematoencefálica lenta y limitadamente. En 1997 un estudio en una población taiwanesa propuso la relación entre la larga exposición a Paraquat y el desarrollo de PD (Liou *et al.*, 1997). La administración sistémica en ratones muestra efectos dosis dependientes en la actividad ambulatoria, pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNc y disminución de la DA estriatal (Brooks *et al.*, 1999). En ratas altera los movimientos estereotipados y de giro en ratas incluyendo disminución de NE en la corteza e hipotálamo, y de DA y sus metabolitos en el estriado además de activación en la microglía en la SNc (Cicchetti *et al.*, 2005). En ratas tratadas pre y postnatalmente produce muerte de neuronas del sistema nigroestriatal aportando información a favor de la hipótesis de una base fetal del desarrollo de una enfermedad de adulto (Barlow *et al.*, 2007). En *Drosophila* mutante en el gen DJ-1 β expuesta a Paraquat disminuye progresivamente el movimiento por inducción de estrés oxidativo (Park *et al.*, 2005). Su efecto tóxico parece estar ligado a su acumulación en el tejido cerebral y a la duración de la exposición (Prasad *et al.*, 2007), además disminuye con l-valina (Chanyachukul *et al.*, 2004).

2.4.5. Modelos transgénicos

Polymeropoulos (1997) Feany y Bender (2000) experimentaron con la mosca *Drosophila* transgénica que expresa el gen humano de la α -sinucleína. Introdujeron el gen normal y otras mutaciones del mismo gen. En ambos casos observaron notable pérdida de neuronas del sistema dopaminérgico e incluso la presencia de los cuerpos de Lewy. Las moscas que sobreexpresaban el gen del α -sinucleína tenían alteraciones importantes en las pruebas de locomoción al envejecer. El rastreo de los efectos de genes específicos como el SNCA permite conocer su relevancia en la etiología y patogenia de la EP. En el diseño de modelos transgénicos en ratones, se han utilizado promotores de síntesis de proteínas como Thy1 o el MoPrP.Xho (Lee *et al.*, 2002). Una vez seleccionados los promotores se diseñan las secuencias específicas en un ADNc experimental o una secuencia particular. La secuencia se amplifica en un organismo como una bacteria para luego aislarse tanto el promotor, como la región deseada y la cola Poli A. La fracción aislada se inserta en el pronúcleo de oocitos fertilizados de ratón. Los cigotos se implantan en una hembra pseudopreñada la cual incorporará la secuencia en el genoma hijo y creará múltiples copias

arregladas en Tandem con cola y cabeza para maduración y transcripción. Los ratones hijos son los “fundadores” de cada línea, misma que transmitirán a su descendencia transgénica específica. (Dang y Li, 2004). En algunas ocasiones para codificar secuencias cortas se utilizan vectores virales para la producción de más copias e insertarlas en los oocitos (Hermens y Verhaagen, 1998) o cromosomas artificiales de levaduras (YACs) para clonar varias secuencias diferentes (Dang y Li, 2004).

El nemátodo *Caenorhabditis elegans* es útil para evaluar el efecto de secuencias de ácido ribonucleico interferente (ARNi) que inhabilitan la formación de agregados protéicos como la α -sinucleína, por interrupción en la expresión de este gen. Estos nemátodos expresan otros genes ortólogos a los genes humanos alterados en EP como Parkina, DJ-1, PINK1, UCHL-1, LRRK2, PARK9, y NURR1 (Hamamichi *et al.*, 2008). El hongo *Saccharomyces cerevisiae* expresan genes relacionados con la EP, como el Ypt1p ortólogo del Rab1 de *Drosophila*, a su vez ortólogo del YPT1 de mamíferos, involucrados con el bloqueo de la síntesis de α -sinucleína en el retículo endoplasmático (Cooper *et al.*, 2006). La inducción o inhibición farmacológica del acoplamiento de promotores específicos también es una alternativa en este tipo de modelos como el “Tet-off” en el cual se requiere una línea adicional de ratones que expresen tetraciclina-controladora de la *trans*-activador (tTA) en el tejido de interés. La variedad de modelos de este tipo es tal como combinaciones posibles farmacológicas, genéticas y biológicas, entre los más importantes están los “Knock out”, “Knock in”, la ablación genética específica en tejidos dependiente de la toxina A del gen de la difteria (DTA), del receptor de interleucina 2 de humano, la inmunotoxina Anti-Tac-(Fv)-PE40 o el virus de herpes simple HSV-TK (Dang y Li, 2004).

2.5. Tratamientos

A lo largo del tiempo varias plantas y fármacos se han utilizado en la terapia para la EP. Extractos de plantas como *Atropa belladonna*, *Datura stramonium*, *Spongia somnifera*, *Cannabis sativa*, *Papaver somniferum*, *Panax ginseng*, *Ginkgo biloba*, *Vicia faba*, *Macuna pruriens*, *Coffea arabica*, *Curcuma longa* L, *Nicotiana tabacum* L y muchas otras, principalmente por la actividad de sus alcaloides como la escopolamina, atropina o cannabinoides, algunos con acción anticolinérgica, favoreciendo la síntesis de E y DA u otros de inhibición motora (Apaydin *et al.*, 2000; Góngora-Alfaro *et al.*, 2005). Del hongo *Claviceps purpurea* se sintetizan agonistas dopaminérgicos. Desde 1949 a la fecha se han probado diferentes fármacos como tirosina, fenilalanina, TH, Triexiphenadil, Benzotropina, Orfenadrina, Prociclidina, Amantadina, Levodopa, Carbidopa, Taurina, Bromocriptina, Melatonina, Litio, L-carnitina, estrógenos, antagonistas de receptores NMDA,

coenzima Q10 y otros en diferentes dosis, tratamientos, combinaciones y circunstancias encontrando resultados buenos, nulos o medios (Shaw *et al.*, 1973; Aguiar *et al.*, 2002; Avila-Costa *et al.*, 2005; Galpern y Cudkowicz, 2007; Singh *et al.*, 2007)..Incluso en la fase clínica experimental existe un prototipo de vacuna para la EP, que estimula el sistema inmunológico induciendo la formación de membrana y proteínas de agregación intracitoplasmática permitiendo la regeneración neuronal (Singh *et al.*, 2007).

2.5.1. Terapias de reemplazo

Los estudios de Birkmayer y Hornykiewicz en 1961 sobre los efectos de la administración intravenosa de 1-3,4-dioxifenilalanina o L-Dopa en la acinesia permitieron el desarrollo de una nueva línea de investigación. Incluyeron benserazida como inhibidor periférico de la Dopa decarboxilasa y deprenil como inhibidor de la MAO-B en su formulación farmacológica (Birkmayer y Hornykiewicz, 1982). Debido a que la administración exógena de DA no atraviesa la barrera hematoencefálica, en 1968 la utilización farmacológica del precursor de DA, la L-DOPA para tratar los síntomas de la EP, resultó en su momento todo un éxito por su rápida inhibición del temblor a pesar de ello poco tiempo después se observaron efectos contraproducentes en pacientes con umbral más alto de tolerancia al fármaco que requerían dosis más altas. La autooxidación no enzimática de la DA por la reacción de Fenton produce la formación de 2-OHDA, 5-OHDA y 6OHDA en proporción 3:2:1 respectivamente. Los primeros dos productos no son citotóxicos sin embargo la 6-OHDA es altamente autooxidable (Slivka y Cohen, 1985). La L-Dopa administrada por vía oral se absorbe en el duodeno y primeras porciones del yeyuno almacenándose en el estómago donde también puede convertirse a DA por la DDC reduciendo su biodisponibilidad cerebral hasta en un 70%. Entra al torrente sanguíneo desde el intestino por transporte activo compitiendo con otros aminoácidos para su absorción, por lo tanto los aminoácidos aromáticos y de cadenas ramificadas de los alimentos pueden afectar su absorción. Se metaboliza en el hígado y en el riñón sufre aclaramiento. La L-Dopa absorbida es convertida en DA por la enzima DDC. En presencia de un inhibidor de la DDC la L-Dopa plasmática se metaboliza a nivel hepático, músculos, riñones y glóbulos rojos por la COMT formando 3-O-metil dopa (3-OMD), de vida media de 15 horas en el plasma. La DA sintetizada de esta forma produce efectos adversos, como la estimulación del área postrema de la médula oblongada, específicamente el centro del vómito generando náuseas y vómitos. La decarboxilación de la L-Dopa a nivel gástrico aumenta en presencia de factores que retarden su vaciamiento, como la disminución del pH gástrico o el estreñimiento. Fármacos procinéticos que aumentan el vaciamiento gástrico aumentan la velocidad de absorción y biodisponibilidad de la L-Dopa. Se recomienda separar la toma de la dosis de L-

dopa oral por lo menos 30 minutos antes de las comidas para optimizar su cinética (Juri y Chaná, 2006).

La L-Dopa entra a la neurona directamente y es convertida por la DDC en DA rápidamente pues la vida media de la L-Dopa es de 60 a 90 minutos. Su efecto es ejercido fundamentalmente a través de la DA producida en las neuronas y la estimulación directa de los receptores D1 y D2. Su principal sitio de acción es el estriado a fin es sustituir la deficiencia de DA. La DA liberada al espacio sináptico es recaptada por la neurona dopaminérgica a través del DAT y realmacenada para su liberación. La L-Dopa exógena también puede convertirse en NE o E así como productos traza de aminoácidos y tener efectos sobre receptores no dopaminérgicos. La DA puede estimular receptores GABAérgicos en la SN dándole a la terapia con L-Dopa una capacidad que la estimulación directa de los receptores dopaminérgicos no posee (Juri y Chaná, 2006). En humanos bajo tratamiento con L-Dopa por largo tiempo, se producen dicinesias y otros trastornos (Markham *et al.*, 1974, Rascol *et al.*, 2000; Lees *et al.*, 2001) (Figura 10).

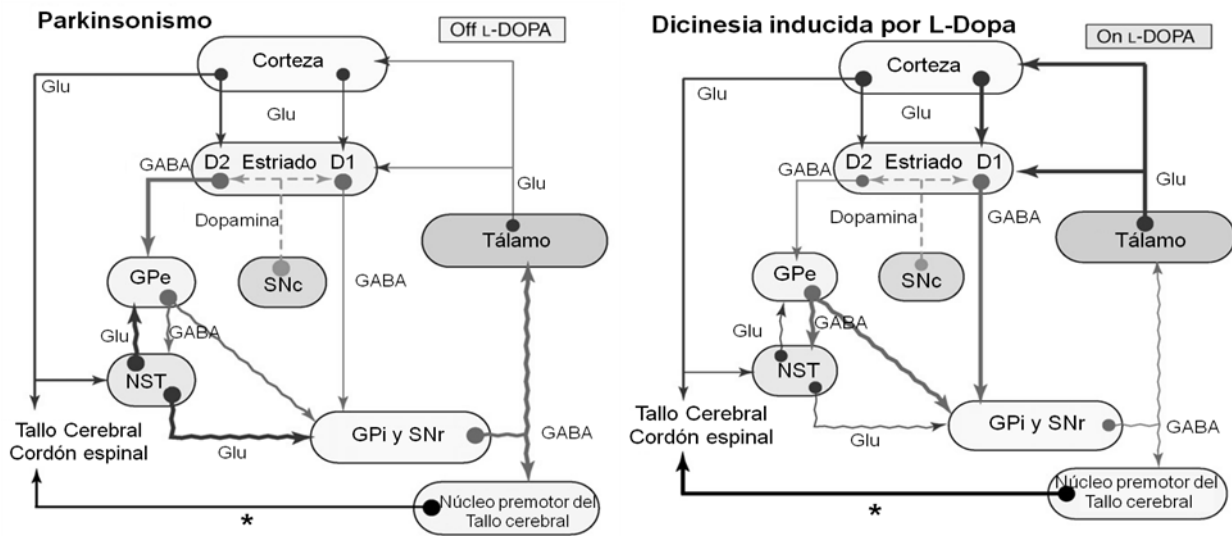


Figura 10. El circuito GB-tálamo-corteza en pacientes con EP sin tratamiento (izquierda) y en dicinesia inducida con L-DOPA (derecha). Las líneas discontinuas grises indican la pérdida de proyecciones dopaminérgicas de la SNc. Las líneas gruesas indican mayor actividad y las delgadas menor actividad con respecto a la actividad normal. Las líneas onduladas indican alteraciones en el ritmo de disparo. El asterisco indica la liberación de un solo neurotransmisor. La influencia estriatal sobre el GPi y la SNr en la vía indirecta, es alterada en la EP, distinguiéndose de las alteraciones en personas tratadas con L-Dopa que manifiestan dicinesia por sobreactividad de la vía directa dependiente de receptores D1. Modificado de Cenci, 2007.

Sus presentaciones farmacológicas varían en concentración y formulación, pueden contener inhibidores de enzimas de metabolización de catecolaminas como benserazida, carbidopa, entacapona y otros que aumentan la biodisponibilidad de DA cerebral y mejoran la tolerancia de los

pacientes al tratamiento. Existen comprimidos comerciales como Sinemet (utilizado en este estudio) y Grifoparkin un bioequivalente genérico que contienen 25mg de carbidopa y 250mg de levodopa. Esta proporción farmacológica ha sido la más utilizada por su efectividad (Chaná *et al.*, 2003). La mayoría de los pacientes experimentan mejoría de los síntomas motores con esta terapia reduciendo marcadamente la rigidez, el temblor y la acinesia, además de obtener beneficios sobre la ejecución de la marcha, deglución, postura, vocalización, escritura y cambios autonómicos, manteniéndolos estables a lo largo del día durante los primeros meses o años de tratamiento. Entre los síntomas no deseables se encuentran las náuseas, vómitos, hipotensión postural, alteraciones psíquicas, dicinesias y con el tiempo fluctuaciones motoras asociadas a la ingesta del fármaco de beneficio positivo (“on”) o negativo (“off”) (García y Meseguer, 2002). A pesar del éxito terapéutico inicial, éste desaparece a los pocos años por el desarrollo de complicaciones motoras y mentales producto del avance de la enfermedad (Markham *et al.*, 1974; Rascol *et al.*, 2000; Lees *et al.*, 2001).

2.5.1.1. Agonistas dopaminérgicos

Subdivididos en dos tipos principales, los derivados del hongo Ergot o *Claviceps purpurea* como bromocriptina, pergolida, lisuride y cabergolina, y los no ergóticos como ropinirol, pramipexol, apomorfina o piribedil. Su uso está enfocado a retardar la utilización de L-Dopa y a su administración conjunta para disminuir las alteraciones provocadas por la mono terapia con L-Dopa. La administración única de derivados ergóticos presenta varios efectos indeseados como alteraciones psiquiátricas y cardiovasculares que podrían progresar para producir infarto al miocardio y muerte. A dosis bajas producen hipotensión ortostática o arterial postural, constipación, dicinesia, confusión e insomnio. La apomorfina se ha producido en presentaciones farmacológicas rectales, intranasales, transdermales, sublinguales y subcutáneas. Su empleo presenta diferentes complicaciones principalmente debidas a su metabolización en la primera fase limitando su biodisponibilidad. Se usa en periodos “off” de la medicación con L-Dopa. Su efectividad depende de los receptores de DA en el estriado (Grandas, 2003).

2.5.2. Antioxidantes

La vitamina E y el β -caroteno entre otras sustancias poseen actividad antioxidante capaz de prevenir la peroxidación de lípidos como barreras de radicales libres. La administración de vitaminas A y C retardan la necesidad de L-Dopa hasta dos años y medio. Existen reportes de la directa relación entre la deficiencia de estas vitaminas y la incidencia de EP (Singh *et al.*, 2007). El Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) y canabidiol (CBD) reducen la muerte de neuronas dopaminérgicas de

la SN luego de la inyección unilateral de 6-OHDA en la SNc (Cui *et al.*, 2004; Lastres-Becker *et al.*, 2005; García-Arencibia *et al.*, 2007).

La melatonina o *N*-acetil-5-metoxitriptamina, una hormona descrita por primera vez por el dermatólogo estadounidense Aaron Lerner en 1958 (Strassman, 2001) sintetizada por la glándula pineal en forma cíclica a partir del aminoácido triptófano (Figura 11), se produce a bajas concentraciones de día (40 pmol/L) y altas de noche (260 pmol/L) en humanos. Curiosamente en la rata se secreta principalmente de noche pero corresponde con su etapa activa del día (Zhdanova *et al.*, 1998).

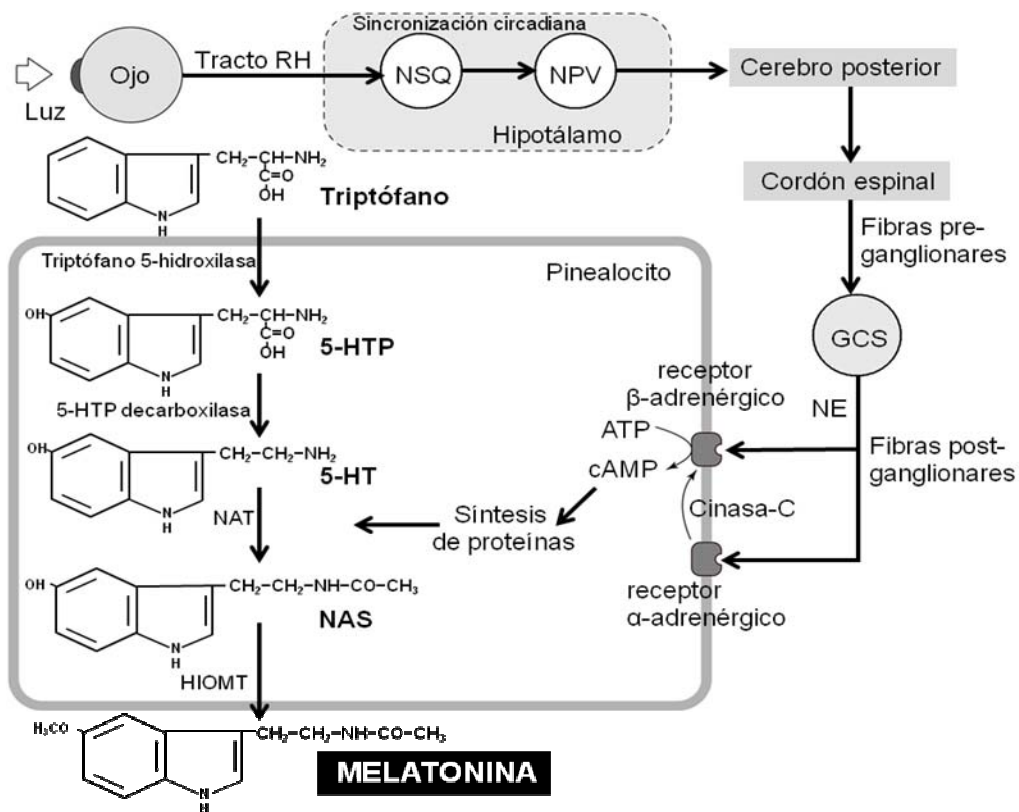


Figura 11. Síntesis de Melatonina regulada cíclicamente a partir del estímulo luminoso que se transmite por el tracto retino-hipotalámico (tracto RH) estimulando el núcleo supraquiasmático (NSQ) y posiblemente el núcleo paraventricular (NPV) en el hipotálamo. La señal continúa al cerebro anterior, al cordón espinal y al ganglio cervical superior (GCS) cuyas proyecciones norepinefrinérgicas estimulan los receptores NE de la glándula pineal donde se sintetiza la melatonina a partir del triptófano por la enzima triptófano 5-hidroxilasa produciendo 5-hidroxitriptófano (5-HTP); éste a su vez es convertido en serotonina (5-HT) o 5-hidroxitriptamina por la enzima 5-HTP decarboxilasa. Generalmente la enzima limitante para la síntesis de melatonina es la serotonina *N*-acetiltransferasa (NAT), incrementando de 30 a 70 veces en la fase oscura por estimulación norepinefrinérgica, ésta enzima convierte la serotonina en *N*-acetilserotonina (NAS). Posteriormente la hidroxindol-*O*-metiltransferasa (HIOMT) convierte la *N*-acetilserotonina en melatonina. Modificado de Arendt 1998.

La variación en sus ritmos de síntesis se reduce con la edad. Controla los ritmos circadianos, induce sueño y reduce la velocidad de procesamiento de información. Su administración exógena no altera

los ritmos circadianos, puede cruzar la barrera hematoencefálica por ser lipofílica (Willis y Maxwell, 1999; Willis y Robertson, 2004; Willis, 2005) y posee capacidad barredora de radicales libres que revierten el deterioro cerebral por senectud (Ng *et al.*, 2005). Actúa sobre el sistema inmunológico, el tracto reproductivo, la glándula tiroides, el riñón y tiene influencia sobre el estado anímico (Reiter, 1998).

En las primeras horas de la mañana, posee efecto hipotérmico, induce relajación y ligera sedación en dosis farmacológicas (Strassman *et al.*, 1991). Estimula enzimas antioxidantes e incrementa la eficiencia de la fosforilación oxidativa, estabiliza membranas celulares, reduce citocinas proinflamatorias y su adhesión molecular, es un quelante de metales, reduce la unión del factor nuclear α B (NF- α B) al DNA e inhibe enzimas pro-oxidantes (Maharaj *et al.*, 2007). Previene la autooxidación de NE y GSH y barre radicales peroxilo (ROO \cdot), OH \cdot , radical NR, los derivados de H₂O₂ e iones de cobre (Cu²⁺) (Sofic *et al.*, 2005), óxido nítrico (NO \cdot), anión peroxinitrito (ONOO⁻), ácido peroxinitroso (ONOOH), radicales haloperoxilos, y ácido hipocloroso (HOCl) (Mayo *et al.*, 1999; Reiter *et al.*, 2003).

Sus metabolitos también poseen actividad antioxidante como el N-acetil-N-formil-5-metoxikinurenamina (AFMK), N-acetil-N²-formil-5-metoxikinuramina (AMK), 3-hidroxi-melatonina cíclica y 6-hidroxi-melatonina (Maharaj *et al.*, 2007). La melatonina se metaboliza en el hígado, por hidroxilación en 6-hidroxi-melatonina; posteriormente se conjuga con ácido glucurónico y ácido sulfúrico, y se excreta por la orina en forma de su principal metabolito, 6-sulfato-hidroxi-melatonina en estrecha relación con las concentraciones séricas de melatonina (Rufo-Campos, 2002). Tras su administración intravenosa, presenta una semivida sérica que varía entre 0.5 y 5.6 minutos pues tan rápidamente como se distribuye, es eliminada. Su vida media es más larga si se administra oralmente aunque su absorción solo es del 15% aproximadamente (DeMuro *et al.*, 2000), la dosis oral de 80mg en una persona sana aumenta las concentraciones séricas entre 60 y 150 minutos posteriores a la toma, hasta en 10.000 veces el valor del pico máximo nocturno, permaneciendo estos niveles estables durante más de 90 min (Waldhauser *et al.*, 1984). Sin embargo las dosis que habitualmente se manejan oscilan entre 1 y 5 mg, con las cuales se obtiene aumento en concentraciones en plasma una hora posterior a la toma entre 10 y 100 veces el pico máximo en la noche, descendiendo posteriormente luego de 4 u 8 horas hasta la recuperación de los niveles normales. Durante el día la administración de una dosis entre 0.1 y 0.3 mg puede alcanzar los picos nocturnos máximos de concentración de los individuos sanos. En primates no-humanos la

administración oral de dosis de 0.025-3mg inhiben el movimiento de forma dosis dependiente (Zhdanova *et al.*, 1998).

La melatonina detiene el proceso apoptótico en células sin glutatión que sobreexpresan la proteína Ras, involucrada en la señalización del crecimiento celular cuya actividad produce O_2^- y H_2O_2 (Rodríguez *et al.*, 2004), incluso podría prevenir el daño apoptótico producido por anestésicos barbitúricos como el pentobarbital sódico por inducción de síntesis del péptido antiapoptótico Bcl-xL y la consecuente inhibición de la liberación de citocromo *c* y la activación de la caspasa 3 (Yon *et al.*, 2006). Administrada en dosis de 5 y 10mg/kg vía intraperitoneal (i.p.) en ratas macho, revierte parcialmente la baja en la concentración de DA, 3,4-ácido dihidroxyfenilacético, ácido homovanílico y serotonina, promovidas por la 6-OHDA e inhibe la conducta de giro inducida por apomorfina y agonistas específicos de receptores D1 o D2 (Tenn y Niles, 1995; Aguiar *et al.*, 2002). Su administración en combinación con L-Dopa reduce la formación de 6-OHDA en el estriado por metabolismo oxidativo acrecentada por la L-DOPA (Maharaj *et al.*, 2005). En ratas tratadas con melatonina incrementa la actividad de la TH y disminuye la formación de malondialdehído (Jin *et al.*, 1998).

Shaw y colaboradores en 1973, administraron oralmente una dosis diaria de melatonina por 4 semanas a 4 pacientes (tres hombres y una mujer de entre 56 y 68 años de edad) con síntomas parkinsonianos. Iniciaron con 100mg el primer día y aumentaron la dosis diariamente hasta un máximo de 1g al día en dosis divididas; los pacientes continuaron tomando sus tratamientos anticolinérgicos pero no L-Dopa. Al término de las 4 semanas de tratamiento se sustituyó el tratamiento por un placebo, pero no reportaron disminución de los síntomas parkinsonianos en ninguna etapa del estudio, solo cierta sedación. Los pacientes no mostraron alteraciones adversas (Shaw *et al.*, 1973) sin embargo a pesar de estos resultados poco prometedores las circunstancias del estudio pueden mostrar variantes importantes que explican el pobre efecto, como la alta dosis administrada, el tiempo de evolución del padecimiento, la certeza en el diagnóstico de la enfermedad y la reducida cantidad de pacientes, además de la interacción con la terapia anticolinérgica.

2.5.3. Otros agentes farmacológicos

Los inhibidores de la COMT se usan principalmente en conjunto con la L-Dopa para incrementar su biodisponibilidad cerebral. Incluyen fármacos como entacapona y tolcapona. Producen alteraciones del sueño, dicinesia, confusión e insomnio. La tolcapona puede ser hepatotóxica por lo que en

algunos países su uso es controlado. La entacapona es más útil en la reducción de fluctuaciones motoras y no altera las funciones hepáticas. Pueden producir hipotensión ortostática e incremento en el riesgo de fracturas óseas. El desarrollo de estos agentes está enfocado a la producción de fórmulas que incluyen benserazida y carbidopa además de L-Dopa para mejorar el metabolismo de la L-Dopa y la reducción de sus secuelas (Singh *et al.*, 2007). La Selegilina es un inhibidor de la MAO-B por tanto inhibe el metabolismo de la DA además de inhibir irreversiblemente la COMT, en combinación con la L-Dopa presenta efectos antiparkinsonianos. Podría actuar como neuroprotector ante el estrés oxidativo y como promotor de la liberación de factores de crecimiento neuronal. A pesar de su uso efectivo junto a la L-Dopa y de que su utilización puede retardar la necesidad de la administración de L-Dopa, su mono terapia es poco efectiva. La Rasagilina es otro inhibidor de la MAO-B que reduce la progresión de la EP y disminuye los síntomas parkinsonianos. Actualmente se espera poder aplicar su tratamiento junto a L-Dopa o algún otro compuesto como el Ladostigil (TV-3326, Npropargil- 3R-aminoindan-5il-etil metilcarbamato), un inhibidor de la carbamato colinesterasa, e inhibidor de la MAO A y B con utilidad en pacientes de EP con demencia (Singh *et al.*, 2007).

La Amantadina es un agente antiviral con efecto reductor de discinesias que bloquea la acción glutamatérgica. Promueve la liberación de DA, previene su recaptura e influencia su síntesis por mecanismos aún poco conocidos. Se ha propuesto que promueve la síntesis de receptores D2. Puede provocar inquietud, depresión, confusión y alucinaciones (Moresco *et al.*, 2002).

Los anticolinérgicos como el trihexifenidil o benzotropina son efectivos contra el temblor. Presentan ligera reducción de la bradicinesia y acinesia. Sus efectos son dosis-dependientes y pueden provocar somnolencia, confusión, agitación, alucinaciones, alteraciones en la memoria y susceptibilidad a la demencia. Ante la administración interrumpida se presentan exacerbación de los síntomas parkinsonianos (Singh *et al.*, 2007).

La nicotina, el principal alcaloide del tabaco o *Nicotiana tabacum* L. influye en la prevención de demencia senil y se ha encontrado que la concentración de receptores nicotínicos en pacientes con EP disminuye. Estos receptores promueven la liberación de DA en el estriado y tienen cierta influencia en la neuroprotección nigroestriatal; posiblemente actúan sobre los receptores nicotínicos presinápticos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ en las terminales dopaminérgicas estriatales. Puede estimular la liberación de factor de crecimiento-2 de fibroblasto neurotrófico, protegiendo la SN. La nicotina puede operar como barredor de radicales libres y previniendo la peroxidación lipídica. Sus efectos reducen el

déficit de atención y mejoran el control corporal al caminar, el uso de las manos y reducen la ansiedad por periodos cortos. En combinación con bajas concentraciones de L-Dopa en primates no humanos ofrece mejorías similares a las obtenidas con altas dosis de L-Dopa únicas reduciendo la discinesia. Estimula la disponibilidad de glucosa cerebral y la actividad de la pituitaria en procesos inflamatorios como en la EP secretando cortisona. La utilización terapéutica de nicotina sigue en experimentación debido a la manifestación de reacciones no deseadas como prurito o edema en el caso de parches de liberación progresiva, y alteraciones periféricas en cualquier otra presentación farmacológica incluyendo fumar tabaco (Giroud y Collado, 2002).

Algunos agentes antiinflamatorios inhibidores de la enzima ciclooxigenasa (COX) como la aspirina y el meloxicam (inhibidor de COX-2) poseen efectos neuroprotectores. La Aspirina puede operar como barrido de radicales libres. Algunos otros antiinflamatorios no esteroideos como celecoxib y el salicilato de sodio han mostrado capacidad de suprimir DA, por lo cual el entendimiento de los mecanismos neuroprotectores de algunos antiinflamatorios debe profundizarse (Singh *et al.*, 2007).

El Selenio es un metal contenido en el cuerpo en cantidades muy pequeñas y un componente de varias enzimas. Se le atribuyen capacidades retardadoras de la neurodegeneración. Tiene influencia en la actividad de enzimas como la GSH que convierte el H_2O_2 en agua, dimerizando la enzima a glutatión disulfuro (GSSG) (Singh *et al.*, 2007).

Los quelantes de hierro son útiles pues en la SNc hay gran concentración de este metal necesario para la síntesis de neuromelanina. El H_2O_2 en presencia de hierro puede ser reducido a radical OH, favoreciendo la peroxidación de lípidos y causando daño a constituyentes citoplasmáticos provocando degeneración neuronal. La α -sinucleína produce apoptosis en un proceso iniciado por estrés oxidativo por radicales OH, liberados por la α -sinucleína en presencia de hierro. Algunos quelantes son la desferroxiamina y el agente V-28 que en combinación con inhibidores de la MAO-B como la rasagilina comienzan a dar resultados promisorios. Sus efectos pueden disminuir la acumulación proteica y la consecuente formación de cuerpos de Lewy (Singh *et al.*, 2007).

Las hormonas esteroides como el estradiol y la dihidrotestosterona, presentes en distintas concentraciones y tiempos en ambos sexos tienen influencia en la susceptibilidad a las neurotoxinas sin que se conozcan detalladamente sus interacciones (Roberts y Bloom, 1981; Murray *et al.*, 2003). Intervienen en la maduración de las células dopaminérgicas, diferenciación y en la estimulación del crecimiento de sus neuritas en interacción con varios factores de crecimiento y neuropéptidos. Una

hormona esteroideal gonadal femenina, el estrógeno, 17- β estradiol posee varias propiedades neuroprotectoras que desaparecen en la menopausia al decrecer su síntesis. Puede regular la actividad de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y sus terminales telencefálicas en cualquier etapa del desarrollo ontogénico promoviendo por ejemplo la liberación de DA y su captación regulando la síntesis de DAT disminuyéndola ante el daño celular, también estimula la expresión de TH (Kipp *et al.*, 2006), facilita la plasticidad celular por el crecimiento de la arborización de las proyecciones por activación de receptores estrogénicos no nucleares y la estimulación en la formación de AMPc, la activación de PKA y la fosforilación de la proteína CREB, estabiliza uniones celulares y sinapsis y poseen relación estrecha con proteínas estructurales en daño celular. Puede ejercer acción neuroprotectora barriendo directamente radicales libres o indirectamente promoviendo la síntesis de glutatión. En la mitocondria regula la expresión de la citocromo c oxidasa, la homeostasis del Ca^{2+} por activación de la PI3-cinasa, y la expresión de péptidos antiapoptóticos como Bcl-2 y Bcl-xL (Azcoitia *et al.*, 2002). En células gliales y neuronas regula inhibitoriamente la síntesis de interleucinas 1 y 6, y el factor de necrosis tumoral α en cuya expresión interviene la ruta MAP-cinasa. En interacción con CaCaM-Cinasa y PKA participa en la fijación de vesículas al citoesqueleto y la estimulación que induce en la expresión de GDNF es importante para sus efectos protectores (Kipp *et al.*, 2006). Esta alternativa a la utilización de la terapia de reemplazo puede ser viable en algunos casos pero evidentemente es exclusiva para mujeres.

2.5.4. Otras alternativas

La degeneración de las neuronas de la SNc resulta en el decremento en la actividad en la vía directa de los GB en relación con la indirecta es decir el aumento inhibitorio del GPi de manera que se utiliza la ablación terapéutica del NST (talamotomía) y GPi (palidotomía), sin embargo la cirugía implica el riesgo de inducir déficit neurológico si la lesión se extiende a estructuras adyacentes (Melvin *et al.*, 2005; Talos *et al.*, 2008). La estimulación cerebral profunda (DBS) es otra alternativa que a pesar de ser invasiva es menos traumática que las escisiones específicas. Sin embargo se recurre a este procedimiento solo cuando el paciente cubre determinado perfil y los tratamientos farmacológicos son ineficaces, produciendo alteraciones motoras incapacitantes (Kopell y Greenberg, 2008). En pacientes con EP, la estimulación unilateral del GPi disminuye la dicinesia contralateral parcialmente, tal efecto es mejorado con el tratamiento con L-Dopa. Cuando el GPi se estimula bilateralmente mediante DBS el beneficio puede ser máximo aún sin tratamiento con L-Dopa (Melvin *et al.*, 2005). En México se realizan intervenciones en pacientes con EP en instituciones como el Hospital General de México, el Instituto Nacional de Neurología y

Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre o el Hospital Médica Sur (ISSSTE, 1999; Del Valle, 2002; Secretaría de Salud, 2002).

Aunque se han realizado varios trasplantes desde hace muchos años en pacientes con EP, aún persisten controversias sobre de la eficacia de este tratamiento. El trasplante de tejido fetal y la cirugía funcional permite la total restauración de la capacidad funcional neuronal con mínimos efectos de rechazo inmunológico, logrando incluso la suspensión de la terapia con L-Dopa, sin embargo la mayoría de los reportes sobre esta técnica refieren la utilización de tejido mesencefálico ventral de embriones humanos, lo cual implica un dilema ético además de la dificultad de obtención del tejido, y la necesidad de una cantidad sustancial de tejido para que sea eficaz. Las células troncales de la médula ósea e incluso células epiteliales son otra alternativa de gran potencial para desarrollar neuronas dopaminérgicas maduras y funcionales. A pesar de los buenos resultados en fase pre clínica la supervivencia del tejido injertado es baja, cerca del 90% del tejido no sobrevive. Otro inconveniente es la carencia de estudios de los efectos de estos trasplantes en el largo plazo, por lo que la utilización como herramienta común en el tratamiento de la EP es todavía lejano (Singh *et al.*, 2007). La exposición a campos magnéticos en pacientes con EP ha mostrado efectos benéficos en la disminución de los episodios tipo “on-off” por la terapia con L-Dopa. Se piensa que su efecto podría estar mediado por la glándula pineal al encontrarse que induce aumento en la liberación de melatonina (Sandyk, 1992), además en ratas recién nacidas lesionadas con 6-OHDA, la exposición a campos magnéticos reduce la reactividad de receptores D1 (Sieroñ *et al.*, 2001), aunque la información al respecto es escasa.

2.5.5. Terapia génica

El trasplante de tejido transgénico en la EP es otra alternativa al trasplante. Para implantar determinadas secuencias de material genético cuya expresión o inhibición de productos beneficie al paciente con EP se utilizan virus, hongos o bacterias que repliquen secuencias determinadas, como de producción de TH, guanosa trifosfato ciclohidrolasa I, transportador vesicular de monoaminas (TVM), o DDC. Otras secuencias útiles, son las que intervienen en la diferenciación de tejido, como factor de crecimiento transformante tipo β (TGF- β) o los factores neurotróficos derivados del cerebro (BDNF) (Lapchak *et al.*, 1993). La diferenciación del tejido dopaminérgico está mediada por TGF- β y factores morfogénicos óseos (BMP). Los GDNF inducen la restauración de la actividad de la SN y promueven la supervivencia celular (Borgal *et al.*, 2007). Muchos estudios cuestionan la eficacia de estos resultados pues no se sabe aún si existen secuelas de dicho tratamiento. Los beneficios dependen en gran parte de la presencia de otros factores que permitan la

correcta asimilación fisiológica del tejido y sistemas gliales de sustento y reparación. La nanotecnología para desarrollar posibles ligandos, sectores de DNA, secuencias específicas o fármacos experimental es una alternativa que por el momento tiene mucho que desarrollar (Kabanova y Gendelman, 2007).

3. JUSTIFICACIÓN

La etiología de la EP muestra una estrecha relación con el estrés oxidativo que se incrementa con la terapia con L-Dopa. En el laboratorio de Neuromorfología de la UIICSE en la FES Iztacala de la UNAM, los estudios realizados sobre el efecto a corto plazo de la melatonina en ratas lesionadas con 6-OHDA en la vía nigroestriatal sugieren la posible disminución del daño citológico y conductual post-lesión, por lo tanto se llevó a cabo un estudio mediante este modelo animal en ratas hembra de la cepa Wistar tratadas con melatonina para conocer sus efectos en el largo plazo y si la combinación con L-dopa es terapéuticamente efectiva.

4. OBJETIVO GENERAL

Comparar el efecto de la L-Dopa, la Melatonina y la combinación de ambas sobre la citología del cuerpo estriado y sustancia *nigra* y sobre la conducta motora de ratas hembra lesionadas unilateralmente con 6-OHDA en el mfb.

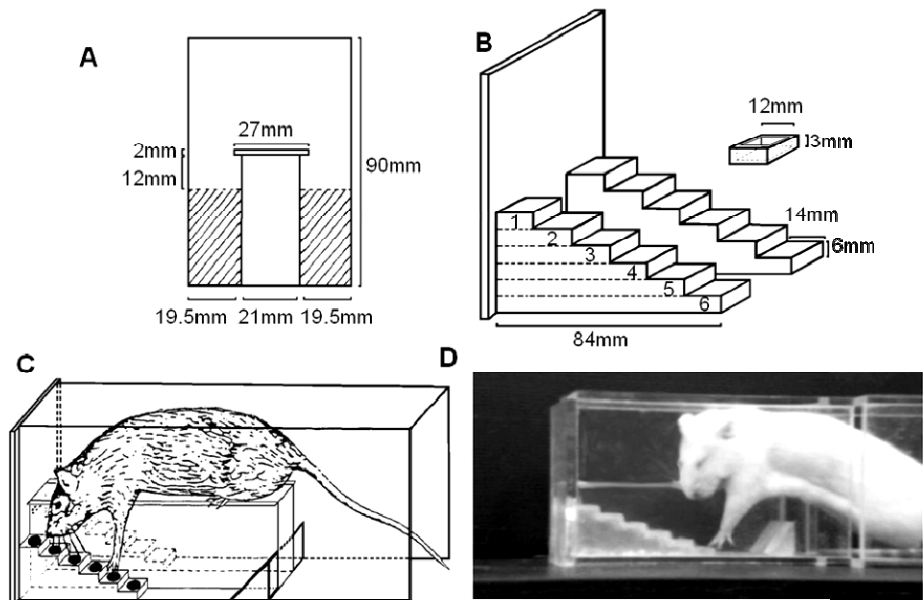
4.1. Objetivos particulares

- Comparar las alteraciones estructurales (número de espinas dendríticas) de neuronas espinosas medianas del cuerpo estriado ipsi y contralateral de los grupos con y sin tratamiento aplicando el método de impregnación argéntica de Golgi para la preparación de las muestras.
- Comparar el número de neuronas inmunorreactivas a tirosina hidroxilasa en la SNc ipsi y contralateral a la lesión, de organismos con y sin tratamiento, mediante inmunocitoquímica anti-tirosina hidroxilasa para la preparación de las muestras.
- Evaluar y comparar la conducta motora a través de las pruebas de escalera (conducta motora fina), ascenso sobre vigas (conducta motora fina) y campo abierto (conducta motora gruesa) entre los grupos.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 30 ratas hembra de la cepa Wistar, con un peso inicial de 180 a 200g, mantenidas en condiciones de laboratorio con foto-periodo de 12/12h (luz-obscuridad), con libre acceso al alimento y al agua. Cada rata se entrenó para realizar pruebas conductuales y motoras específicas (Biernaskie, *et al.*, 2004) antes de la lesión para seleccionar a los organismos de estudio. La prueba de “escalera” es una variante de la utilizada por Montoya y colaboradores (1991). 24 horas antes de iniciar el entrenamiento en la escalera, las ratas fueron privadas de alimento. La escalera es un dispositivo plástico con una plataforma intermedia entre dos escaleras de 6 escalones a cada extremo que contenían fragmentos de su comida habitual. La prueba se llevó a cabo durante siete días consecutivos durante los cuales se les restringió el alimento a dos porciones por rata. (Figura 12).

Figura 12. Dispositivo de acrílico para la prueba de habilidades manuales en la escalera. A, pared anterior de acrílico. B, escalera de seis peldaños para colocar fragmentos de comida a ambos lados de la plataforma intermedia. C y D, organismos durante la prueba. Se contó el número de fragmentos comidos por lado en un lapso de 10 minutos. Modificado de Montoya *et al.*, 1991.



Se eligieron para experimentación solo ratas que consumieron 6 o más fragmentos de comida en el séptimo día de entrenamiento en un periodo no mayor a diez minutos. Se registró cuántas veces falló en sus intentos por tomar los fragmentos por cada lado y cuántas veces los tiró de su escalón sin poderlas llevar a su hocico (datos no mostrados). Luego de la selección las ratas tuvieron alimento sin restricción hasta la siguiente evaluación. Otra actividad evaluada fue el tiempo de ascenso sobre dos vigas de madera de distintos espesores (6 y 12mm) dispuestas diagonalmente (Figura 13).



Figura 13. Viga de 12mm dispuesta diagonalmente a 25° de inclinación con respecto al piso para el ascenso de ratas, Se usaron vigas de dos espesores diferentes, 6 y 12mm.

El entrenamiento para esta prueba comenzó en el tercer día de entrenamiento en la escalera. Se escogieron para experimentación aquellas ratas que subieron cada viga sobre su canto en menos de dos minutos en el noveno día de entrenamiento consecutivo a partir del inicio en la escalera (Avila-Costa *et al.*, 2007a). La prueba de campo abierto se realizó dos días después de seleccionar las ratas en la prueba de viga. Se colocaron una a la vez en un espacio de 2 por 2m, con marcas cuadrículares en el piso de 25 por 25cm aproximadamente. Luego de un periodo de ambientación de 5 minutos se registró su actividad por diez minutos: cuántas líneas cruzó en su desplazamiento, cuántas veces se acicaló, cuántas veces se irguió y cuánto tiempo permaneció sin movimiento en un periodo de diez minutos (Figura 14).

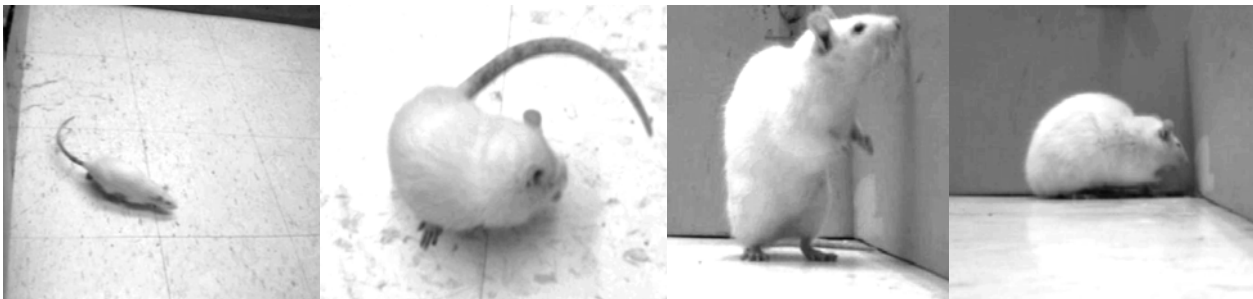


Figura 14. Imágenes obtenidas durante la prueba de campo abierto. De izquierda a derecha se muestra la actividad registrada. Cuántas líneas cruzaron, el número de acicalamientos, cuántas veces que se irguieron y el tiempo que permanecían sin movimiento en un lapso de 10 minutos, posteriores a los cinco minutos de ambientación.

Terminado el entrenamiento y selección se lesionaron quirúrgicamente siendo inicialmente anestesiadas con pentobarbital sódico vía i.p. en dosis de 35mg/kg. Ya anestesiadas se montaron en un aparato estereotáxico donde se realizó un trépano con un taladro pequeño (Moto tool, Dremel) en la posición específica respecto de bregma (Figura 15) AP=-2.9mm; L=1.6mm y V=8.1mm a partir de la duramadre, que indican Paxinos y Watson (1986) para ubicar el mfb del hemisferio izquierdo

contralateral a la lesión (derecho). Se tomaron para el estudio las ratas que giraron más de 200 veces en un periodo no mayor a 30 minutos, pudiendo repetir esta prueba por dos días consecutivos en caso de no llegar a los 200 giros en primera instancia. Las ratas no lesionadas correctamente, se sustituyeron con otras, las cuales fueron entrenadas y seleccionadas de la misma manera que las lesionadas correctamente hasta alcanzar el número experimental deseado (N= 30). Se distribuyeron en cinco grupos experimentales: Grupo I Control (n=6); Grupo II (lesión 6-OHDA) sin tratamiento (n=6); Grupo III (lesión 6-OHDA) tratadas con L-Dopa (Sinemet 25mg/mg comprimidos, Merk Sharp & Dome) (n=6); Grupo IV (lesión 6-OHDA) tratadas con melatonina y L-Dopa (n=6) y Grupo V (lesión 6-OHDA) tratadas con melatonina (M5250, Sigma) (n=6) (Figura 17).

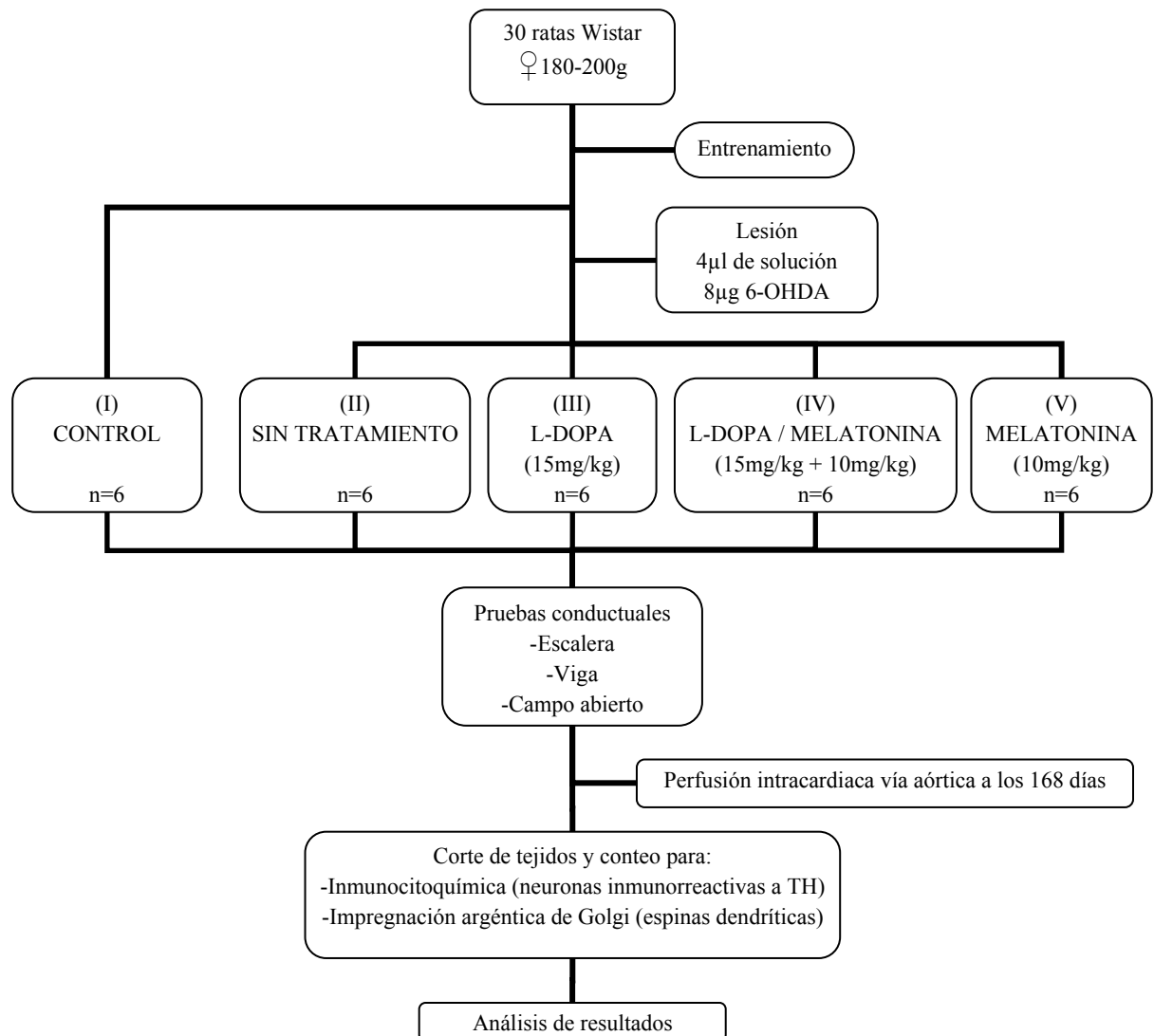


Figura 17. Procedimiento general para la realización del presente estudio. Se mantuvieron cinco grupos experimentales de seis organismos cada uno, bajo diferentes condiciones. Grupo I, Control; grupo II, lesión sin tratamiento; grupo III, lesión tratado con L-DOPA; grupo IV, lesión tratado con L-DOPA mas Melatonina y grupo V, lesión tratado con Melatonina.

Después de 24 horas de la prueba de giro, comenzó la aplicación de los tratamientos particulares para los grupos III, IV y V durante 168 días. El grupo III recibió una dosis diaria de 15mg/kg de L-Dopa por vía oral (media pastilla disuelta en 5ml de agua, se tomó la cantidad correspondiente al peso y se administró oralmente mediante una jeringa de 1 ml sin aguja). Al grupo IV se le administró una dosis diaria de melatonina más 15mg/kg de L-Dopa por vía oral (la cantidad de melatonina correspondiente al peso se mezcló en un recipiente con la dosis de L-Dopa para administrarse juntos). El grupo V recibió una dosis diaria de melatonina (10mg/kg) vía oral (mezclada con Cerelac de Nestlé en proporción 1:1 diluida con un poco de agua). Los grupos I y II se mantuvieron sin tratamiento por el mismo periodo. Se repitieron las pruebas de escalera, viga y conducta libre cada siete días posteriores a la lesión durante el primer mes, luego de este periodo se evaluaron cada catorce días.

Pasado el tiempo de aplicación de tratamientos, se realizó la perfusión intracardiaca por vía aórtica; inicialmente con solución salina isotónica (0.9% NaCl) seguida de fijador (glutaraldehído al 2% y paraformaldehído al 2% en buffer de fosfatos salino (PBS) 0.1M) (Avila-Costa *et al.*, 2007a). Ya perfundidas se extrajeron los cerebros y se colocaron en fijador. Posteriormente se realizaron cortes coronales en un vibratomo (Pelco 101 de Ted Pella Inc.) para tomar fragmentos del estriado ipsilateral y contralateral a la lesión para procesos de microscopía de luz (incluidos en resina) y con un microtomo mecánico para técnica de Golgi (por impregnación argéntica con nitrato de plata). Para la prueba inmunocitoquímica para tirosina hidroxilasa se realizaron cortes coronales de 50 μm de espesor con el vibratomo para obtener muestras del mesencéfalo ventral que incluyen la SN. Estas muestras se procesaron para la tinción selectiva con el anticuerpo para TH (TH AB152, Chemicon International; Elite Vectastain ABC kit, Biotinylated Anti-Mouse IgG [H+L] hecho en caballo) (Avila-Costa *et al.*, 2007a).

Se realizó el análisis inmunocitoquímico por conteo del número de neuronas inmunorreactivas a TH en 1500 μm^2 de la SNc ipsi y contralateral (Figura 18) en 7 cortes por cerebro con ayuda de una cámara (Moticam 1000 de Motic, y el software Motic Images Plus2.0ML) acoplada a un microscopio óptico (Nikon). Se contaron las espinas dendríticas de cinco dendritas secundarias de 10 neuronas espinosas medianas del estriado ipsi y contralateral en un segmento de 10 μm posterior a los 10 primeros micrómetros de la dendrita secundaria a partir de su bifurcación de la dendrita primaria (Figura 19). El análisis estadístico utilizado fue ANOVA y prueba de Tukey con el software Sigma Stat versión 3.1 tanto de los datos citológicos como conductuales (Avila-Costa *et al.*, 2004).

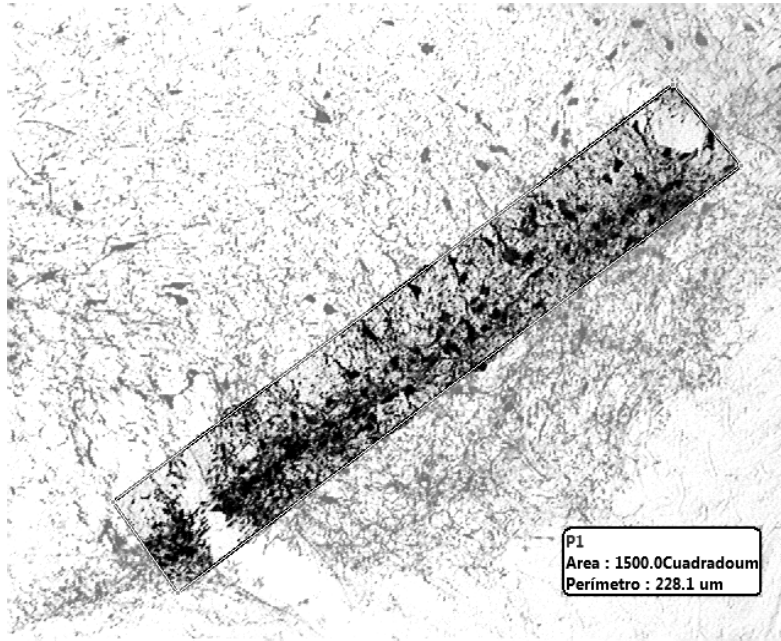


Figura 18. Detalle de corte coronal en el que se muestra una sección de la SNc, marcada con el anticuerpo para TH. Se contaron las neuronas inmunopositivas a TH en un área de $1500\mu\text{m}^2$. (100X).

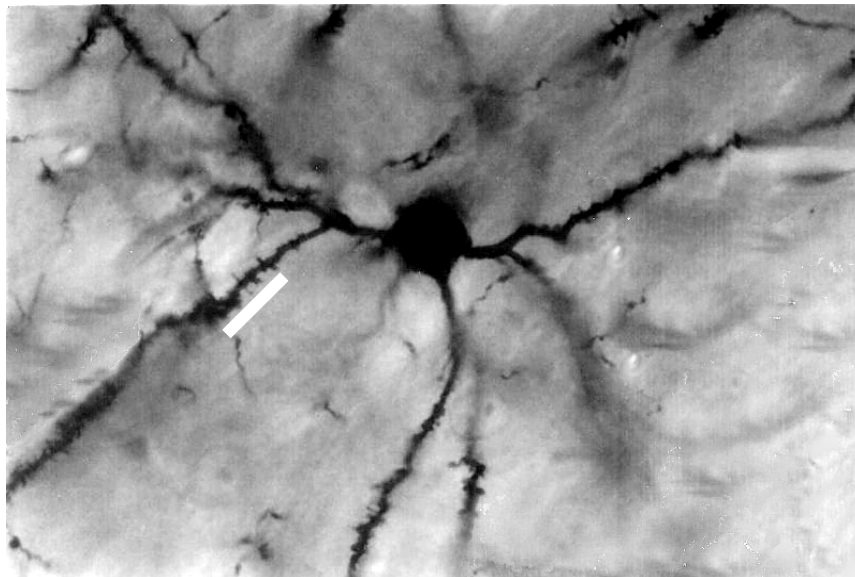


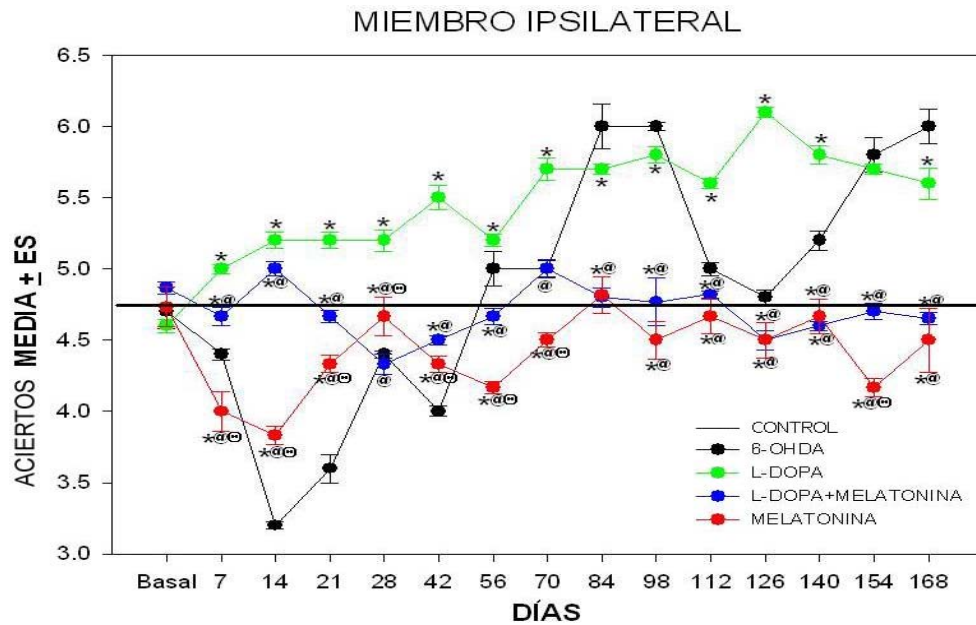
Figura 19. NEM del estriado tratado con impregnación argéntica de Golgi. Se contaron las espinas dendríticas en dendritas secundarias a lo largo de $10\mu\text{m}$ (barra blanca) (400X).

Los procedimientos realizados sobre los organismos en este estudio corresponden a la categoría D de la “Clasificación de actividades experimentales de acuerdo al grado de invasión, molestia o daño producido sobre los animales de laboratorio” que establece la NOM-062-ZOO-1999, “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” a la que se atendió durante el desarrollo de este experimento.

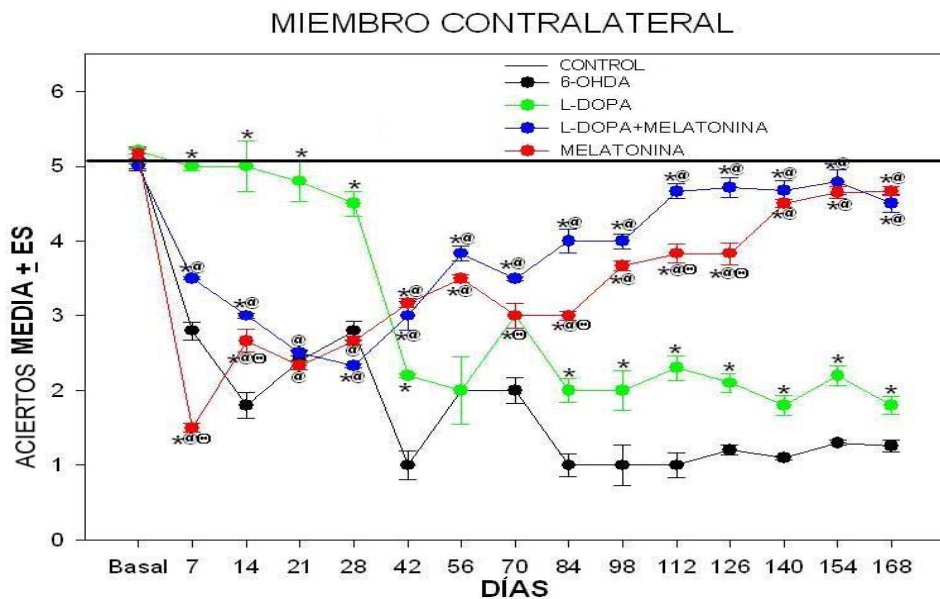
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Conducta: Escalera

En el presente estudio los resultados obtenidos en la prueba de escalera fueron significativamente diferentes entre los distintos tratamientos aplicados. Se ilustran en las gráficas 1A-B.



Gráfica 1A. Resultados obtenidos en la prueba de escalera con el miembro ipsilaterales. Se presentan los fragmentos comidos a cada lado del dispositivo. * Tratamientos vs Lesión con 6-OHDA. @ L-Dopa/melatonina y Melatonina vs L-Dopa. Θ L-Dopa/melatonina vs Melatonina. $P < 0.05$.



Gráfica 1B. Resultados del miembro contralateral.* Tratamientos vs Lesión con 6-OHDA. @ L-Dopa/melatonina y Melatonina vs L-Dopa. Θ L-Dopa/melatonina vs Melatonina. $P < 0.05$.

Los niveles de efectividad del grupo control en ambas extremidades se mantuvieron prácticamente iguales a los basales durante todo el estudio (línea negra horizontal). La actividad de la extremidad contralateral del grupo únicamente lesionado se observó severamente afectada durante todo el estudio, difiriendo de su miembro ipsilateral, que sufrió déficit los primeros 14 días y a partir de entonces denotó la tendencia a la efectividad logrando niveles basales desde los 56 días, incluso siendo utilizada para tratar de asir los fragmentos de comida del otro lado del dispositivo. El tratamiento con L-Dopa mantuvo la actividad de ambas extremidades apreciablemente similar a los niveles basales y al grupo control por un periodo aproximado de 28 días, momento en el que la actividad ipsilateral se volvió más efectiva y la contralateral decayó permaneciendo así hasta los 168 días. Encontramos buen desempeño en las extremidades contralaterales en los animales tratados con melatonina sola y en combinación con L-Dopa. Ambos grupos se notaron poco efectivos cerca de los primeros 28 días, posteriormente su tendencia a la mayor efectividad continuó hasta el término del estudio tanto en extremidades contralaterales como ipsilaterales.

La extremidad ipsilateral en el grupo con combinación farmacológica fue prácticamente igual a la basal y al grupo control durante todo el estudio. Su lado contralateral comenzó en niveles bajos respecto a la basal hasta los primeros siete días, luego la tendencia a la mejoría la llevó a niveles casi basales desde los 112 días. El grupo tratado con melatonina única, comenzó en niveles inferiores a los basales siete días después de la lesión en la extremidad contralateral y 14 días en la ipsilateral, mejorando a niveles basales a los 140 días en contralateral y 28 en ipsilateral.

Los organismos en la prueba de la escalera requieren de precisión en su ejecución, coordinación e integración sensorimotora, haciendo uso de sus funciones motoras finas (Winkler *et al.*, 2002). Se distinguen al menos 3 movimientos complejos en esta acción incluso inducibles mediante microestimulación cortical en la rata. Movimiento de búsqueda mediante el tacto con la palma hacia abajo (pronación) y el codo y el hombro flexionados rostralmente. Movimiento de sujeción por la contracción de los dígitos y movimiento de retracción caudal de la extremidad desde el hombro al codo (Ramanathan *et al.*, 2006) (Figura 20). Los movimientos siguientes consisten en girar la muñeca con la palma hacia arriba (supinación), dirigir la porción de comida hacia el hocico y liberarla con ligera relajación de los dígitos (Galván, 2000). Se piensa que la realización de estos últimos movimientos en tal secuencia es más compleja, debido a la incapacidad para recrearse

mediante micro estimulación cortical y a que en condiciones patológicas el tratamiento farmacológico no revierte del todo la deficiencia de estos movimientos (Melvin *et al.*, 2005).

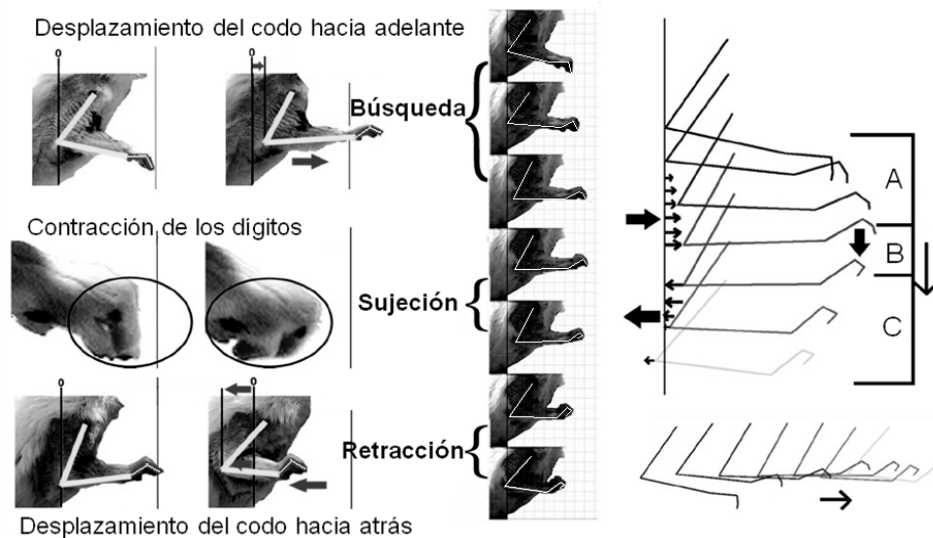


Figura 20. Movimientos complejos ejecutados durante la acción de tomar alimento en la escalera. Al centro se muestra la secuencia de movimientos en cada etapa y a la derecha la esquematización computarizada de la movilidad de las articulaciones. A. Búsqueda, caracterizada por el desplazamiento rostral del hombro y codo con ligero giro de la muñeca (pronación). B. Movimiento de sujeción, caracterizado por la contracción simultánea de todos los dígitos. C. Retracción, caracterizada por el desplazamiento caudal del codo y la pata. Las flechas indican la dirección del movimiento. Modificado de Ramanathan *et al.*, 2006.

Estos movimientos son realizados de forma parecida en el hombre al realizar una tarea similar (Figura 21), sin embargo en él, la jerarquización sensorial varía para formular una estrategia adecuada para ejecutar la tarea. La ubicación visual del objetivo es más importante que el tacto y el olfato (Whishaw *et al.*, 2002) a diferencia de la rata en la cual, la principal guía sensorial es el olfato, seguido del tacto y la visión (Montoya *et al.*, 1991).

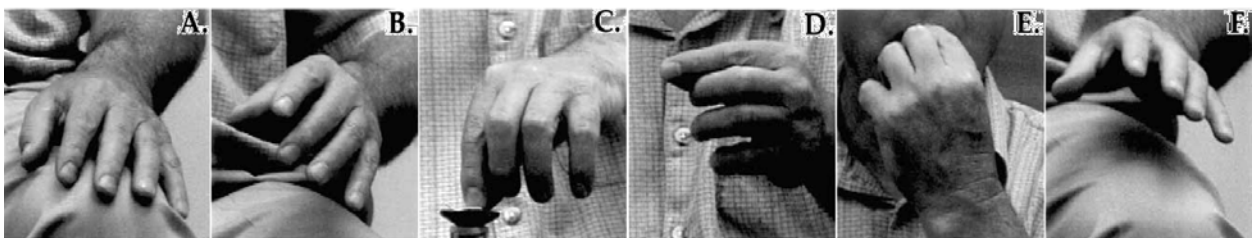


Figura 21. Movimientos requeridos en el humano para tomar una porción de comida, en un ejercicio similar al de la prueba de escalera en ratas. A) Comienzo desde la pronación de la mano. B) Avance mediante la flexión del hombro y el codo, los dígitos se abren en proporción al objeto a tomar. C) Asimiento por la contracción de los dígitos. D) Transporte del objeto con ligera supinación y mantenimiento de la presión de los dígitos. El codo se contrae y se desplaza diagonalmente el antebrazo hacia la boca. E) Liberación del objeto relajando los dígitos una vez que la mano se encuentra en posición completamente supinada sobre la boca. F) Reposición de la mano en posición de inicio con pronación de la muñeca y flexión del codo y giro del hombro en secuencia inversa. Modificado de Whishaw *et al.*, 2002.

En pacientes con EP y en ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA, la realización de este ejercicio es anómala y a pesar de que pueden ejecutar completa la secuencia de movimientos y obtener el alimento exitosamente, el tiempo de ejecución es más largo y la coordinación de las partes del cuerpo es diferente en comparación con los sujetos sanos. Los movimientos de supinación y pronación son limitados y la fuerza de sujeción o contracción de los dígitos es menor a los sujetos normales (Whishaw *et al.*, 1997; Whishaw *et al.*, 2002). El protocolo general para motivar la ejecución en esta prueba requiere de la restricción del alimento de forma que disminuya el peso de la rata 10% de lo normal (Montoya *et al.*, 1991). En estas circunstancias se produce estado de ansiedad en las ratas, realizando movimientos rápidos poco precisos de las extremidades dificultando la prueba de toma de alimento (Smith y Metz, 2005).

Existe diferencia en la topografía del procesamiento de la realización del movimiento y su planeación estratégica a nivel de ganglios basales y corteza (Melvin *et al.*, 2005). El control deficiente de los movimientos de las extremidades anteriores está directamente relacionado con la depleción dopaminérgica en la parte ventrolateral del estriado (Salamone *et al.*, 1993). Aproximadamente dos semanas después de la lesión en el mfb, la degeneración dopaminérgica en el estriado comienza a manifestarse funcionalmente como rigidez y acinesia en las extremidades (Chang *et al.*, 1999). La recuperación ipsilateral en el grupo lesionado puede ser el resultado de diferentes procesos de compensación ante la depleción de DA, como el incremento en la concentración de DA en el espacio extracelular en el estriado contralateral después de 3 a 4 semanas de la lesión. Incluso para auxiliarse al tomar el alimento las ratas desarrollan nuevas estrategias de movimiento ipsilateral como aumento de la presión en los dígitos, además de la inclinación de la cabeza, uso de la lengua y los dientes (Whishaw *et al.*, 1997). En ratas lesionadas y en pacientes con EP se manifiesta daño en la sensibilidad olfatoria, siendo de mayores implicaciones en la rata por su dependencia de esta capacidad para la localización del alimento (Montoya *et al.*, 1991).

Los aciertos en la prueba de escalera (fragmentos comidos) se han correlacionado directamente con el número de neuronas inmunorreactivas a TH en el hemisferio ipsilateral (Abrous *et al.*, 1992; Pavón *et al.*, 1998). El estudio de Galván correlaciona la deficiencia motora contralateral en la prueba de la escalera con la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SN, de las fibras reactivas a TH en el estriado ipsilateral y el mayor número de giros inducidos con apomorfina, así como con la disminución de DA en el estriado ipsilateral (Galván, 2000). La lesión con 6-OHDA en la vía dopaminérgica nigroestriatal produce alteraciones al sistema de recompensa procesado en el sistema mesoestriatal. Estas alteraciones han sido propuestas como homólogas de las producidas en pruebas

de secuenciación y recompensa en pacientes con EP (Schultz, 2002). Las neuronas de la SNc presentan alta actividad fásica ante señales que le permitan la predicción de una recompensa, lo que es de gran importancia en procesos de aprendizaje y secuenciación señal-recompensa pues esta habilidad de aprendizaje se requiere intacta para el buen desempeño de una prueba basada en la motivación inducida por la privación del alimento con alimento como recompensa y refuerzo (Schultz *et al.*, 1993; Winkler *et al.*, 2002). La ruta nigroestriatal modula la plasticidad córticoestriatal y ante el daño en este sistema en la EP, se vuelve necesario el desarrollo de más entrenamiento para aprender una tarea específica, por la necesidad de utilización de estrategias de aprendizaje diferentes de la asimilación en la memoria no declarativa procesada en el estriado, dependiendo más del sistema cortico hipocampal (Shohamy *et al.*, 2008).

La L-Dopa administrada a pacientes con EP mejora la respuesta en pruebas de velocidad en la toma de objetos sobre una superficie plana, pero no mejora la calidad del movimiento en la secuencia completa. Mejora la proyección y retracción del hombro y codo, así como en la contracción de los dígitos pero no las anomalías en la pronación y supinación (Melvin *et al.*, 2005). En periodos “off”, las deficiencias de ejecución de tareas de secuenciación y aprendizaje son más marcadas, como secuela del deterioro del sistema dopaminérgico mesencefálico, el cual es propuesto como sistema de corrección de errores. Este sistema se basa en el refuerzo de señales para el aprendizaje que adquiere con cierta flexibilidad a través de la constante retroalimentación de señales y su relación con la obtención de la recompensa (Shohamy *et al.*, 2005). La administración de L-Dopa exógena aumenta la liberación de DA en las neuronas dopaminérgicas remanentes (Harden y Grace, 1995), lo que explica el mejoramiento en la extremidad ipsilateral. Otro mecanismo propuesto para la restitución de DA en el estriado por la L-Dopa, es a través de la inducción de la liberación de DA en neuronas no dopaminérgicas que expresan la enzima dopa decarboxilasa (DDC) como las NEM en sus proyecciones internas en el estriado, la glía (Miller y Abercrombie, 1999) y en las terminales de neuronas serotoninérgicas en el estriado (Tanaka *et al.*, 1999). Al parecer estos recursos no son suficientes para mantener el beneficio farmacológico en el largo plazo posiblemente por el avance de la degeneración en el estriado y (Dowd y Dunnett, 2005; Shohamy *et al.*, 2005) en el núcleo dorsal del Raphe de donde provienen las aferencias serotoninérgicas al estriado (Grandas, 2003).

Observamos movimientos repetidos y rápidos en el grupo lesionado sin tratamiento y tratado con L-Dopa. La extremidad contralateral la movían poco y tendía a quedarse flexionada, un signo claro de hipocinesia y rigidez, agitaban la extremidad ipsilateral sin sentido en el vacío, correspondiendo con los resultados de Winkler y colaboradores (2002) con la manifestación de dicinesia afectando

músculos axiales y proximales a las extremidades anteriores después de la denervación dopaminérgica en el estriado ventrolateral. Ellos indican que la manifestación de estos movimientos también se ve promovida por la predisposición a la tolerancia a la L-Dopa, el número de neuronas inmunorreactivas a TH o la disminución en la unión de DA a sus receptores, la sobreexpresión de preproencefalina y prodinorfina además por procesos postsinápticos como la actividad de proteínas FosB y Δ FosB acrecentada por la L-Dopa. El resultado de esta sobreexpresión de proteínas resulta en la intermitente y anormal estimulación de los receptores remanentes de DA sobresensibilizados por la denervación dopaminérgica nigroestriatal (Andersson *et al.*, 1999). Se presenta sensibilización local a la L-Dopa se da si la denervación de la vía nigroestriatal es superior al 80-95 % suprimiendo la DA en la porción medial del caudado y putamen no pudiendo compensar la pérdida dopaminérgica en la parte lateral del estriado (Winkler *et al.*, 2002) lo que influye en la manifestación de Mía orolinguales, en los labios y en músculos axiales del cuerpo y la cabeza por estar relacionados con la falta de DA en la porción lateral del estriado (Andersson *et al.*, 1999).

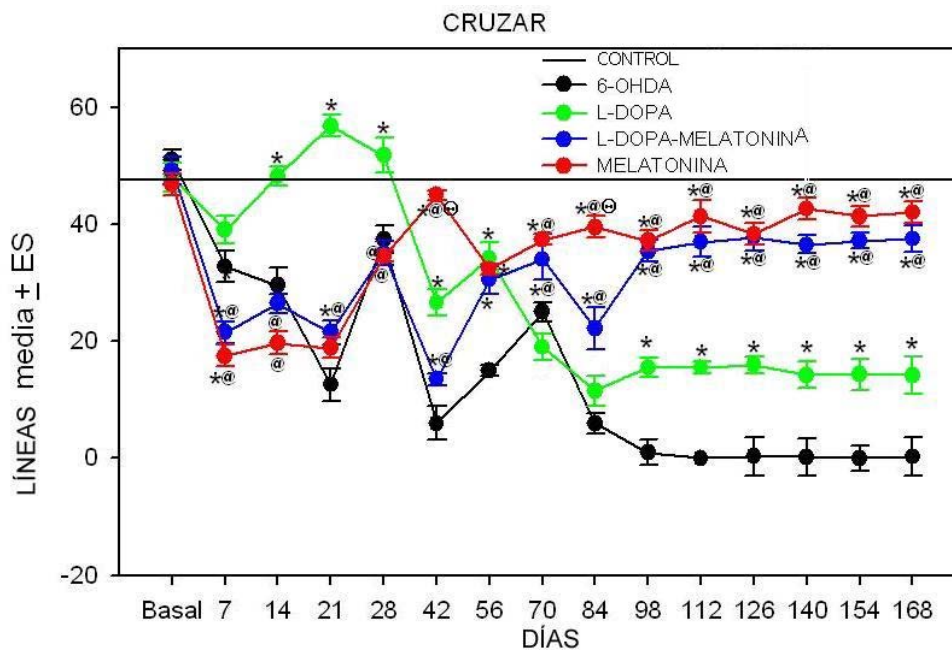
Los grupos tratados con la combinación y con solo melatonina tuvieron buen desempeño en esta prueba, por lo cual tal vez estos tratamientos tengan influencia sobre los mecanismos que causan el déficit motor, permitiendo la restitución de la DA en el estriado, la desinhibición de los núcleos talámicos (Talos *et al.*, 2008), o la estimulación del globo pálido relacionada con la mejora en la supinación, pronación y el movimiento de las puntas de los dedos (Melvin *et al.*, 2005). En pacientes con EP como en ratas lesionadas, el uso de las porciones proximales (hombro, codo y brazo) al cuerpo es predominante sobre las distales (dígitos, palma, muñeca), que realizan movimientos reducidos. En la prueba de la escalera el movimiento de las porciones distales al cuerpo es primario, incluso para la rápida ejecución de la secuencia completa (Whishaw *et al.*, 2002).

En nuestro estudio los movimientos distales fueron mejorados en las extremidades contralaterales de las ratas tratadas con melatonina y melatonina mas L-Dopa, sugiriendo la influencia de la melatonina a nivel anatómico y funcional en el control de la presión, contracción y proyección de los dígitos, la pronación y supinación de la palma de la pata. Puesto que la melatonina no altera el patrón de alimentación de los organismos bajo tratamiento, la toma de alimento no disminuyó a lo largo de 12 semanas de tratamiento en comparación con los controles como lo indica el estudio de Wolden (Wolden-Hanson *et al.*, 2000), esto nos sugiere la motivación persistente en los grupos tratados con melatonina para la realización de la prueba a pesar de sus efectos sedantes reportados por otros investigadores que pudieran disminuir la ansiedad (Shaw *et al.*, 1973; Strassman *et al.*,

1991). El estudio de Singh y colaboradores sobre el efecto de la melatonina en ratas lesionadas con 6-OHDA, en la ejecución de la prueba de escalera muestra mejoría en ambos miembros con progresiva recuperación cinco semanas después de la lesión, correspondiendo con nuestro estudio en el que la recuperación es constante. Su grupo con melatonina (500µg/kg i.p.) obtuvo el doble de efectividad comparado con su control. Los autores sugirieron la posible estimulación de la melatonina sobre enzimas barredoras de radicales libres como SOD, glutatión reductasa (GR) y GPx, que intervendrían sobre los radicales libres formados a partir de la OHDA (Singh *et al.*, 2006) e incluso los de la L-Dopa (Rocchitta *et al.*, 2006).

Conducta: Campo abierto

Los resultados obtenidos en el presente estudio, en el número de líneas cruzadas en el campo abierto se muestran en la gráfica 2.



Gráfica 2. Resultados de la prueba de campo abierto. Se registró el número de líneas cruzadas en su desplazamiento. * Tratamientos vs Lesión con 6-OHDA. @ L-Dopa/melatonina y Melatonina vs L-Dopa. Θ L-Dopa/melatonina vs Melatonina. P< 0.05.

La actividad de los organismos del grupo control (I) en el campo abierto fue muy similar a la evaluación basal de todos los grupos (línea negra transversal). El grupo solo lesionado disminuyó notablemente su actividad cruzando menos líneas que antes de la lesión durante todo el estudio. A los 98 días, no cruzaban más de 5 líneas. El grupo con L-Dopa se mostró activo cruzando líneas casi como en la evaluación basal solo hasta 28 días post lesión, pasado este tiempo sus desplazamientos disminuyeron hasta estabilizarse a los 84 días. El grupo con combinación melatonina+L-Dopa mostró decremento en su movilidad en el campo abierto hasta los 21 días, a partir de entonces las

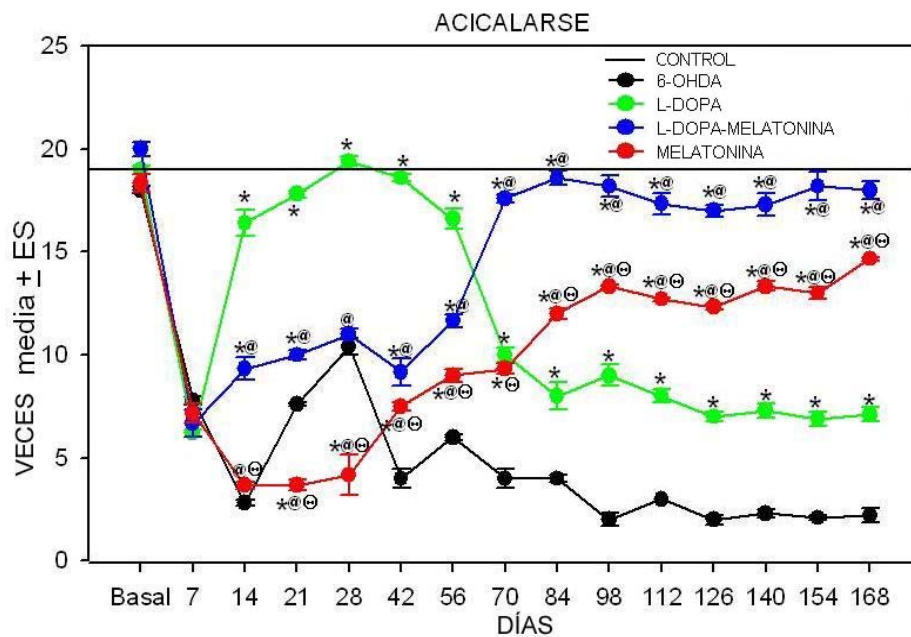
líneas que cruzaban aumentaron casi a niveles basales a los 98 días manteniéndose estables el resto del estudio. La actividad del grupo solamente con melatonina fue más estable aún que el grupo con la combinación. Este grupo también disminuyó su movilidad hasta los 21 días y a partir de entonces su actividad incrementó a niveles casi basales a partir de los 42 y por el resto del estudio.

El campo abierto es una prueba en la que se puede evaluar la conducta motora gruesa sobre la cual hay efectos por la lesión dopaminérgica y tratamientos farmacológicos aplicados (Metz *et al.*, 2000). Se presentan variaciones en la conducta exploratoria de hembras en el campo abierto, iniciando con alta actividad, disminuyendo con el número de exploraciones después de habituarse al lugar de la prueba. Las hembras normalmente se valen de referencias visuales externas para orientarse en él. Los ciclos estrales afectan la actividad exploratoria, durante el estro incrementándola (Tropp *et al.*, 2001), el ciclo en la rata generalmente dura entre 4 y 5 días (Illera *et al.*, 1991). Los organismos mantenidos bajo régimen de privación de comida, manifiestan ansiedad, reflejada en la mayor actividad locomotora y exploratoria (Smith y Metz, 2005), sin embargo la habituación al lugar puede disminuir la conducta exploratoria en las primeras evaluaciones en condiciones control (Tropp *et al.*, 2001).

La L-Dopa produce mejoría en el desplazamiento independientemente de la aparición de los Mia en los primeros 28 días (Winkler *et al.*, 2002) correspondiendo con el comportamiento en nuestro estudio del grupo tratado con L-Dopa a los mismos tiempos, a pesar de la posterior disminución. Por otro lado, existen reportes sobre la reversión de la hipocinesia en pacientes con EP tratados con altas dosis de melatonina (Antón-Tay *et al.*, 1971). Incluso se ha observado que la melatonina revierte los movimientos involuntarios anormales causados por la L-Dopa en ratones lesionados en el estriado (Cotzias *et al.*, 1971). La melatonina puede influir en el desplazamiento en el campo abierto a través de la interacción con receptores centrales de benzodiazepinas acoplados a receptores de GABA tipo A, inhibiendo la liberación de DA en el estriado por estimulación de la actividad GABAérgica (Tenn y Niles 1995). Su influencia por esta vía podría indirectamente inhibir la activación de la adenilciclasa, y tal vez incluso a través de la participación de receptores de DA tipo D2 inhibir la formación de AMPc en el estriado producto de la sobreactividad GABAérgica (Tenn y Niles, 1995) e inhibir la liberación de DA al estriado desde la SN (Dewey *et al.*, 1992). La benzodiazepina produce mejoría atenuando los episodios de dicinesia en pacientes con EP, pero provoca varios efectos no deseados pues se llega rápidamente al umbral de resistencia al fármaco, por lo que la melatonina en este sentido resulta una potente alternativa (Tenn y Niles 1995).

Brotto y colaboradores describieron alta actividad en ratas hembra sin lesión tratadas con melatonina por 15 días (aproximadamente 0.28mg por día, por vía oral) en la prueba de campo abierto, comparadas con controles (Brotto *et al.*, 2000). Otro estudio muestra aumento en la actividad motora principalmente en la fase oscura del fotoperiodo y en menor proporción en la luminosa con dosis orales bajas de melatonina en ratas durante 12 semanas de tratamiento (Wolden-Hanson *et al.*, 2000). Estos hallazgos corresponden con la alta actividad de los grupos tratados con melatonina sola y en combinación en nuestro estudio. Puesto que el estriado ventrolateral tiene el control de la locomoción (Dickinson *et al.*, 1994), posiblemente los tratamientos con melatonina influyan en la actividad de esta zona.

La gráfica 3 ilustra los resultados en el acicalamiento durante la prueba de campo abierto por 10 minutos.

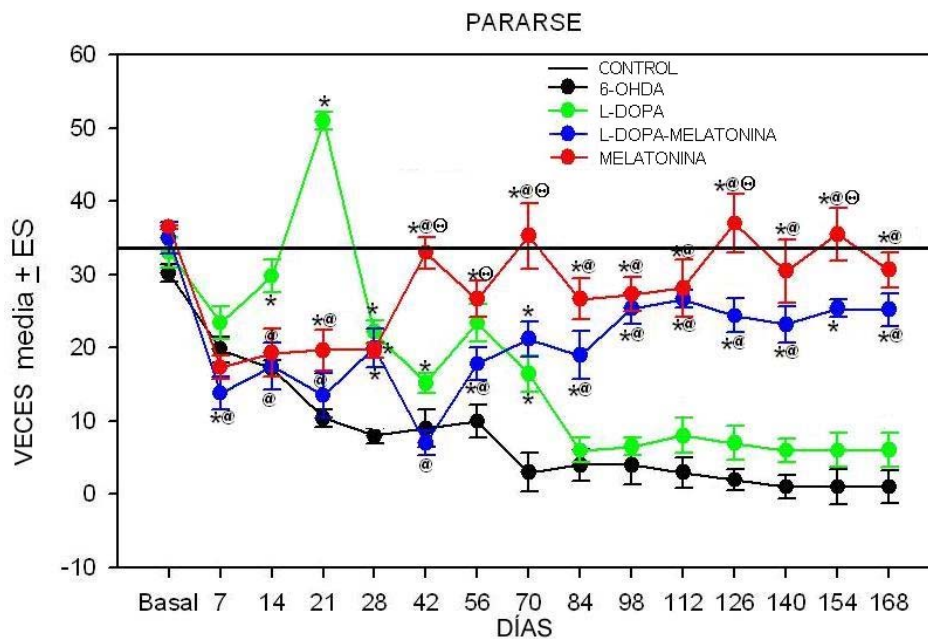


Gráfica 3. Resultados de la prueba de campo abierto. Se registraron las veces que se acicalaron. * Tratamientos vs Lesión con 6-OHDA. @ L-Dopa/melatonina y Melatonina vs L-Dopa. ⊕ L-Dopa/melatonina vs Melatonina. $P < 0.05$.

En el acicalamiento en el grupo control no hubo diferencias significativas con las mediciones basales durante todo el estudio (línea negra horizontal). El grupo únicamente lesionado disminuyó el número de acicalamientos como todos los grupos a los 7 días. 28 días posteriores a la lesión se mantuvo con tendencia estable de menos de 5 acicalamientos hasta los 168 días. El grupo tratado con L-Dopa aumentó el acicalamiento después de 7 días de la lesión, con niveles muy similares a los basales hasta los 56 días, decayendo posteriormente sin recuperarse. El grupo tratado con la combinación de fármacos aumentó ligeramente el número de acicalamientos después de 7 días,

llegando a niveles basales desde los 70 días y por el resto del estudio. El grupo tratado solo con melatonina mostró recuperación de esta actividad continua y progresivamente desde los 14 días sin llegar a los niveles basales correspondiendo con el estudio de Tenn y Niles de 1995, en el que el acicalamiento en ratas lesionadas unilateralmente en el mfb tratadas con melatonina se mostró muy similar al grupo control, y con el estudio de Izquierdo-Claros *et al.*, de 2001 en el que se sugiere la influencia de la melatonina (dosis subcutánea de 25µg/kg) en la regulación de receptores de somatostatina a nivel de la corteza frontal-parietal, para mantener los niveles de acicalamiento.

La contabilización del erguimiento se presenta en la gráfica 4.

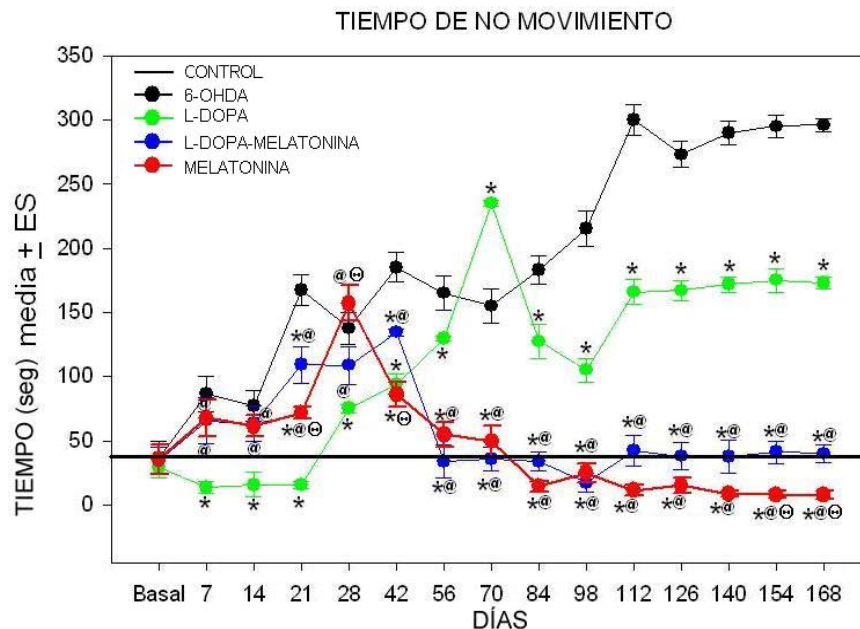


Gráfica 4. Resultados de la prueba de campo abierto. Se registraron las veces que se pararon sobre sus extremidades inferiores. * Tratamientos vs Lesión con 6-OHDA. @ L-Dopa/melatonina y Melatonina vs L-Dopa. ⊕ L-Dopa/melatonina vs Melatonina. P< 0.05.

Nuevamente los valores del grupo control no mostraron variaciones significativas a las basales de todos los grupos (línea negra horizontal). El grupo solo lesionado disminuyó paulatinamente el número de erguimientos hasta los 70 días cuando se estabilizaron sus valores muy inferiores a los basales. El grupo con L-Dopa inicialmente fue el menos afectado en esta actividad hasta los 28 días, cuando se observó tendencia a la disminución, incluso de forma similar al grupo solo lesionado desde los 84 días. El grupo con combinación mantuvo valores ligeramente fluctuantes hasta los 42 días, cuando comenzó la recuperación notable pero inferior a los niveles basales estabilizándose desde los 98 días. El grupo con melatonina a pesar de mantenerse sub basal los primeros 28 días, mostró recuperación al nivel basal por el resto del estudio. En condiciones control la ansiedad, resultado de la privación de comida, promueve los erguimientos en comparación con ratas sin

privación de alimento (Smith y Metz, 2005), sin embargo los erguimientos no se afectaron marcadamente en el grupo tratado solo con melatonina. Brotto *et al.*, (2000) reportó incremento significativo en el erguimiento en ratas hembra tratadas con melatonina sin lesión comparadas con su control. Es de destacar que ésta es la única variable (los erguimientos) contabilizada en nuestro estudio, en que la monoterapia con melatonina se presentó más estable que la combinación. Se ha reportado que el estriado ventrolateral tiene control sobre los erguimientos (Dickinson *et al.*, 1994), de manera que es posible que la melatonina ejerza acción directa o indirectamente sobre la actividad del estriado ventrolateral en los tratamientos en combinación o con solo melatonina para mantener los erguimientos en niveles casi basales.

El tiempo que los organismos se mantuvieron sin movimiento se ilustra en la gráfica 5.



Gráfica 5. Resultados de la prueba de campo abierto. Se registró el tiempo que permanecieron sin movimiento (D). * Tratamientos vs Lesión con 6-OHDA. @ L-Dopa/melatonina y Melatonina vs L-Dopa. ⊖ L-Dopa/melatonina vs Melatonina. P< 0.05.

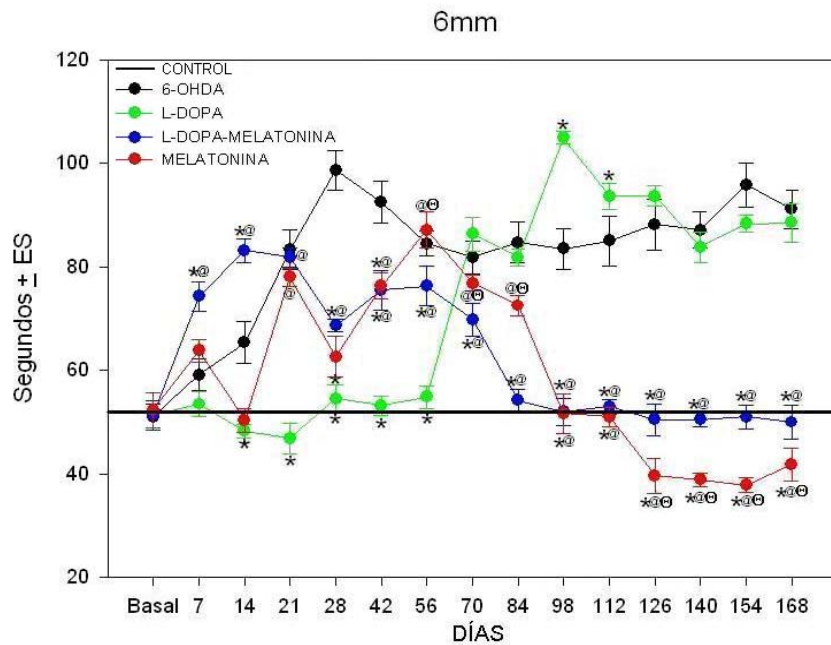
La línea horizontal negra (Gráfica 5) refiere los valores del grupo control en el tiempo sin movimiento en el campo abierto durante el estudio, mostrándose estable durante el mismo. La tendencia a la acinesia se agudizó con el tiempo en el grupo lesionado sin tratamiento. Una vez más el grupo con L-Dopa comenzó los primeros 21 días con niveles basales pero incrementando el tiempo sin movimiento a los 70 días, estabilizándose desde los 112 días para permanecer en estos niveles el resto del estudio. El grupo tratado con la combinación presentó valores muy similares al grupo tratado con melatonina sola los primeros 14 días. Posteriormente aumentó su estatismo hasta los 42 días y se recuperó desde los 56 días hasta el final del estudio. El grupo con melatonina tuvo

un punto más alto de acinesia a los 28 días a nivel incluso del grupo únicamente lesionado, para luego mejorar su actividad a niveles basales desde los 56 días.

La topografía de la disminución de DA en el estriado es importante para la manifestación de los Mia siendo clave la depleción del 95% en la parte medial del estriado (Winkler *et al.*, 2002). La porción del estriado central está directamente relacionada con la aparición de Mia en la locomoción (Andersson *et al.*, 1999), zona en la que se ha encontrado menos depleción dopaminérgica en comparación con la lateral estriatal (Winkler *et al.*, 2002) y que además recibe aferencias de ATV (Schwartzing y Huston, 1996). En el presente estudio pudimos apreciar la manifestación ocasional de todos los Mia en los grupos con lesión sin tratamiento y tratado con L-Dopa; observamos posturas distónicas y torsiones coreiformes axiales del tronco, cuello y cabeza. Se ha reportado que en ocasiones en ratas bajo tratamiento crónico con L-Dopa, el giro espontáneo producido por la terapia disminuye en duración por la pérdida del reflejo de sensibilización de receptores de DA. Es probable que tales alteraciones estén relacionadas con los periodos de resistencia “on-off” de beneficio farmacológico en la terapia de largo plazo (Lindgren *et al.*, 2007), por lo que podría explicarse la creciente disminución del movimiento en el grupo tratado con L-Dopa. Esporádicamente se apreciaron movimientos involuntarios orolinguales y de rigidez en la extremidad contralateral anterior en el grupo con combinación de melatonina+L-Dopa, sugiriendo la posible disfunción a nivel del estriado lateral (Andersson *et al.*, 1999). Posiblemente el tratamiento con melatonina disminuya solo parcialmente el daño en las neuronas de la SNc lateral que se proyectan a esta parte del estriado a pesar de ser de las últimas en degenerarse (poco después de 96 horas de la lesión) (Zuch *et al.*, 2000) dado que el inicio del tratamiento fue varias horas después. En la prueba de campo abierto, el tiempo sin movimiento se redujo y el desplazamiento, el acicalamiento y el erguimiento se incrementaron con el tiempo de tratamiento con melatonina en combinación o sola. La facilitación del movimiento es un efecto complejo de la melatonina y en las hembras que se ve influenciado por los niveles estrogénicos (Brotto *et al.*, 2000).

Conducta: Vigas

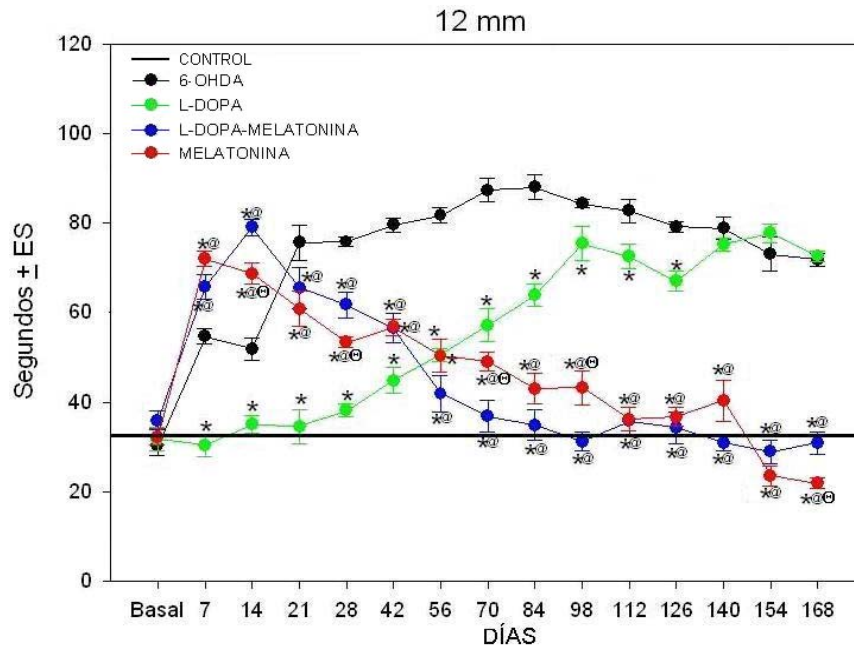
Se analizaron los tiempos de desplazamiento sobre vigas. Los resultados se muestran en las gráficas 6 A y B. En ambas vigas el grupo control se marca con la línea negra transversal por la homogeneidad de sus tiempos a lo largo del estudio.



Gráfica 6A. Resultados obtenidos en el camino ascendente sobre la viga de equilibrio de 6mm de espesor. * Tratamientos vs Lesión con 6-OHDA. @ L-Dopa/melatonina y Melatonina vs L-Dopa. Θ L-Dopa/melatonina vs Melatonina. P< 0.05

En la viga de 6mm de espesor (Gráfica 6A) el grupo lesionado sin tratamiento mostró los tiempos más amplios de recorrido durante la mayor parte del estudio. El grupo con L-Dopa se mantuvo en los tiempos basales los primeros 56 días para posteriormente disminuir la rapidez de su ascenso sin volver a los niveles basales, siendo sus tiempos muy similares al grupo exclusivamente lesionado en el mismo periodo hasta el final del estudio. El grupo con tratamiento combinado presentó tiempos de recorrido muy inferiores a los basales hasta los 84 días, tiempo en que se recuperó llegando a los niveles basales por el resto del estudio. En el caso del grupo con melatonina, éste se mantuvo fluctuante hasta los 84 días, posteriormente se recuperó y a los 112 días alcanzó los tiempos basales y los superó.

Los tiempos en la viga de 12mm (gráfica 6B) reflejan las mismas tendencias, con tiempos siempre altos en el grupo lesionado sin tratamiento, mismo que se estabilizó a los 21 días. El grupo con L-Dopa, que inició con tiempos similares a los basales hasta los 28 días, tendió a la prolongación de sus tiempos de recorrido hasta el final del estudio obteniendo resultados iguales que el grupo con lesión sin tratamiento de los 140 a los 168 días. En cuanto a los grupos tratados con melatonina, se comportaron de manera muy similar, recuperándose a partir de los 14 días y logrando tiempos basales desde los 70 días y hasta el final del estudio; logrando mejorar los tiempos basales en las últimas dos evaluaciones en el caso del tratamiento solo con melatonina.



Gráfica 6B. Resultados obtenidos en la viga de 12mm de espesor. * Tratamientos vs Lesión con 6-OHDA. @ L-Dopa/melatonina y Melatonina vs L-Dopa. ⊕ L-Dopa/melatonina vs Melatonina. $P < 0.05$

En esta prueba, el desplazamiento ascendente exige mantenerse sobre la viga y avanzar sin caer. La precisión de las ratas en esta actividad (función motora fina) es evaluada para analizar alteraciones motoras (Phillips *et al.*, 1997) permitiendo observar movimientos estereotipados espontáneos así como la coordinación (Jinnah y Hess, 2004), disfunción sensorial y cognitiva (Allbutt y Henderson, 2007). Ratas privadas de alimento normalmente presentan bajos tiempos de recorrido en una viga horizontal en comparación con ratas con libre acceso al mismo (Smith y Metz, 2005), lo que sugiere la presencia de un estimulante para el desplazamiento sobre las vigas en todos los grupos aunada a su aversión natural a los espacios abiertos, la principal motivación para la prueba (Allbutt y Henderson, 2007).

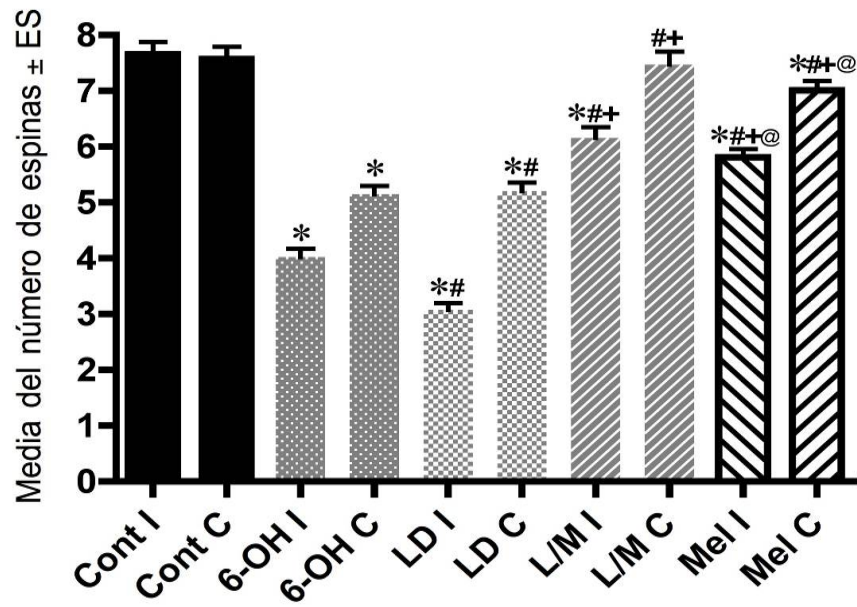
El entrenamiento y la habituación al aparato no reducen el tiempo total para cruzar la viga en el condiciones control, la latencia se incrementa a medida que los animales refuerzan el entrenamiento, sin embargo con la experiencia se reduce el tiempo de desplazamiento compensando el retraso inicial, así al habituarse al aparato la ansiedad disminuye y con ello la motivación para llegar al extremo de la viga en donde se encuentra la caja donde habitan (Allbutt y Henderson, 2007). En nuestro estudio el grupo lesionado sin tratamiento tendió a incrementar los tiempos de recorrido correspondiendo con reportes anteriores sobre hembras lesionadas en los que encontraron relación dosis dependiente de la toxina con el aumento en el tiempo de inicio del movimiento o latencia y en el tiempo total de transcurso en una viga horizontal (Truong *et al.*, 2006; Allbutt y

Henderson, 2007). Ellos apelan a la sobreexcitación del núcleo subtalámico que proyecta al núcleo entopeduncular y al SNr como causantes de la sobreinhibición del tálamo y la corteza, lo cual produce deficiencias motoras en las extremidades (Truong *et al.*, 2006), además la estimulación de la SNr bloquea la actividad del NPP produciendo rigidez y alteraciones en el paso (Takakusaki, 2008).

El dispositivo que utilizamos implicó mayor dificultad para su ejecución por la marcada diferencia en el espesor de las vigas que se usaron (6 y 12 mm) respecto de los estudios mencionados. Además de que las vigas eran más delgadas, se colocaban diagonalmente a 25° con respecto al piso. Tal posición implica mayor esfuerzo para mantener una posición estable. Ya otros estudios muestran el deterioro en la SNc y su pérdida de inmunoreactividad a TH relacionada con el aumento en el tiempo de latencia en el ascenso sobre vigas inclinadas de diferentes grosores en ratas lesionadas con 6-OHDA en mfb en comparación con los controles (Avila-Costa *et al.*, 2007a). En el grupo solo lesionado y el tratado con L-dopa la estrategia utilizada para el ascenso fue marcadamente diferente de los grupos tratados con la combinación o únicamente con melatonina. Utilizando principalmente las extremidades inferiores y posteriores ipsilaterales para desplazarse, interrumpían frecuentemente su ascenso y se resbalaban debido a la poca fuerza de sujeción de los dígitos por la lesión (Whishaw *et al.*, 2002) misma que no es revertida por la L-Dopa (Melvin *et al.*, 2005). La aguda degeneración de la SNc producida por la lesión en el mfb reduce considerablemente el tiempo de beneficio terapéutico de la L-Dopa (Winkler *et al.*, 2002). A su vez la alta tolerancia que pueden presentar algunos organismos a la L-Dopa puede hacer necesaria la administración de dosis más altas de ésta, causando con el tiempo estrés oxidativo y por consiguiente incremento en la neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas (Maharaj *et al.*, 2005). Los grupos tratados con melatonina en combinación y sola y el grupo control subían alternando los pasos de las extremidades ipsi y contralaterales aunque con un periodo de latencia alto antes de comenzar a desplazarse. De alguna manera la melatonina contribuyó a la recuperación de la fuerza de los dígitos y la capacidad de coordinación del movimiento de las extremidades ipsi y contralaterales para evitar el recurso de arrastrar la extremidad contralateral como en el grupo lesionado sin tratamiento y el tratado con L-Dopa.

Citología: Método de Golgi

La gráfica 7 ilustra la pérdida de espinas dendríticas en el estriado ipsi y contralateral en todos los grupos.



Gráfica 7. Media del número de espinas dendríticas encontradas en dendritas secundarias de NEM del cuerpo estriado de muestras tratadas mediante impregnación con Nitrato de plata por el método de Golgi. I=ipsilateral, C=contralateral. * Grupos experimentales vs Control; # Tratamientos vs Lesión sin tratamiento; + L- Dopa/Melatonina y Melatonina vs L-Dopa; @ L-Dopa/Melatonina vs Melatonina. $P < 0.05$

En el grupo control no se apreció pérdida significativa de espinas en ningún lado del estriado. La pérdida de espinas en el lado contralateral en el grupo tratado solo con L-Dopa no fue diferente significativamente de la encontrada en el grupo con lesión sin tratamiento y fue mayor en el lado ipsilateral respecto de todos los grupos. La disminución de espinas dendríticas en las NEM ipsi y contralaterales del grupo tratado con melatonina y L-Dopa fue significativamente menor que cualquier grupo a excepción del control. El grupo tratado solo con melatonina presentó disminución de espinas ipsi y contralaterales significativamente menor en comparación con la pérdida ipsi y contralateral del grupo tratado con L-dopa y el lesionado sin tratamiento.

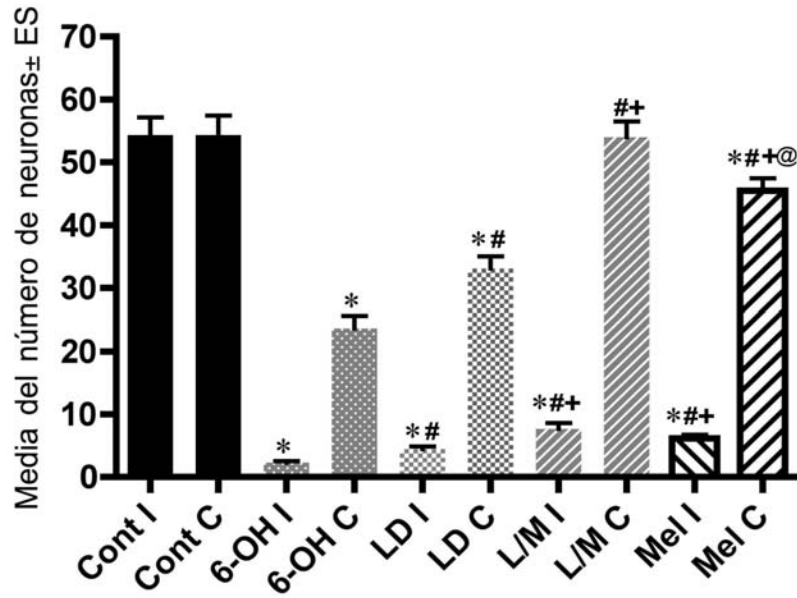
En condiciones de estrés severo o crónico hay pérdida de espinas dendríticas (Jones *et al.*, 2003), jugando un papel importante en la neurodegeneración, manifestando incluso alteraciones en la memoria (Colín-Barenque *et al.*, 1999; Avila-Costa *et al.*, 1999, Avila-Costa *et al.*, 2007b). El daño por la 6-OHDA se aprecia en la pérdida de espinas dendríticas de las NEM en el estriado ipsilateral (Ingham *et al.*, 1998; Reum *et al.*, 2002), siempre mayor en el lado ipsilatera aunque no excluye el daño contralateral en menor medida probablemente debido a las fibras nigroestriatales que se proyectan sobre el estriado contralateral cruzando de hemisferio a hemisferio (Schwartzing y Huston, 1996). Esta asimetría corresponde con los resultados de Ingham y colaboradores de 1998, en donde la pérdida de espinas dendríticas de las NEM del estriado ipsilateral es mayor comparada con la

contralateral en ratas lesionadas con 6-OHDA. Se ha reportado que después de la lesión nigroestriatal se presenta sobreactividad glutamatérgica en el estriado, que puede ser revertida temporalmente con el tratamiento crónico con L-Dopa (hasta 21 días del inicio del tratamiento) y restaurar bidireccionalmente la plasticidad sináptica en un proceso mediado por receptores D2, inhibiendo la transmisión glutamatérgica, aunque el beneficio no persiste más allá de este tiempo (Picconi *et al.*, 2004).

La pérdida podría ser un recurso para evitar la sobreexcitación glutamatérgica, ante la sobreactividad de éstas en las sinapsis con las NEM del estriado ocasionada por la carencia dopaminérgica (Ingham *et al.*, 1998). Después de la lesión se produce incremento en la transmisión glutamatérgica en el estriado, cuando hay grandes concentraciones de glutamato en el espacio extracelular las espinas se contraen, se pierden o muere la neurona por excitotoxicidad en forma dosis dependiente (Smythies, 2002). La melatonina puede regular la liberación de glutamato y neutralizar la producción de radicales libres por su detoxificación (Maharaj *et al.* 2007). Posiblemente éste sea uno de los mecanismos en los que la melatonina reduzca la pérdida de espinas ipsilaterales. Se ha visto que la pérdida de espinas está ligada con la drástica disminución en la disponibilidad de sus aferencias (Fiala *et al.*, 2002) o por la disminución de factores neurotróficos como BDNF, ambos procesos en los que la melatonina puede influir ya sea en la supervivencia neuronal o en la inducción en la síntesis de BDNF (Rodríguez *et al.*, 2004; Reiter, 2003; Sharma *et al.*, 2006; Avila-Costa *et al.*, 2007a; Borgal *et al.*, 2007) además las espinas pueden contraerse o modificar su crecimiento en estas circunstancias (Avila costa *et al.*, 2004).

Citología: Inmunocitoquímica anti-TH

El número de neuronas inmunopositivas para TH en la SNc se observa en la gráfica 8.



Gráfica 8. Media del número de neuronas inmunorreactivas a TH en la SNc. I=ipsilateral, C=contralateral. * Grupos experimentales vs Control; # Tratamientos vs Lesión sin tratamiento; + L- Dopa/Melatonina y Melatonina vs L-Dopa; @ L-Dopa/Melatonina vs Melatonina. P< 0.05.

El grupo control no presentó pérdida de neuronas inmunorreactivas a TH en la SNc contralateral e ipsilateral. La pérdida en el lado contralateral del grupo con combinación terapéutica no fue significativamente diferente del control y sí de la de los otros grupos. El grupo con melatonina sola tuvo menor pérdida de neuronas contralaterales que los grupos con L-Dopa y lesión sin tratamiento que tuvo el daño más considerable. La SNc ipsilateral fue la más afectada en todos los grupos experimentales. Los tres tratamientos revirtieron significativamente dicha pérdida, siendo más efectivos los tratamientos con melatonina (sin diferencias significativas entre sí) en comparación con el de L-Dopa. Los cortes coronales representativos del mesencéfalo se presentan por tratamiento en las figuras 22 A-D.

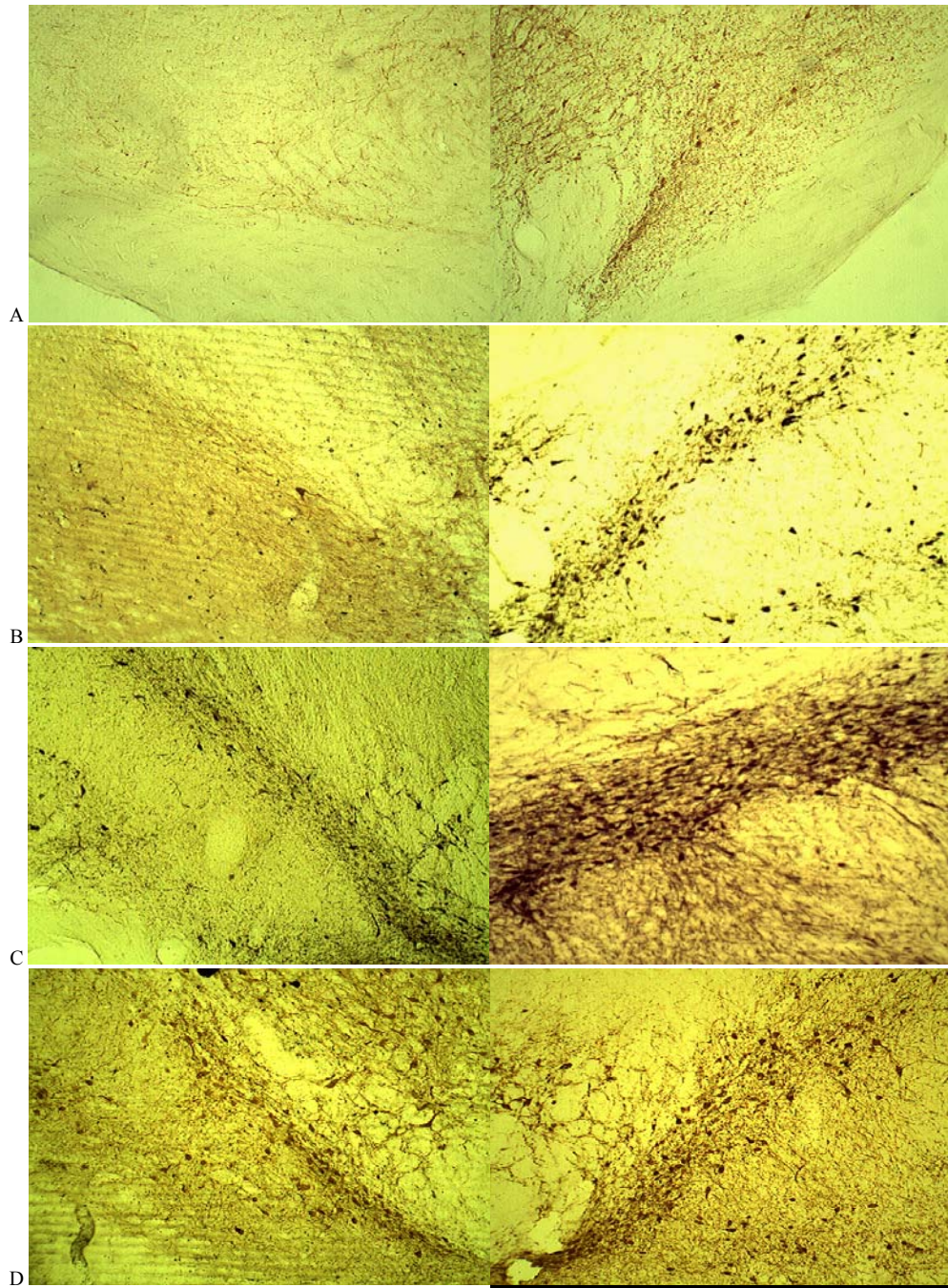


Figura 22A. SNc de organismos lesionados con 6-OHDA sin tratamiento. B. Tratados con L-DOPA. C. Tratados con Melatonina+L-Dopa. D. Tratados con Melatonina Inmunocitoquímica anti-TH (izquierda, SNc izquierda; derecha, SNc derecha) (100X).

La lesión unilateral en el mfb reduce el número de neuronas ipsilaterales inmunorreactivas a TH en la SNc y en el ATV en un 98 y 85 % respectivamente (Dowd y Dunnett, 2005; Allbutt y Henderson, 2007). Se piensa que uno de los mecanismos compensatorios de restitución de DA en el estriado en pacientes con EP es su aporte a través del sistema mesolímbico cortical a través del ATV (Shohamy *et al.*, 2005). Este sistema relacionado en procesos emocionales y cognitivos (Alexander *et al.*,

1986) podría disminuir su capacidad compensatoria al degenerarse el ATV y la porción ventral estriatal con la progresión de la enfermedad (Shohamy *et al.*, 2005). En la SNc contralateral a la lesión se han encontrado niveles de TH más altos que en animales control mostrando una regulación dinámica en la síntesis de TH cuando un hemisferio es dañado y un mecanismo de comunicación que permite esta modificación compensatoria en el lado contralateral (Kozlowski *et al.*, 2004).

En nuestro estudio pudimos apreciar que en el grupo tratado solo con melatonina, las neuronas TH-positivas remanentes en la SNc ipsilateral predominaban en las porciones ventrales y laterales pero no se marcaban sus neuritas (Figura 22D). El tratamiento con melatonina+L-Dopa mostró un patrón similar pero algunas de estas neuronas remanentes presentaban marcaje en sus proyecciones (Figura 22C). Algunas neuronas pierden el fenotipo de síntesis de TH pero no mueren, mientras que otras en proceso apoptótico mantienen la síntesis de TH (Rodríguez *et al.*, 2004), de hecho la melatonina puede retrasar el proceso apoptótico (Reiter *et al.*, 2003) y puede incrementar la actividad de la TH por varios procesos como por interacción directa con la proteína cinasa C- α (PKC- α) prescindiendo de la interacción con su receptor estimulando la acción de la PKC e interacciona con calmodulina (CaM) influyendo en el arreglo del citoesqueleto, en microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios (Antón-Tay *et al.*, 1998). También por interacción con el GDNF, un potente factor de supervivencia de neuronas dopaminérgicas, puede estimular la TH, promover la expresión de genes que codifican TH, GDNF y la liberación del último en el estriado contralateral y la regulación de su concentración en el ipsilateral (Sharma *et al.*, 2006). De esta forma la posible inducción de la síntesis de TH en los tratamientos de melatonina sola y en combinación no solo favorecería la síntesis de DA si no también la estabilización del citoesqueleto y la promoción de la supervivencia celular (Sharma *et al.*, 2006). La activación de la TH en el estriado a través de la activación de su receptor metabotrópico MT1, activa la ruta MAPK/ERK, implicada también en la regulación del crecimiento de las neuritas y la expresión de marcadores o guías de crecimiento neuronal (McMillan *et al.*, 2007).

En el modelo de 6-OHDA es relevante la capacidad de la melatonina como quelante de metales como el hierro (Limson *et al.*, 1998) pues este metal es importante para la autooxidación de la toxina (Schwartz y Huston, 1996) además, la melatonina incrementa los niveles de mRNA y la actividad de las enzimas barredoras de radicales libres SOD y GPx (Lin y Ho, 2000) y puede evitar la autooxidación de la L-Dopa y la DA a través del carbono 2 del anillo del indol en su estructura, que podría atrapar radicales OH \cdot (Reiter *et al.*, 2003). La protección de la melatonina en la autooxidación de la L-Dopa en el espacio extracelular en el estriado la hace un candidato viable

para la terapia conjunta de melatonina+L-Dopa (Rocchitta *et al.*, 2006) y como barredor de radicales libres incluido el NO, ya que además bloquea a la liberación de L-Dopa dependiente de tetrahidropterina como cofactor de la oxido nítrico sintasa (Abreu-González *et al.*, 2006), así la melatonina como tratamiento podría inhibir la liberación de L-Dopa en el estriado evitando su acumulación en el espacio extracelular en el caso del tratamiento combinado con L-Dopa y su posible autooxidación.

Por otro lado, el hidroxilo en el carbono 3 del anillo de catecol de la DA es altamente oxidable pero su metabolito 3-*O*-metildopamina formado enzimáticamente por la COMT resulta menos citotóxico por ser menos oxidable. De la misma manera la L-Dopa, aunque menos reactiva puede transformarse enzimáticamente por la COMT en un compuesto metilado menos oxidable, el 3-*O*-metildopa (Miller *et al.*, 1996). Este mecanismo de metilación es importante en la mitocondria donde la producción de radicales libres es alta y la metabolización de catecolaminas pueden desestabilizar el balance homeostático. La DA aumenta su capacidad autooxidante al incrementar su concentración (3-100 μ M), pero la L-Dopa a bajas concentraciones (3-10 μ M) es altamente susceptible de autooxidación, revirtiéndose esta tendencia de 10 a 100 μ M, incluso mostrando cierta actividad antioxidante de su metabolito 3-*O*-metildopa (Miller *et al.*, 1996). Esto podría explicar la diferencia significativa en el número de neuronas inmunorreactivas en la SNc contralateral entre el tratamiento con la combinación y el de L-Dopa sola (Gráfica 8).

El sustrato principal para la ortometilación realizada por la COMT es la S-adenosilmetionina (SAM) misma que se sintetiza menos en ratas adultas (Stramentinoli *et al.*, 1977) disminuyendo la capacidad de la ortometilación de catecolaminas a productos menos reactivos. La producción de melatonina también se reduce con la edad incrementando la susceptibilidad celular a el daño oxidativo del metabolismo normal (Ng *et al.*, 2004) por lo que su administración exógena influye en la severidad del efecto de la toxina. La capacidad lipofílica de la melatonina le permite el paso por las membranas celulares incluso a la mitocondria donde incrementa la actividad de los complejos I y IV de manera dosis-dependiente (Martin *et al.*, 2000). Brotto y colaboradores proponen que la melatonina podría poseer efectos en la mitocondria como un buffer, amortiguando la variación la concentración de iones, lo cual podría disminuir la autooxidación de la L-Dopa y la capacidad de la 6-OHDA para inhibir la respiración mitocondrial (Brotto *et al.*, 2000). La capacidad de la melatonina y sus metabolitos de barrer radicales libres neutralizaría la eventual degradación de la 6-OHDA por oxidación o por la vía enzimática (Sharma *et al.*, 2006). El hecho de haber encontrado degeneración celular en la SNc y en las NEM en los grupos con melatonina se debe posiblemente a

que los tratamientos comenzaron varias horas después del punto más alto de toxicidad de la 6-OHDA a las 48 horas, impidiendo la prevención del daño (Zuch *et al.*, 2000).

En el presente estudio, todas las pruebas conductuales manifestaron beneficio inicial en la alteración motora y deterioro posterior correspondiente con los estudios de 5 años (Markham *et al.*, 1974; Rascol *et al.*, 2000) y de 10 años de terapia con L-Dopa en pacientes con EP (Lees *et al.*, 2001), tales estudios reportan principalmente episodios drásticos de dicinesia. En nuestro estudio, el seguimiento de la progresión de los efectos de los tratamientos por 168 días representa entre el 10 y 15% de la expectativa de vida de una rata en condiciones de laboratorio (40-56 meses) (Illera *et al.*, 1991), proporción muy similar a la que abarcan los estudios de largo tiempo de terapia con L-Dopa en humanos mencionados arriba (entre 6 y 14% de la expectativa de vida de los pacientes). La evolución conductual derivada de las terapias aplicadas mostró que la combinación de melatonina+L-Dopa ofrece el mayor beneficio farmacológico comparado con la terapia por separado de ambos fármacos evidenciando que los mecanismos farmacológicos son diferentes para cada tratamiento pues la supervivencia celular y la pérdida de espinas dendríticas no fue la misma aún entre los tratamientos con melatonina. Podemos inferir que los primeros 56 días son críticos en la evolución de los tratamientos y su beneficio o perjuicio terapéutico, al punto en que a los 84 días de tratamiento las condiciones particulares de cada tratamiento tienden a estabilizarse. Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento oral con melatonina puede ser viable para su administración por los beneficios conductuales y citológicos, evitando otras vías de administración más dolorosas o incómodas.

Si bien la enfermedad se manifiesta principalmente en la vejez, el modelo con 6-OHDA en el mfb produce degeneración aguda de la SNc comparable a estadios avanzados de la enfermedad, volviendo nuestros datos relevantes en el conocimiento de la progresión de largo plazo en las terapias aplicadas. Los mecanismos específicos y la identidad de las estructuras y procesos involucrados en el beneficio farmacológico de la melatonina no se conocen. Nuestro estudio propone su relevancia para futuras investigaciones a fin de conocer los procesos que intervienen en la neurodegeneración de los ganglios basales y de desarrollar una terapia farmacológica que disminuya el daño ocasionado por la monoterapia con L-Dopa.

7. CONCLUSIÓN

Los grupos tratados oralmente con melatonina sola y en combinación con L-Dopa obtuvieron mayor precisión motora en la prueba de la escalera y de la viga además del mejor desempeño en la prueba de campo abierto en comparación con el grupo solo lesionado y el tratado con L-Dopa. Ambos tratamientos indujeron la recuperación del daño citológico producido por la 6-OHDA después de 168 días de tratamiento, pero el tratamiento con la combinación de melatonina+L-Dopa fue el más efectivo en la disminución de alteraciones producidas por la toxina en todos los parámetros medidos.

8. LITERATURA CITADA

Abreu-González, González-Hernández T., Afonso-Oramas D., Cruz-Muros I., Barroso-Chinea P. y González C. M. 2006. Tetrahydrobiopterina stimulates L-Dopa release from striatal tissue. *European Journal of Pharmacology*, 541:33-37.

Abrous D. N., Rivet M. J., LeMoal M. y Herman J. P. 1990. Similar post-lesion receptor readjustments following the unilateral 6-Hydroxydopamine lesion of the dopaminergic mesotelencephalic system in neonatal and adult rats. *Brain Research*, 526: 195-202.

Abrous D. N., Wareham A. T., Torres E.M. y Dunnett S.B. 1992. Unilateral dopamine lesions in neonatal, weanling and adult rats: comparison of rotation and reaching deficits. *Behavioural Brain Research*, 51:67-75.

Aguiar L. M. V., Vasconcelos M. M. S., Sousa F. C. F. y Viana G. S. B. 2002. Melatonin reverses neurochemical alterations induced by 6-OHDA in rat striatum. *Life sciences*, 70: 1041-1051.

Alam M., Mayerhofer A. y Schmidt W. J. (2004). The neurobehavioral changes induced by bilateral rotenone lesion in medial forebrain bundle of rats are reversed by L-DOPA. *Behavioural Brain Research*, 151:117-124.

Alamo C., López-Muñoz F., Bhatara S. Vinod y Cuenca E. 2004. La contribución de la reserpina y al desarrollo de la psiquiatría y su papel en la investigación neurobiológica. *Rev. Psiquiatría Fac. Med Barna*. 31(3):130-139.

Alexander G. E., DeLong M. R. y Strick P. L. 1986. Parallel Organization of Functionally Segregated Circuits Linking Basal Ganglia and Cortex. *Ann. Rev. Neurosc.* 9:357-381.

Allbutt N. H. y Henderson M. J. 2007. Use of the narrow-beam test in the rat, 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Methods*, 159:195-202.

Andersson M., Hilbertson A. y Cenci M. A. 1999. Striatal *fosB* Expression Is Causally Linked with L-DOPA-Induced Abnormal Involuntary Movements and the Associated Upregulation of Striatal

Prodynorphin mRNA in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Neurobiology of Disease*, 6(6):461-474.

Andrew R., Watson D. G., Best S. A., Midgley J. M., Wenlong H. y Petty R. K. H. 1993. The determination of hydroxidopamines and other trace amines in the urine of parkinsonian patients and normal controls. *Neurochemical Research* 18(11):1175-1177.

Antón-Tay F., Díaz J. L., Fernández G. A. 1971. On the effect of melatonin upon human brain. Its possible therapeutic implication. *Life Sciences*, 10(15):841-850.

Antón-Tay F., Ramírez G., Martínez I. y Benitez-King G. 1998. In Vitro stimulation of Protein Kinase C by Melatonin. *Neurochemical Research*, 23(5):601-606.

Aosaki T, Kimura M, Graybiel A. M. 1995. Temporal and spatial characteristics of tonically active neurons of the primate's striatum. *J. Neurophysiol.* 73(3):1234-52.

Apaydin H., Ertan S. y Ozekmekçi S. 2000. Broad bean (*Vicia faba*)--a natural source of L-dopa--prolongs "on" periods in patients with Parkinson's disease who have "on-off" fluctuations. *Mov. Disord.* 15(1):164-6.

Apicella Paul. 2007. Leading tonically active neurons of the striatum from reward detection to context recognition. *Trends in Neurosciences*, 30(6): 299-306.

Arendt J. 1998. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Reviews of Reproduction*, 3:13-22.

Asanuma M., Miyazaki I., Díaz-Corrales J. F. y Agawa N. 2004. Quinone formation as dopaminergic neuron-specific oxidative stress in the pathogenesis of sporadic Parkinson's disease and neurotoxin-induced parkinsonism. *Acta Medica Okayama*, 58(5):221-233.

Avila-Costa M. R. 2001. Efecto de la taurina en el sistema nervioso de la rata expuesta a un modelo de estrés oxidativo producido por ozono: Análisis morfológico-bioquímico y su relación con la conducta. Tesis de doctorado en ciencias biológicas. Facultad de Ciencias UNAM. 89p.

Avila-Costa M. R., Colín-Barenque L., Fortoul I. T., Machado-Salas J. P., Espinosa-Villanueva J, Rugeiro-Vargas C., Rivas-Arancibia S. 1999. Memory deterioration in an oxidative stress model and its correlation with cytological changes on rat hippocampus CA1. *Neuroscience Letters*, 270: 107-109.

Avila-Costa M. R., Montiel F. E., Colín-Barenque L., Ordoñez J. L., Gutiérrez A. L., Niño-Cabrera H. G., Mussali-Galante P. y Fortoul T. I. 2004. Nigrostriatal modifications after vanadium inhalation: an immunocytochemical and cytological approach. *Neurochemical Research*, 29(7):1365-1369.

Avila-Costa M. R., Colín-Barenque L., Montiel F. E., Aley-Medina P., Gutiérrez A. L., Ordoñez J. L., Flores M. E., Anaya M. V., Mussali-Galante P. y Fortoul T. I. 2005. Bromocriptine treatment in a murine Parkinson's model: ultrastructural evaluation after dopaminergic deafferentation. *Int. J. Neurosci.* 115(6):851-859.

Avila-Costa M. R., Anaya M. V., Ordoñez J. L., Gutiérrez A. L., Montiel F. E., Colín-Barenque L. Aley-Medina P., Espinosa-Villanueva J., Reynoso-Erazo L. y Fortoul T. I. 2007a. Synaptic Alterations of the striatum: Two different Models of Dopamine deafferentation. *En Neural Synapse Research Trends*. Nova Science Publishers. 310p.

Avila-Costa M.R., Fortoul T. I., Colín-Barenque L., Ordoñez J. L., Gutiérrez A. L. y Anaya M. V. 2007b. Vanadium and the nervous system. *En Vanadium: Its impact on Health*. Nova science publishers. 99p.

Azcoitia I., DonCarlos L. L. y García-Segura L. M. (2002). Estrogen and Brain vulnerability. *Neurotoxicology Research*, 4(3):235-245.

Bahena-Trujillo R., Flore G. y Arias-Montaña J. A. 2000. Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Rev. Biomed.* 11:39-60.

Barlow K. B., Cory-Slechta D. A., Richfield K. E. y Thiruchelvamb M. 2007. The gestational environment and Parkinson's disease: Evidence for neurodevelopmental origins of a neurodegenerative disorder. *Reproductive Toxicology*, 23: 457-470.

Betarbet R., Sherer B. T., MacKenzie G., Garcia-Osuna M., Panov V.A. y Reenamyre J. T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, 12(3):1301-1306.

Betarbet R., Sherer B. T. y Greenamyre J. T. 2002. Animal Models of Parkinson's disease. *BioEssays*, 24:308-318.

Biernaskie J., Chernenko G. y Corbett D. 2004. Efficacy of Rehabilitative Experience after Focal Ischemic Brain Injury Declines with Time. *J. of Neurosc.* 24(5):1245-1254.

Birkmayer W. y Hornykiewicz O. 1982. Citation Classic - The l-3,4-dioxyphenylalanine (=Dopa)-effect in Parkinson akinesia. *Current contents. Clin. Practice*, (14): 22-22.

Bloem R. B., Grimbergen A. M. Y., van Dijk G. y Munneke M. 2006. The "posture second" strategy: A review of wrong priorities in Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 248:196-204.

Borgal L., Hong M. Sadi D. y Mendez I. 2007. Differential effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on A9 and A10 Dopamine neuron survival. *Neuroscience*, 147:712-719.

Bradford F. H. 1988. *Fundamentos de Neuroquímica*. Editorial Labor. Madrid, España. 485p.

Breit S., Bouali-Benazzouz R., Popa C. R. y Gasser T. 2007. Effects of 6-hydroxydopamine-induced severe or partial lesion of the nigrostriatal pathway on the neuronal activity of pallido-subthalamic network in the rat. *Experimental Neurology*, 205:36-47.

Brooks I. A., Chadwick A. C., Gelbard A., H., Cory-Slechta D. A., y Federoff J. H. 1999. Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Research*, 823:1-10.

Brotto A. L., Barr M. A. y Gorzalka B. B. 2000. Sex differences in forced-swim and open-field test behaviours after chronic administration of melatonin. *European Journal of Pharmacology*, 402:87-93.

Boix-Trelis N., Vale-Martinez A., Guillazo-Blanch G. y Marti-Nicolovius M. 2007. Muscarinic cholinergic receptor blockade in the rat prelimbic cortex impairs the social transmission of food preference. *Neurobiology of learning and Memory*, 87(4):659-668.

Bordelon M. Y. y Fahn S. 2006. Gender differences in movement disorders. *En Neurologic disease in women*. 2ª edición, Demos. N.Y., U.S.A. 478p.

Burn J. D. 2007. Sex and Parkinson's disease: a world of difference?. *Journal of Neurosurgery, and Psychiatry*, 78:787.

Caillé I., Dumartin B. y Bloch B. 1996. Ultrastructural localization of D 1 dopamine receptor immunoreactivity in rat striatonigral neurons and its relation with dopaminergic innervations. *Brain Research*, 730:17-31.

Carlsson A., Lindqvist M. y Magnusson T. 1957. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists. *Nature*, 180:1200.

Carlsson A., Fuxe J. y Hökfelt T. 1967. Effect of desmethylinipramine, protriptyline and (+)-amphetamine on fluorescence of central Adrenergic neurons of rats pretreated with A-methyl-dopa and tetrabenazine or reserpine. *European journal of pharmacology*, 2:196-201.

Cenci M. A. 2007. Dopamine dysregulation of movement control in L-Dopa-induced dyskinesia. *Trends in Neuroscience*, 30(5):236-243.

Cenci M. A. Wishaw Q. I. y Schallert T. 2002. Animal models of neurological deficits: relevant is the rat?. *Nature Neuroscience*, 3:574-579.

Chang W. J., Wachtel R. S., Young D. y Kang U. J. 1999. Biochemical and anatomical characterization of forepaw adjusting steps in rat models of Parkinson's disease: studies on medial forebrain bundle and striatal lesions. *Neuroscience*, 88(2): 617-628.

Chaná C. P., Fierro H. A., Reyes-Parada M. y Sáez-Briones P. 2003. Comparación farmacocinética de Sinemet® y Grifoparkin® (levodopa/carbidopa 250/25 mg) en pacientes con enfermedad de Parkinson avanzada: un estudio con dosis única. *Rev. Méd. Chile*, 131(6):623-631.

Chanyachukul T., Yoovathaworn K., Thongsard W., Chongthammakunc S., Navasumrit P. y Satayavivad J. 2004. Attenuation of paraquat-induced motor behavior and neurochemical disturbances by l-valine in vivo. *Toxicology Letters*, 150: 259-269.

Chen T. B., Avshalumov M. A. y Rice E. M. 2001. H₂O₂ is a novel, endogenous modulator of synaptic Dopamine release. *J. Neurophysiol.* 85:2468-2476.

Cicchetti F., Lapointe N., Roberge-Tremblay A., Saint-Pierre M., Jimenez L., Ficke W. B. y Gross E. R. 2005. Systemic exposure to paraquat and maneb models early Parkinson's disease in young adult rats. *Neurobiology of Disease*, 20: 360-371.

Colín-Barenque L., Avila-Costa M. R., Fortoul T., Rugeiro-Vargas C., Machado-Salas J. P., Espinosa-Villanueva J. y Ribas-Arancibia S. 1999. Morphologic alteration of the olfactory bulb after acute ozone exposure in rats. *Neuroscience letters*, 274:1-4.

Cooper A. A., Gitler D. A., Cashikar A., Haynes M. C., Hill J. K., Bhullar B., Liu K., Xu K., Strathearn E. K., Liu F., Cao S., Caldwell A. K., Caldwell A. G., Marsischky G., Kolodner D. R., LaBaer J., Rochet J. C., Bonini M. N. y Lindquist S. 2006. α -Synuclein Blocks ER-Golgi Traffic and Rab1 Rescues Neuron Loss in Parkinson's Models. *Science*, 313:324-328.

Corti O., Hampe C., Darios F., Ibanez P., Ruberg M. y Bricea A. 2005. Parkinson's disease: from causes to mechanisms. *C. R. Biologies*, 328:131-142.

Cotzias C. G., Tang C. L., Miller T. S. y Ginos Z. J. 1971. Melatonin and abnormal movements induced by L-Dopa in Mice. *Science*, 173:450-452.

Cossette M., Lecomte F. y Parent A. (2005). Morphology and distribution of dopaminergic neurons intrinsic to the human striatum. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 29:1-11.

Cui K., Luo X. L., Xu K. y ven Murthy M. R. 2004. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 28:771-799.

Dabbeni-Sala F., Di Santo S., Franceschini D., Skaper D. S. y Giusti P. 2001. Melatonin protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity in rats: a role for mitochondrial complex I activity. *FASEB J.* 15:164-170.

Dang M. y Li Y. 2004. Generation of Transgenic and Gene-Targeted Mouse Models of Movement Disorders. *En Animal models of movement disorders.* Academic Press. E. U. A. 824p.

DeMuro L. R. Nafziger N. A., Blask E. D., Menhinick M. A. y Bertino S. J. 2000. The absolute bioavailability of oral melatonin. *J. Clin. Pharmacol.* 40:781-784.

Del Valle Rodrigo. 2002. ¿Neurocirugía sin bisturí? Gamma knife o bisturí de rayos gamma. *Epidemiología*, 16(19):1-3.

Dewey L. S., Smith S. G., Logan J., Srodie D. J., Yu Wei D., Ferrieri A. R., King T. P., MacGregor R. R., Martin P. T. Wolf P. A. Volkow D. N., Fowler S. J. y Meller E. 1992. GABAergic inhibition of endogenous dopamine release measured in vivo with ¹¹C-Raclopride and positron emission tomography. *The Journal of Neuroscience*, 12(10):3773-3780.

Dickinson P. R., Lang C. G., Hinton S. C. y Kelley A. E. 1994. Oral stereotypy induced by amphetamine microinjection into striatum: An anatomical mapping study. *Neuroscience*, 61(1):81-91.

Djamgoz M. B. A., Hankins M. W., Hirano J. y Archer S. N. 1997. Neurobiology of retinal Dopamine in relation to degenerative states of the tissue. *Vision Res.* 37(24):3509-3529.

Dowd E. y Dunnett B. S. 2005. Comparison of 6-Hydroxydopamine-induced medial forebrain bundle and nigrostriatal terminal lesions in a lateralized nose-poking task in rats. *Behavioural Brain Research*, 159:153-161.

Feany M. B y Bender W.W. (2000). A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature*, 404:394-398.

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

Fitsanakis A. V., Amarnath V., Moore T. J., Montine S. K., Zhang J. y Montine J. T. 2002. Complexes in pesticides Catalysis of catechol oxidation by metal-dithiocarbamate. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(12):1714-1723.

Fleming M. S., Delville Y. Y Schallert T. 2005. An intermittent, control-rate, slow progressive degeneration model of Parkinson's disease: antiparkinson effects of Sinemet and protective effects of methylphenidate. *Behavioural Brain Research*, 156:201-213.

Franco J., Prediger D.S. R., Pandolfo P., Takahashi N. R., Farina M. y Dafre L. A. 2007. Antioxidant responses and lipid peroxidation following intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats: increased susceptibility of olfactory bulb. *Life Sciences*, 80:1906-1914.

Galpern R. W. y Cudkowicz E. M. 2007. Coenzyme Q treatment of neurodegenerative diseases of aging. *Mitochondrion*, 7S: S146-S153.

Galván Zamudio A. 2000. Papel de la inervación dopaminérgica al globo pálido en la actividad motora de la rata. Tesis de doctorado en Neurociencias. CINVESTAV, IPN. 106p.

Gálvez, J N. 2005. Scientific basis for the treatment of Parkinson's Disease. 2ª edición. Editorial Taylor & Francis. NY, EEUU. 359p.

García-Arencibia M., González S., de Lago E., Ramos A. J., Mechoulam R. y Fernández-Ruiz J. 2007. Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: Importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain Research*, 1134:162-170.

García R. P. J. y Meseguer E. 2002. Breve historia de la L-Dopa. *Neurología*, 17(4):214-217.

García-Rill E. 1986. The Basal Ganglia and the Locomotor Regions. *Brain Research Reviews*, 11: 47-63

Giroud B. J. L. y Collado M. F. 2002. Hábito de fumar y enfermedad de Parkinson idiopática. Estudio caso-control. *Rev Cubana Med.* 41(1):16:19.

Glinka Y. y Youdim B. H. M. 1995. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *European Journal of Pharmacology.* 292: 329-332.

Glinka Y., Tipton F. K. y Youdim M. B. H. 1998. Mechanism of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-hydroxydopamine and its prevention by desferrioxamine. *European Journal of Pharmacology*, 351 1998 121-129.

Grandas F. 2003. Agonistas dopaminérgicos y neuroprotección en la enfermedad de Parkinson. *Medicina stm editores.* Barcelona, España. 53p.

Góngora-Alfaro J. L., Moo-Puc R. E., Villanueva T. J., Arankowsky-Sandoval G., Álvarez-Cervera F. J., Pineda-Cortés J. C., Heredia-López F. J. y Bata-García J. 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.

González-Torres L. C. y Armendáriz-Borunda J. 2005. Aspectos inmunológicos en la enfermedad de Parkinson. *Arch Neurocién.* 10(3): 168-169.

Guitera V., Berciano J., Fernández M. J. y Pascual J. 1996. Parkinsonismo postencefalitis letárgica: Primer posible caso español de la segunda mitad del siglo. *Neurología*, 11(1):37-40.

Haaxma A. C., Bloem R. B., Borm F. G., Oyen G. J. W., Leenders L. K., Eshuis S., Booij J., Dluzen E. D. y Horstink W. I. M. M. 2007. Gender differences in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 78:819-824.

Hamamichi S., Rivas N. R., Knight L. A., Cao S., Caldwell A. K. y Caldwell A. G. 2008. Hypothesis-based RNAi screening identifies neuroprotective genes in a Parkinson's disease model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105(2):728-733.

Hanakawa T., Katsumi Y., Fukuyama H., Honda M., Hayashi T., Kimura J. y Shibasaki H. 1999. Mechanisms underlying gait disturbance in Parkinson's disease: a single photon emission computed tomography study. *Brain*, 122:1271-1282.

Hattori N y Yoshikuni M. 2004. Pathogenic mechanism of parkin in Parkinson's disease. *Lancet*, 364:722-724.

Harden G. D. y Grace A. A. 1995. Activation of Dopamine cell firing by repeated L-Dopa administration to Dopamine-depleted rats: Its potential role in mediating the therapeutic response to L-Dopa treatment. *The Journal of Neuroscience*, 15(9):6157-6166.

Hemling N., Røyttä M., Rinne J., Pöllänen P., Broberg E., Tapio V., Vahlberg T. y Hukkanen. 2003. Herpesviruses in Brains in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Ann Neurol*. 54:267-271.

Hermens W. T. J. M. C. y Verhaagen J. 1998. Viral vectors, tools for gene transfer in the Nervous System. *Progress in Neurobiology*, 55:399-432.

Hikosaka, O., Takikawa, Y., Kawagoe, R., 2000. Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. *Physiological Reviews*, 80:953-978.

Hokfelt T. y Ungerstedt U. 1973. Specificity of 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurones: an electron and fluorescence microscopic study with special reference to intracerebral injection on the nigro-striatal dopamine system. *Brain Research*, 60:269-297.

Holligan, W. M., Kischka U. y Marshal C. J. 2004. *Handbook of clinical Neurophysiology*. 2^a edición. Oxford University. Oxford, UK. 837p.

Hoover E. J. y Strick L. P. 1999. Cerebellar and Pallidal Outputs to M1. *The J. Neurosci*. 19 (4):1446-1463.

Hubble J. P. Cao T. Kjelstrom A. J., Koller C. W. y Beaman I. P. 1995. *Nocardia* Species as an Etiologic Agent in Parkinson's Disease: Serological Testing in a Case-Control Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(10): 2768-2769.

Hunot S., Boissière F., Faucheux B., Brugg B., Mouatt-prigent A., Agid Y. y Hirsch C. E. 1996. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 72(2):355-363.

Illera M. M., Illera D. P. J. C. e Illera D. P. M. J. 1991. El ratón y la rata. Editorial complutense. Madrid, España. 127p.

INEGI. 2005. Defunciones generales 2005. Disponible en: http://www.inegi.gob.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/continuas/vitales/vitales/2005bis1/df/0905def.xls

Ingham C. A., Hood S. H., Taggart P. y Arbuthnott G. W. 1998. Plasticity of synapses in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *The Journal of Neuroscience*, 18:4732-4743.

ISSSTE. 1999. Cirugía del cerebro sin bisturí. Comunicado de enero disponible en: <http://www.issste.gob.mx/website/comunicados/nosotros/enero99/cirug%eda%20sin%20bistur%ed.html>

Izquierdo-Claros R. M., Boyano-Adánez M. C., Torrecillas G., Rodríguez-Puyol M. y Arilla-Ferreiro E. 2001. Acute modulation of somatostatin receptor function by melatonin in the rat frontoparietal cortex. *Journal of Pineal Research*, 31(1):46-56.

Janetzky B., Hauck S., Youdim M. B., Riederer P., Jellinger K., Pantucek F., Zöchling R., Boissl K.W. y Reichman H. 1994. Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 169(1-2):126-128.

Jin K. B., Shin Y. D., Jeong Y. M., Gwag R. M., Baik W. H., Yoon S. K., Cho H. Y., Joo S. W., Kim S. Y. y Baik H. H. 1998. Melatonin protects nigral dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) neurotoxicity in rats. *Neuroscience Letters*, 245:61-64.

Jinnah H. A. y Hess E. J. 2004. Assessment of movement disorders in rodents. *En Animal Models of movement disorders*. Academic Press. E. U. A. 824p.

Juri C. C. y Chaná C. P. 2006. Levodopa en la enfermedad de Parkinson. ¿Qué hemos aprendido? *Rev Med Chile*, 134:893-901.

Jones A. T., Bury D. S., Adkins-Muir L. D. A., Luke M. L., Allred P. R y Sakata T. J. 2003. Importance of behavioral manipulations and measures in rat models of brain damage and brain repair. *ILAR Journal*. 44(2):144-152.

Kabanova V. A. y Gendelman E. H. 2007. Nanomedicine in the diagnosis and therapy of neurodegenerative disorders. *Prog. Polym. Sci.* 32:1054-1082.

Kandell, R. Eric, Schwartz H. J. y Jassell M. T. 1997. *Neurociencia y conducta*. Editorial Prentice Hall. Madrid, España. 832p.

Kandell, R. Eric, Schwartz H. J. y Jassell M. T. 2000. *Principios de Neurociencia*. 4ª edición. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. 1400p.

Kaplan P. G. 2004. Ayurvedic medicine. *En Complementary Therapies in Neurology: An Evidence-Based Approach*. Edited by Oken S. Barry S. The Parthenon Publishing Group, London. 172-188.

Kipp M., Karakaya S., Pawlak J., Araujo-Wright G., Arnold S. y Beyer C. 2006. Estrogen and the development and protection of nigrostriatal dopaminergic neurons: Concerted action of a multitude of signals, protective molecules, and growth factors. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 27:376-390.

Kirpekar M. S., Cervoni P. y Couri D. 1963. Depletion and recovery of catecholamines and adenosine Triphosphate of rat adrenal medulla after Reserpine treatment. *Journal of Pharm. Exp. Ther.* 142:71-75.

Knoll J. 1986. The pharmacology of (-) deprenyl. *J. Neural Transm Suppl.* 22:75-89.

Koller C., William, Paulson G. 1995. *Therapy of Parkinson Disease*. 2ª edición. Editorial Marcel Dekker NY, EEUU. 606p.

Koolman J. y Roehm H. K. 2005. *Color Atlas of Biochemistry*. 2ª edición. Thieme. Stuttgart, Alemania. 476p.

Kopell H. B. y Greenberg D. B. 2008. Anatomy and physiology of the Basal Ganglia: Implications for DBS in psychiatry. *Neuroscience and Biobehavioural Reviews*, 32(3):408-422.

Kozlowski D. A., Miljanić E. A., Bremer E. G., Harrod C. G., Gerin C., Connor B. George D. Larson B. Bohn M. C. 2004. Quantitative analyses of GRF α -1 and GRF α -2 mRNA and tyrosine hydroxylase protein in the nigrostriatal system reveal bilateral compensatory changes following unilateral 6-OHDA lesions in the rat. *Brain Research*, 1016:170-181.

Krüger R. (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease. *Nature Genetics*. 18:106-108.

Kumar R., Agarwal K. A. y Seth K. P. 1995. Free Radical-Generated Neurotoxicity of 6-Hydroxydopamine. *Journal of Neurochemistry*, 64(4):1703-1707.

Labandeira-García J. L., Rozas G., Lopez-Martin E. Liste I. y Guerra M. J. 1996. Time course of striatal changes induced by 6-Hydroxydopamine lesion of the nigrostriatal dopamine pathway, as studied by combined evaluation of rotational behavior and Fos expression. *Exp. Brain. Res.* 108:69-84.

Langston W. J., Forno S. L., Tetrad J., Reeves G. A., Kaplan A. J. y Karluk D. 1999. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Annals of Neurology*, 46(4):598-605.

Lapchak A. P., Beck D. K., Araujo M. D., Irwin I., Langston W. J. y Hefti F. 1993. Chronic intranigral administration of Brain-Derived Neurotrophic Factor produces striatal dopaminergic hypofunction in unlesioned adult rats and fails to attenuate the decline of striatal dopaminergic function following medial forebrain bundle transection. *Neuroscience*, 53(3): 639-650.

Lastres-Becker I., Molina-Olgado F., Ramos A. J., Mechoulam R. y Fernández-Ruiz J. 2005. Cannabinoids provide neuroprotection against 6-Hydroxydopamine toxicity in vitro and in vivo: Relevance to Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 19:96-107.

Laubach Mark. 2005. Who's on first? What's on second? The time course of learning in corticostriatal systems. *TRENDS in Neurosciences*, 28 (10): 5009-511.

Laverty R. y Sharman D. F. 1965. The estimation of small quantities of 3,4-dihydroxyphenylethylamine in tissues. *Brit. J. Pharmacol.* 24:538-548.

Lee K. M., Stirling W., Xu Y., Xu X., Qui D., Mandir S. A., Dawson M. T., Copeland G. N., Jenkins A. N. y Price L. D. 2002. Human α -synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 \rightarrow Thr mutation causes neurodegenerative disease with α -synuclein aggregation in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99(13):8968-8973.

Lee H. I., Seitz R. A. y Assad A. John. 2006. Activity of Tonicly Active Neurons in the Monkey Putamen During Initiation and Withholding of Movement. *J Neurophysiol*, 95: 2391-2403.

Lees J. A., Katzenschlager R., Head J., Ben-Shlomo Y. y el Parkinson's Disease Research Group of the United Kingdom. 2001. Ten-Year follow-up of three different initial treatments in the novo PD. A Randomized trial. *Neurology*, 57: 1687-1694.

Li Y., Kolb B. y Robinson E. T. 2003. The location of persistent Amphetamine-Induced changes in the density of dendritic spines on medium spiny neurons in the nucleus accumbens and caudate-putamen. *Neuropsychopharmacology*, 28:1082-1085.

Limson J., Nyokong T. y Oaya S. 1998. The interactions of melatonin and its precursors with alluminium, cadmiun, cupper, iron, lead and zinc: An adsorptive voltammetric study. *Journal of Pineal Research*, 24(1):15-21.

Lin M. Y. A. y Ho L. T. 2000. Melatonin suppresses iron-induced neurodegeneration in rat brain. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(6):904-911.

Lindgren S. H., Rylander D., Ohlin E., Lundblad M. y Cenci M. A. 2007. The "motor complication syndrome" in rats with 6-OHDA lesions treated chronically with L-DOPA: Relation to dose and route of administration. *Behavioural Brain Research*, 177:150-159.

Liou H. H., Tsai C.M., Chen C. J., Jeng S. J., Chang C. Y. y Chen C. R. 1997. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology*. 48(6):1583-1588.

Maguire-Zeiss A. K., Shortb W. S. y Federoff J. H. 2005. Synuclein, dopamine and oxidative stress: co-conspirators in Parkinson's disease? *Molecular Brain Research* 134:18-23.

Maharaj Himant, Maharaj S. D., Scheepers M., Mokokong R. y Daya S. 2005. L-DOPA administration enhances 6-hydroxydopamine generation. *Brain Research*, 1063:180-186.

Maharaj S. D., Glass D. B. y Daya S. 2007. Melatonin: New Places in Therapy *Biosci Rep.* 27:299-320.

Marco S., Saura J., Perez-Navarro E., Martí M. J., Tolosa E. y Alberch J. 2002. Regulation of c-RET, GFR α -1, and GFR α -2 in the substantia nigra *Pars compacta* in a rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neurobiology*, 52(4):343-351.

Markham C.H., Treciokas L.J. y Diamond S.G. 1974. Parkinson's disease and levodopa-A five year follow-up and review. *Medical Progress. West J. Med.* 121:188-206.

Marttila R. J., Arstila P., Nikoskelainen J., Halonen P.E. y Rinne U.K. 1977. Viral Antibodies in the Sera from Patients with Parkinson Disease. *Eur. Neurol.* 15:25-33.

Martin M., Macias M., Escames G., León J. y Acuña-Castroviejo D. 2000. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-Butylhydroperoxide induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J.* 14:1677-1679.

Martínez-Martin P. 2006. Repercusiones sobre la calidad de vida del deterioro cognitivo en la enfermedad de Parkinson. *Rev. Neurol.* 43(3):168-172.

Matell S. M. y Meck H. W. 2004. Cortico-striatal circuits and interval timing: coincidence detection of oscillatory processes. *Cognitive Brain Research*, 21:139- 170.

Mayo, J. C., Sainz R. M., Antolín I. y Rodríguez C. 1999. Ultrastructural confirmation of neural protection by melatonin against the neurotoxin 6-hydroxidopanmine cell damage. *Brain Research*, 818:221-227.

Metz A. S. G., Merkler D., Dietz V., Schwab E. M. y Fouad K. 2000. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Research*, 883:165-177.

McMillan R. C., Sharma R., Ottenhof T. y Niles P. L. 2007. Modulation of Tyrosine Hydroxylase expression by melatonin in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neuroscience Letters*, 419:202-206.

Melvin G. K., Doan J., Pellis M. S., Brown L., Wishaw Q. I., Suchowersky O. 2005. Pallidal deep Brain stimulation and L-Dopa do not improve qualitative aspects of skilled reaching in Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*, 160:188-194.

Michelli E. F. 1998. *Enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 343p.

Middleton A. F. y Strick L. P. 2002. Basal-Ganglia 'Projections' to the prefrontal cortex of the Primate. *Cerebral Cortex*, 12: 926-935.

Miller W. J., Selhub J. y Joseph A. J. 1996. Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autoxidation: protective effects of O-methylation and melatonin. *Free Radical Biology & Medicine*, 21(2): 241-249.

Miller W. D. y Abercrombie D. E. 1999. Role of high-affinity dopamine uptake and impulse activity in the appearance of extracellular Dopamine in striatum after administration of exogenous L-Dopa: Studies in Intact and 6-Hidroxidopamine-Treated rats. *Journal of Neurochemistry*, 72(4):1516-1522.

Missale C., Russel S. N., Robinson W.S., Jaber M. y Caron G. M. 1998. Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev.* 78(1):189-225.

Montoya C. P., Campbell-Hope L.J. y Dunnett S. B. 1991. The 'Staircase test': A measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *J Neurosci Meth.* 36:219-28.

Monville C. Torre M. E. y Dunnett B. S. 2005. Validation of the L-Dopa induced dyskinesia in the 6-OHDA model and evaluation of the effects of selective dopamine receptor agonist and antagonist. *Brain Research Bulletin*, 68:16-23.

Morato M. G.; Lemos T. y Takahashi N. R. 1989. Acute Exposure to Maneb Alters Some Behavioral Functions in the Mouse. *Neurotoxicology and Teratology*, 11:421-425.

Moresco M. R., Volonte A. M., Messa C., Gobbo C., Galli L., Carpinell A., Rizzo G., Panzacchi A., Franceschi M. y Fazio F. 2002. New perspectives on neurochemical effects of amantadine in the brain of parkinsonian patients: a PET – [¹¹C]raclopride study. *J Neural Transm.* 109:1265-1274.

Murray H. E., Pillai A. V., Mcarthur S. R., Razvi N., Datla K. P., Dexter D. T. y Gillies G. E. 2003. Dose- and sex-dependent effects of the Neurotoxin 6-Hydroxidopamine on the Nigrostriatal dopaminergic Pathway of adult rats: Differential actions of estrogen in males and females. *Neuroscience*, 116:213-222.

Nagatsu T.; Levitt M. y Udenfriend S. 1964. Tyrosine Hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 239(95):2910-2917.

Nielsen S. B., Larsen E. H., Ole Ladefoged O. y Lama R. H. 2006. Neurotoxic effect of mane b in rats as studied by neurochemical and immunohistochemical parameters. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21:268-275.

Ng T. B., Liu F., Xia L. X., Wang H. X. y Ye X. Y. 2005. Melatonin and the aging brain. *Neuroembryol. Aging*, 5(3):70-74.

Noback R. C., Strominger L. N., Demarest J. R. y Ruggiero A. D. 2005. *The Human Nervous System. Structure and function.* 6a edición. Humana Press Inc. N. J. U.S.A. 474p.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Publicada en el Diario Oficial de la Federación del 22 de agosto de 2001.

Obeso A. J., Rodríguez-Oroz C. M. y Zamarbide I. 2002. Enfermedad de Parkinson. Perspectivas. *En Enfermedades Neurodegenerativas. Serie científica Farmaindustria. Madrid, España. 220p.*

Pahapill P.A. y Lozano A. M. 2000. The pedunculopontine nucleus and Parkinson's disease. *Brain, 123, 1767-1783.*

Park J., Kim Y. S., Cha Guang-Ho., Lee B. S., Kim S. y Chung J. 2005. *Drosophila DJ-1* mutants show oxidative stress-sensitive locomotive dysfunction. *Gene, 361:133-139.*

Park J., Yoo Cheol-In, Sun C. S., Woo K. J., Yi Y., Chul Y. S., Kim Dae-Hyun y Kim Y. 2006. A retrospective cohort study of Parkinson's disease in Korean shipbuilders. *Neuro Toxicology, 27(3):445-449.*

Patel S., Sinha A. y Singh P. M. 2007. Identification of differentially expressed proteins in striatum of maneb-and paraquat-induced Parkinson's disease phenotype in mouse *Neurotoxicology and Teratology, 29:578-585.*

Pavón N., Vidal L., Álvarez P., Blanco L., Torres A., Rodríguez A. y Macías R. 1998. Evaluación conductual del modelo de lesión unilateral en ratas con 6-hidroxidopamina. Correlación entre las rotaciones inducidas por D-anfetamina, apomorfina y la prueba de habilidades manuales. *Rev Neurol. 26: 915-8*

Paxinos G., Watson C., Pennisi M. y Topple A. 1985. Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *Journal of Neuroscience Methods, 13: 139-143.*

Paxinos, G. y Watson C. 1986. *The rat brain in stereotaxic Coordinates. 2ª edición. Editorial Academic Press. NY, EEUU.*

Perese A. D., Ulman J., Viola J., Ewing E. S. y Bankiewicz S. K. 1989. A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model *Brain Research, 494:285-293.*

Perlmutter S. J. y Tabbal D. S. 2004. MPTP-Induced Nigrostriatal Injury in Nonhuman Primates. *En Animal models of movement disorders. Academic Press. E. U. A. 824p.*

Perumal S. A., Gopal B. V., Tordzro K. W., Cooper B. T. y Cadet L. J. 1992. Vitamin E Attenuates the Toxic Effects of 6-Hydroxydopamine on Free Radical Scavenging Systems in Rat Brain. *Brain Research Bulletin*, 29:699-701.

Phillips L. L., Lyeth B. G., Hamm R. J., Jiang J.Y., Povlishock y Reeves T.M. 1997. Effect of prior receptor antagonism on behavioural morbidity produced by combined fluid percussion injury and entorhinal cortical lesion. *Journal of Neuroscience Research*, 49:197-206.

Picconi B., Centonze D., Rossi S., Bernardi G. y Calabresi P. 2004. Therapeutic doses of L-dopa reverse hypersensitivity of corticostriatal D2-dopamine receptors and glutamatergic overactivity in experimental parkinsonism. *Brain*, 127:1661-1669.

Polymeropoulos M. H. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276:2045-2047.

Porter, C. Curt, Totaro A. J. y Stone A.C. 1963 6-hydroxidopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine on hearts of mice. *J. Prharmacol. Exp. Ther.* 140: 308-316.

Porter C. C., Totaro A. J., Burcin A. y Wynosky R.E. 1966. The effect of the optical isomers of α -Methyl-*p*-tyrosine upon brain and heart catecholamines in the mouse. *Biochemical Pharmacology*, 15: 583-590

Prasad K., Winnik B., Thiruchelvam J. M., Buckley B., Mirochnitchenko O. y Richfield K. E. 2007. Prolonged Toxicokinetics and Toxicodynamics of Paraquat in Mouse Brain. *Environ Health Perspect.* 115:1448-1453

Przedborski S., Levivier M., Jiang H., Ferreira M., Jackson-Lewis V., Donaldson D. y Togasaki M. D. 1995. Dose-dependent lesions of the dopaminergic Nigrostriatal pathway induced by Intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* 67(3):631-647.

Ramanathan D., Conner M. J. y Tuszynski. 2006. A form of motor cortical plasticity that correlates with recovery of function after brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(30):11370-11375.

Ramírez J. L. J., Ruíz S. J. L., Jiménez G. F. J., Ramírez V. J., Vargas F. E. y Gallegos A. M. P. 2006. Polimorfismo -116C-G del gen α -sinucleína en pacientes con enfermedad de Parkinson. *Salud Pública de México*. 48(4):289-290.

Rascol O., Brooks J. D., Korczyn D. A., De Deyn P. P., Clarke E. C. y Lang E. A. 2000. A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. *The New England Journal of Medicine*, 342:1484-1491.

Ravel, S., Sardo P., Legallet E. y Apicella P. 2006. Influence of Spatial Information on Responses of Tonically Active Neurons in the Monkey Striatum *J Neurophysiol*. 95: 2975-2986.

Ravina B., Camicioli R., Como G. P., Marsh L., Jankovic J., Weintraub D. y Elm J. 2007. *Neurology*, 69:342-347.

Reum T., Olshauzen F., Mazel T., Voříšek, Morgenstern R. y Syková E. 2002. Diffusion parameters in the striatum of rats with 6-hydroxydopamine-induced lesions and with fetal mesencephalic grafts. *Journal of Neuroscience Research*, 70:680-693.

Reiter, J. R. 1998. Oxidative damage in the Central Nervous System: Protection by Melatonin. *Progress in Neurobiology*, 56: 359-384.

Reiter J. R., Tan D., Mayo C. J., Sainz M. R., Leon J. y Czarnochi Z. 2003. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochimica Polonica*, 50(4):1129-1146.

Reith E. A. M., Xu C. y Chen N. H. 1997. Pharmacology and regulation of the neuronal dopamine transporter. *European Journal of Pharmacology*, 324:1-10.

Ringheima E. G. y Conant K. 2004. Neurodegenerative disease and the neuroimmune axis (Alzheimer's and Parkinson's disease, and viral infections). *Journal of Neuroimmunology*, 147:43-49

Rios C. y Tapia R. 1987. Changes in lipid peroxidation induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium in mouse brain homogenates. *Neurosci-Lett.* 77(3):321-326.

Roberts, C. S. D y Bloom E. Floyd. 1981. Adrenal steroid-induced changes in β -adrenergic receptor binding in rat hippocampus. *European Journal of Pharmacology*, 27:37-41.

Rochitta G., Rossana M., Esposito E. Marchetti B., Desole M. S., Miele E. y Serra P. A. 2006. Endogenous melatonin protects L-Dopa autooxidation in the striatal extracellular compartment of the freely moving rat: potential implication for long-term L-Dopa therapy in Parkinson's disease. *Journal of Pineal Research*, 40(3):204-213.

Rodríguez C., Mayo J. C., Sainz R. M., Antolin I., Herrera F., Martín V. y Reiter R. J. 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research*, 36:1-9.

Rodríguez R. A. C. y Hernández-Cruz J. I. 2006. Parkinson y estereotaxia en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez. *Arch Neurocién (Mex)*. 11(2): 123-132.

Rohkamm R. 2004. *Color Atlas of Neurology*. Thieme. Stuttgart, Alemania. 448p.

Romero J., Berrendero F., Pérez-Rosado A., Manzanarez J., Rojo A, Fernández-Ruiz J. J., Yebenes J. G. y Ramos J. A. 2000. Unilateral 6-Hydroxydopamine lesions of nigrostriatal dopaminergic neurons increased CB₁ receptors mRNA levels in the caudate putamen. *Life Sciences*, 66(6):485-494.

Rufo-Campos C. 2002. Melatonina y epilepsia. *Rev Neurol*. 35(1):S51-S58.

Salamone D. J., Mahan K. y Rogers S. 1993. Ventrolateral striatal dopamine depletions impair feeding and food handling in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44:605-610.

Sandoval, E. J. M. y Richard M. M. P. 2007. La salud mental en México. Cámara de Diputados División de Política Social. LIX Legislatura. DGS-SIID-SIA Disponible en: <http://bibliotecas.salud.gob.mx/greenstone/collect/publin1/index/assoc/HASH0190.dir/doc.pdf>

Sandyk R. 1992. Weak magnetic fields in the treatment of Parkinson's disease with the "on-off" phenomenon. *International Journal of Neuroscience*, 66(1y2):97-106.

Sañudo-Peña C. M., Patrick L. S., Patrick L. R. y Walker M. J. 1996. Effects of intranigral cannabinoids interact with the dopaminergic system. *Neuroscience Letters*, 206:21-24.

Scherfler C., Puschban Z., Ghorayeb I., Goebel G. P., Tison F., Jellinger K., Poewe W. y Wenning G. K. 2000. Complex motor disturbances in a sequential double lesion rat Model of striatonigral degeneration (multiple system atrophy). *Neuroscience*, 1(99):43-54.

Schultz W. 1998. The phasic reward signal of primate dopamine neurons. *Adv. Pharmacol*; 42:686-90.

Schultz W. 2002. Getting formal with Dopamine and reward. *Neuron*, 36:241-263.

Schultz W., Apicella P., Carnati E. y Ljungberg. 1992. Neuronal activity in Monkey ventral striatum related to the expectation of reward. *The Journal of Neuroscience*, 12(12):4595-4610.

Schultz, W., Apicella P. y Ljungberg T. 1993. Responses of Monkey Dopamine Neurons to Reward and Conditioned Stimuli during Successive Steps of Learning a Delayed Response Task. *The Journal of Neuroscience*, 13(3):900-913.

Schwartz W. R. K y Huston P. J. 1996. Unilateral 6-Hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. *Progress in Neurobiology*, 49:415-466.

Secretaría de Salud. 2002. Desarrolla la SSA técnica para el control del Parkinson y la epilepsia. Comunicado número 008 del catorce de enero. Disponible en: http://www.salud.gob.mx/unidades/dgcs/sala_noticias/comunicados/2002-01-14-008-CONTROL-DE-PARKINSON-Y-EPILEPSIA.htm

Secretaría de Salud. 2006a. La enfermedad de Parkinson, también puede presentarse en adultos jóvenes. Comunicado de prensa número 198 del nueve de abril. Disponible en:

http://www.salud.gob.mx/ssa_app/noticias/publica.php?tipo=0&seccion=2006-04-09_2128.html&n_seccion=Boletines

Secretaría de Salud. 2006b. Enfermedad de Parkinson, puede afectar a una de 40 personas adultas. Comunicado de prensa número 203 del once de abril. Disponible en: http://busca.salud.gob.mx/unidades/dgcs/sala_noticias/comunicados/2006_04_11_203-enfermeda_parkinson.htm

Serra P. A., Esposito G., Enrico P., Mura A. M., Migheli R., Delogu R., Miele M., Desole S. M., Grella G. y Miele E. 2000. Manganese increases L-DOPA auto-oxidation in the striatum of the freely moving rat: potential implications to L-DOPA long-term therapy of Parkinson's disease. *British Journal of Pharmacology*, 130: 937- 945.

Sharma R., McMillan R. C., Tenn C. C. y Niles P. L. 2006. Physiological neuroprotection by melatonin in a 6-Hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Brain Research*, 1068:230-236.

Shaw K. M., Stern G. M. y Sandler M. 1973. Melatonin and Parkinsonism. *Lancet*, 1(7797):271.

Shohamy, D., Myers E. C., Grossman S., Sage J. y Gluck A. M. 2005. The role of dopamine in cognitive sequence learning: evidence from Parkinson's disease. *156:191-199*

Shohamy D., Myers C.E., Kalanithi J. y Gluck M.A. 2008. Basal ganglia and dopamine contributions to probabilistic category learning. *Neuroscience and Biobehavioural Reviews*, 32(2):219-236.

Sieroń A., Brus R., Szkilnik R., Plech A., Cubański N. y Cieślak G. 1991. Influence of alternating low frequency magnetic fields on reactivity of central dopamine receptors on neonatal 6-hydroxydopamine treated rats. *Bioelectromagnetics*, 22:489-476.

Singh S., Ahmed R., Sagar K. R. y Krishana B. 2006. Neuroprotection of the nigrostriatal dopaminergic neurons by melatonin in hemiparkinsonium rat. *Indian J. Med Res.* 124:419-426.

Singh N., Pillay V. y Choonara E. Y. 2007. Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 81:29-44.

Singleton A. B., Farrer M., Johnson J., Singleton A., Hague S., Kachecrgus J., Hulihan M. Peuralinna T., Dutra A., Nussbaum R., Lincoln S., Crawley A., Hanson M., Maraganore D., Adler C., Cookson M. R., Muentner M., Baptista M., Miller D., Blancato J. Hardy J. Gwinn-Hardy K. 2003. α -synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302:841.

Slivka A. y Cohen G. 1985. Hydroxyl radical attack on Dopamine. *The Journal of Biological Chemistry*. 260(29):15466-15472.

Smith K. L. y Metz A. G. 2001. Dietary restriction alters motor function in rats. *Physiology and Behavior*, 85:581-592.

Smith, Y., Raju, D.V., Pare, J.F., Sidibe, M., 2004. The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends in Neurosciences*, 27:520- 527.

Smith M. P. y Cass W. A. 2007. Oxidative stress and dopamine depletion in an intrastriatal 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 144:1057-1066.

Smythies J. R. 2002. *The Dynamic Neuron*. MIT Press. Cambridge, England. 160p.

Sofic E., Rimpapa Z., Kundurovic Z. Sapcanin A., Tahirovic I. Rustenbegovic A. y Cao G. 2005. Antioxidant capacity of the neurohormone melatonin. *J. Neural. Transm.* 112:349-358.

Stramentinoli G., Gualano M., Catto E. y Algeri S. 1977. Tissue levels of S-adenosymethyonine in aged rats. *J Gerontol.* 32(4):392-394.

Strassman J. R. 2001. *DMT: The spirit molecule. A doctor's revolutionary research into the biology of near-death and mystical experiences*. Park Street Press. Vermont, U.S.A. 367p.

Strassman J. R., Qualls R. C., Lisansky J. E. y Peake T. G. 1991. Elevated rectal temperature produced by all-night bright light is reversed by melatonin infusion in men. *J. Appl. Physiol.* 71: 2178-2182.

Sundsten W. John. 1994. *Digital Anatomist: Interactive Brain Atlas*. University of Washington and Digital Anatomist Project department of Biological Structure. URL: <http://da->

atlases.biostr.washington.edu/cgi-bin/DA/PageMaster?atlas:Neuroanatomy+ffpathIndex:Splash^Page+2

Swanson W. L. 2000. What is the brain?. *Trends in Neuroscience*, 23(11):519-527.

Swerdlow R. H, Parker W. D. Currie L. J., Benett J. P., Harrison M. B., Trugman J. M. y Wooten G. F. 2001. Gender ratio differences between Parkinson's disease patients and their affected relatives. *Parkinsonism Relat Disord*. 7(2):129-133.

Taha M. L. 2007. El legado Histórico de la Medicina Griega. *Rev. Chil. Neurocirug*. 28:89-100.

Takahashi M. y Yamada T. 1999. Viral etiology for Parkinson's disease. A possible role of influenza A virus infection. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 52(3):89-98.

Takakusaki K. 2008. Forebrain control of locomotor behaviors. *Brain Research Reviews*, 57:192-198.

Takakusaki K., Habaguchi T., Ohtinata-Sugimoto J., Saitoh K. y Sakamoto T. 2003. Basal ganglia efferents to the brainstem centers controlling postural muscle tone and locomotion: a new concept for understanding motor disorders in basal ganglia dysfunction. *Neuroscience*, 119:293-308.

Takakusaki S. K., Harada H. y Kashiwayanagi M. 2004. Role of basal ganglia–brainstem pathways in the control of motor behaviors. *Neuroscience Research*, 50:137-151.

Tanaka H., Kannari K., Maeda T., Tomiyama., Suda T. y Matsunaga M. 1999. Role of serotonergic neurons in L-DOPA-derived extracellular dopamine in the striatum of 6-OHDA-lesioned rats. *NeuroReport*, 10:631-634.

Talos I. F., Rubin L. D., Halle M. Musen M. y Kikinis R. 2008. A prototype symbolic model of canonical functional neuroanatomy of the motor system. *Journal of Biomedical Informatics*, 41(2):251-263.

Taylor K. S. M., Cook J. A. y Counsell C. E. 2007. Heterogeneity in male to female risk for Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 78:905-906.

Tenn C. C. y Niles L. P. 1995. Central-type Benzodiazepine receptors mediate the antidopaminergic effect of Clonazepam and Melatonin in 6-Hidroxidopamine lesioned rats: Involvement of a Gabaergic mechanism. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 274:84-89.

Tisch Stephen, Silberstein P., Limousin-Dowsey P. y Jahanshahi M. 2004. The basal ganglia: anatomy, physiology, and pharmacology. *Psychiatr. Clin. N. Am.* 27:757-799.

Torres C. O., León M., Alvarez E., Maragoto C., Alvarez L. y Rivera O. 2001. Rehabilitación del lenguaje en la enfermedad de Parkinson. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 2(4): 241-244.

Tropp, Jennifer y Markus E. J. 2001. Sex differences in the dynamics of cue utilization and exploratory behavior. *Behavioural Brain Research*, 119:143-154.

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

Ungerstedt Urban. 1968. 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European Journal of Pharmacology*, 5:107-110.

Ungerstedt, U., Butcher L. L., Butcher G. S., Ande'n Nils-Erik y Fuxe K. 1969. Direct chemical stimulation of dopaminergic mechanisms in the neostriatum of the rat. *Brain Research*, 14:461-471.

Uthayathas S., Senthilkumar S., Karuppagounder S. S., Sibel Ilbasimis Tamer I. S., Parameshwaran K., Degim T., Suppiramaniam V. y Dhanasekaran M. 2007. Evaluation of neuroprotective and anti-fatigue effects of sildenafil. *Life Sciences*, 81:988-992.

Utter A. A. y Basso M. A. 2008. The basal ganglia: An overview of circuits and function. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 32(3):333-342.

Valente E. M. 2004. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304:1158-1160.

Vriend J. y Dreger L. 2006. Effects of haloperidol and melatonin on the in situ activity of nigrostriatal tyrosine hydroxylase in male Syrian hamsters. *Life Sciences*, 78:1707-1712.

Waldhauser F., Waldhauser M., Lieberman H.R., Deng M.H., Lynch H.J. y Wurtman R.J. 1984. Bioavailability of oral melatonin in humans. *Neuroendocrinology*, 39: 307-313.

Wessels-Reiker M., Haycock W. J., Howlett C. A. y Strong R. 1991. Vasoactive intestinal polypeptide induces Tyrosine Hydroxylase in PC 12 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(15):9347-9350.

Whishaw Q. I., Coles K. L. B., Pellis M. S. y Miklyaeva I. E. 1997. Impairments and compensation in mouth and limb use in free feeding after unilateral dopamine depletions in a rat analog of human Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*, 84: 167-177.

Whishaw Q. I., Suchowersky O., Davis L., Sarna J., Metz A. G. y Pellis M. S. 2002. Impairment of pronation, supination, and body co-ordination in reach-to-grasp task in human Parkinson's disease (PD) reveals homology to deficits in animal models. *Behavioural Brain Research*, 133: 165-176.

Willis L. G. 2005 .The therapeutic effects of dopamine replacement therapy and its psychiatric side effects are mediated by pineal function. *Behavioural Brain Research*, 160:148-160.

Willis L. G. y Maxwell A. S. 1999. A therapeutic role for melatonin antagonism in experimental models of Parkinson's disease. *Physiology & Behavior*, 5(66):785-795.

Willis L. G. y Robertson D. A. 2004. Recovery of experimental Parkinson's disease with the melatonin analogues ML-23 and S-20928 in a chronic, bilateral 6-OHDA model: a new mechanism involving antagonism of the melatonin receptor. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 79: 413-429.

Winkler C., Kirik D., Björklund A. Y Cenci A. 2002. L-Dopa-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-Hydroxydopamine Model of Parkinson's disease: Relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiology of disease*, 10:165-186.

Wolden-Hanson Y., Mitton R. D., McCantis L. R., Yellon M. S., Wilkinson W. C., Matsumoto M. A. Y Rasmussen D. D. 2000. Daily melatonin administration to middle-aged rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake of total body fat. *Endocrinology*, 141(2):487-497.

Wong C.A., Shetreat E. M., Clarke O. J. y Rayport S. 1999. D l- and d2-like dopamine receptors are Co-localized on the presynaptic varicosities of Striatal and nucleus accumbens neurons In vitro. *Neuroscience*, 89(1): 221-233.

Yon J. H., Carter B. S., Reiter J. R. y Jevtovic-Todorovic V. 2006. Melatonin reduces the severity of anesthesia-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *Neurobiology of Disease*, 21:522-530.

Zeng Y. B., Dass B., Owen A., Rose S., Cannizzaro E. Tel C. B. y Jenner P. 1999. Chronic L-Dopa treatment increases cannabinoid CB1 receptor mRNA expression in 6-Hydroxydopamine lesioned-rats. *Neuroscience letters*, 276:71-74.

Zhdanova V. I., Cantor L. M., Leclair U. O., Kartashov I. A. y Wurtman J. R. 1998. Behavioral effects of Melatonin Treatment in Non-Human Primates. *Sleep Research Online*, 1(3):114-118.

Zuch L. C., Nordstroem K. V., Briedrick A. L., Hoering R. G., Granholm A. C. y Bickford C. P. 2000. Time course of degenerative alterations in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion. *The Journal of Comparative Neurology*, 427:440-454.

9. APÉNDICE

9.1. Perfusión intracardiaca vía aórtica

Perfusión para una rata

Preparación de 200 ml de Fijador de paraformaldehído y glutaraldehído al 2% (A+B) y 200 ml de solución salina isotónica al 9% (C).

Solución A (y Buffer PBS)		Solución B	
Reactivo	Cantidad	Reactivo	Cantidad
Agua destilada	150 ml	Agua destilada	100 ml
Fosfato monobásico	0.612 g	Paraformaldehído	4 g
Fosfato dibásico	3.534 g	Hidróxido de sodio	2 a 3 hojuelas
Cloruro de sodio	0.208 g	Glutaraldehído al 50%	8 ml

Para la preparación de la solución A se pesan las cantidades especificadas y se mezclan homogéneamente. Una vez preparada, se toman 50ml de esta solución y se le agregan 50 ml de agua destilada para obtener una solución a 0.1M que se ajusta a Ph=7.4 (Buffer PBS) para utilizarlo en los lavados del tejido en la prueba inmunocitoquímica anti-TH. Los 50ml restantes son la solución A, que se mezclará con la solución B para la preparación del fijador.

La solución B se prepara calentando los 100 ml de agua destilada a 50° C para facilitar la disolución del hidróxido de sodio y el paraformaldehído. Una vez que se obtiene una mezcla homogénea transparente se enfría a 24° C y se agrega el glutaraldehído. La solución resultante es B, ésta se mezcla con la solución A para obtener el fijador a 0.1 M. El Ph se ajusta a 7.4; puede hacerse agregando pequeñas cantidades de una solución de hidróxido de sodio si la mezcla es muy ácida, o de ácido clorhídrico si es muy básica.

Solución C (Salina al 9%)

En 200 ml de agua destilada se disuelven 1.8 g de cloruro de sodio.

Una vez preparado el fijador se coloca en un extremo de la bomba peristáltica y se comienza a bombear antes de comenzar la perfusión hasta eliminar burbujas de aire en el dispositivo. Posteriormente se coloca en el otro extremo la solución salina y se repite el procedimiento para eliminar burbujas. La perfusión comienza con el bombeo inicial de la solución salina y posteriormente del fijador. Ya extraídos los cerebros, se conservan en un vial de cristal conteniendo fijador por lo menos un día en refrigeración.

9.2. Inmunocitoquímica anti-TH

- De los cerebros extraídos se hacen cortes coronales de 50 μm de espesor del cuerpo estriado (núcleo caudado) y de la sustancia *nigra* en el vibratomo.
- Se hacen 3 lavados con PBS (ver preparación de PBS en 9.1) de 10 minutos cada uno con agitación. En cada lavado, cada porción de tejido (lado derecho, lado izquierdo, nigra o estriado) se lava en aproximadamente 1ml de PBS o de TRIS cuando así se indica.
- 3 lavados con TRIS de 10 minutos cada uno (1.51g de TRIS en 100 ml de agua destilada ajustado a $\text{pH}=7.4$)
- Los cortes se sumergen en H_2O_2 al 3% (9 μl de H_2O_2 / 1ml de TRIS) mas metanol al 10% (100 μl de metanol / 1ml de TRIS) durante 30 minutos.
- 3 lavados con TRIS de 10 minutos cada uno con agitación.
- Se sumergen los cortes en borhídrido de sodio al 1% en TRIS (0.01g de borhídrido de sodio en 1ml de TRIS) durante 30 minutos con agitación. *Utilizar guantes cubreboca y bata. Preparar en la oscuridad. El vial debe ir cubierto con papel aluminio y la disolución debe hacerse bajo la campana de extracción.*
- 3 lavados con TRIS de 10 minutos cada uno con agitación.
- Sumergir los cortes en una mezcla de TRIS con 3% de suero normal de cabra y 0.3% de tritón por una hora con agitación (30 μl de suero normal y 30 μl de tritón por cada ml de TRIS. El tritón previamente se diluye en proporción 1:10 para su fácil manejo).
- Incubar tejido en una alícuota (1:1) de anticuerpo primario anti-TH (Ab 1° anti-TH) en TRIS (1:1000) y 1% de suero normal de cabra por tres días en refrigeración a 4° C (en una alícuota de Ab 1° anti-TH se agrega 1ml de TRIS y 10 μl de suero normal de cabra).
- 3 lavados con TRIS y suero normal de cabra (10 μl de suero por cada 1ml de TRIS) de 10 minutos cada uno con agitación.
- Se incuba el tejido por dos horas a temperatura ambiente el anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina IgG de conejo (Ab 2° anti-IgG) (1:200) en TRIS mas 1% de suero normal de cabra con agitación (5 μl de Ab 2° y 10 μl de suero normal de cabra por cada 1ml de TRIS).
- 3 lavados con TRIS de 10 minutos cada uno con agitación.
- Se incuba el tejido en avidina-biotina (1:200) por dos horas a temperatura ambiente (6 μl de avidina y 6 μl de biotina por cada 1ml de TRIS)
- 3 lavados con TRIS de 10 minutos cada uno con agitación.
- Incubar el tejido en 3-3diaminobenzidina (DAB) al 0.05% y 0.03 de H_2O_2 (una pastilla de DAB se disuelve en 400 μl de agua destilada; se hacen cuatro alícuotas de 100 μl cada una). Una vez hechas las alícuotas se pone una en 1ml de TRIS. Se incuba el tejido con 1000 μl de esta mezcla mas 3 μl de H_2O_2 y 100 μl de sulfato de níquel al 40% (0.04g de sulfato de níquel amonio hexahidratado en

un 1ml de agua bidestilada). *Usar guantes y cubreboca. Todo el material en contacto con DAB se debe de sumergir en agua con cloro.*

- 3 lavados con TRIS de 10 minutos cada uno con agitación.
- Montar los cortes en portaobjetos previamente gelatinizados y dejarlos secar un día.
- Se prepara una batería de vasos de Coplin con alcohol a diferentes concentraciones y xilol. Se sumergen los portaobjetos con el tejido durante un minuto en cada vaso. La batería se ordena como sigue: dos recipientes con alcohol al 70%, dos al 96%, dos al 100% y finalmente dos recipientes con xilol.
- Se aplica resina para microscopía de luz a la preparación y se coloca el cubreobjetos sin dejar burbujas.

9.2.1. Gelatinización de portaobjetos

- Se incluyen portaobjetos en una solución de etanol-ácido gliacilacético por dos horas.
- Lavar con agua destilada.
- Incluir en solución de gelatina por una hora en un horno a temperatura media.
- Sacarlos y escurrirlos.
- Regresarlos a horno una hora.
- Sacarlos y dejarlos al aire libre hasta que se sequen.

9.3. Impregnación con nitrato de plata, método de Golgi

- Del tejido del telencéfalo inmediatamente posterior al seleccionado para obtener el cuerpo estriado para la prueba inmunocitoquímica, se secciona una porción coronal de aproximadamente 300 μ m de espesor que contiene parte del cuerpo estriado de cada cerebro. Se lavan en PBS y se sumergen en una mezcla de tetraóxido de osmio-dicromato de potasio (1g de OsO₄ y 8g de K₂Cr₂O₇ en 300ml de agua bidestilada) por siete días a temperatura ambiente en oscuridad. Aproximadamente 10ml de la solución por corte.
- 3 lavados con nitrato de plata al 0.75% (0.75g de nitrato de plata / 100ml de agua bidestilada). La solución vira a color rojizo inicialmente aclarándose en los últimos lavados. Se conservan por 24 horas a temperatura ambiente en la misma solución en oscuridad en un recipiente bien cerrado.
- Una vez retirado el exceso de nitrato de plata con papel filtro, los cortes se encastran en un bloque de parafina, para poder realizar los cortes coronales en el microtomo de aproximadamente 120 μ m de espesor. La parte expuesta del tejido se baña constantemente con alcohol al 95% a la vez que se lubrica la cuchilla durante el corte. El tejido es muy frágil por lo que debe procurarse el mayor cuidado posible.

- Los cortes se tratan en una batería de cajas de petri como sigue: deshidratación en dos baños de alcohol absoluto de 10 minutos cada uno; aclaración en un baño con esencia de clavo durante 10 minutos y dos baños en xilol como medio intermediario con la resina.
- Montaje en portaobjetos, aplicación de resina sintética para microscopía de luz y colocación de cubreobjetos sin dejar burbujas.

ABREVIACIONES

6-OHDA	6-hidroxidopamina	MPTP	metil-fenil-tetrahidropiridona
ATV	Área tegmental ventral	MRI	Imagen de resonancia magnética
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico	NADH	Nicotinamida adenindinucleótido reducido
BDNF	factor neurotrófico derivado del cerebro	NADPH	Nicotinamida adenindinucleótido fosfato reducido
BH ₄	tetrahidropteridina	NE	norepinefrina
CTE	cadena de transporte electrónico	NEM	Neuronas espinosas medianas
D1 (-5)*	receptor de dopamina tipo 1 (a 5)*	NO·	óxido nítrico
DA	dopamina	NPP	núcleo pedúnculopontino
DAT	transportador de dopamina	NST	núcleo subtalámico
DDC	Dopa decarboxilasa	O ₂ ⁻	anión superóxido
E	epinefrina	OH ⁻	radical hidroxilo
EP	enfermedad de Parkinson	ONOO ⁻	anión peroxinitrito
GB	ganglios basales	PLP	piridoxal fosfato
GDNF	factor neurotrófico derivado de células gliales	RML	región mesencefálica locomotora
GPe	globo pálido externo	SM	Sistema motor
GPi	globo pálido interno	SME	Sistema motor extrapiramidal
GPx	glutación peroxidasa	SMP	Sistema motor piramidal
GR	Glutación reductasa	SNC	Sistema Nervioso Central
GSH	glutación reducido	SN	Sustancia <i>nigra</i>
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno	SNc	Sustancia <i>nigra</i> parte compacta
MAO	monoaminoxidasa	SNr	Sustancia <i>nigra</i> parte reticulada
Mia	Movimientos involuntarios anormales	SOD	superóxido dismutasa
MPP ⁺	ion 1-metil-4fenil-2,3-dihidropiridinium	TH	tirosina hidroxilasa
		VHS	virus de herpes simple