



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

Facultad de Psicología

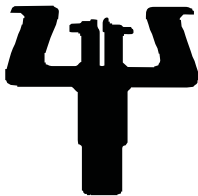
**“Efecto de la administración de epicatequina en
contra del daño inducido por MPP⁺ en un modelo
experimental de la enfermedad de Parkinson”**

TESIS

Para obtener el título de:
Licenciada en Psicología

PRESENTA
Gently Elisa Gorostieta Salas

Director de tesis: **Dr. Moisés Rubio Osornio**



**FACULTAD
DE PSICOLOGIA**

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A Elisa....

Mi madre, mi apoyo, mi amiga, mi ejemplo y el mayor orgullo de mi vida.

A Isaac, David e Ikar.....

Hermanos, amigos, cómplices y una extensión de mi alma.

Gracias.

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Moisés Rubio Osornio por su guía, su paciencia y por cada uno de sus sabios consejos.

A la Dra. Claudia Gómez Acevedo por su apoyo y compañía.

Al Dr. Sergio Montes y Dra. Francisca Pérez.

*La ciencia es respecto del alma lo que es la luz respecto de
los ojos, y si las raíces son amargas, los frutos son muy
dulces*

Aristóteles...

ÍNDICE

1. Abreviaturas	6
2. Resumen.....	8
3. Introducción	9
4. Antecedentes	11
5. Generalidades de la enfermedad de Parkinson.....	12
5.1. Características clínicas de la EP	13
6. Organización del movimiento y EP	16
6.1. Cuerpo estriado.....	17
7. Trastornos neuroquímicos de la EP	19
8. Características bioquímicas de la EP	23
8.1. Radicales libres.....	24
9. Estrés oxidante.....	25
10. Fármacos utilizados en tratamiento de la EP.....	26
10.1. Fármacos dopaminérgicos.....	26
10.2. Fármacos anticolinérgicos	27
11. Modelos experimentales de la EP.....	28
11.1. MPTP Y 6-OHDA.....	28
11.2. MPP ⁺ como modelo experimental para la EP	29
12. Epicatequina	31
12.1. Investigación epidemiológica en humanos.....	35
13. HIPÓTESIS.	37
14. OBJETIVO GENERAL.	37
14.1. Objetivos Particulares.	37
15. MÉTODO.	38
16. Análisis estadístico	42
17. RESULTADOS.	43
17.1. Efecto de dosis crecientes de MPP ⁺ sobre la conducta de giro.....	43
17.2. Efecto de la administración crónica de EC (40 mg/kg/día) a través de la conducta de giro	44
17.3. Contenido estriatal de DA, esquema de administración crónico	45
17.4. Contenido estriatal de HVA, esquema de administración crónico.....	46

17.5. Efecto de dosis crecientes de EC a través de la conducta de giro inducida por MPP ⁺	47
17.6. Marcadores de daño hepático.....	49
17.7. Contenido estriatal de DA, esquema de administración agudo.....	50
17.8. Contenido estriatal de HVA, esquema de administración agudo.....	51
17.9. Peroxidación de lípidos.....	52
18. DISCUSIÓN	53
19. CONCLUSIONES	58
20. REFERENCIAS.....	59
21. Anexo 1	68
21.1. Globo Pálido.....	68
21.2. Sustancia Nigra.....	68
21.3. Núcleo subtálmico.....	69
22. Anexo 2	70
22.1. Cadena Respiratoria Mitocondrial.....	70

1. Abreviaturas

ALP	Fosfatasa Alcalina
ALT	Alanino Aminotransferasa
ATP	Adenosín Trifosfato
CE	Cuerpo Estriado
COMT	Catecol-O-Metil Transferasa
DA	Dopamina
DAT	Transportador de Dopamina
DOPAC	Ácido 3,4-Dihidroxifenilacético
EC	Epicatequina
EGCG	Epigallocatequina Galato
EP	Enfermedad de Parkinson
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
Fe ²⁺	Fierro Ferroso
Fe ³⁺	Fierro Férrico
Gpe	Globo Pálido Externo
Gpi	Globo Pálido Interno
GSH	Glutation Reducido
GPx	Glutation Peroxidasa
Ho-1	Hemoxigenasa 1
HVA	Ácido Homovalínico
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
L-Dopa	L-Dihidroxifenilalanina
MAO	Monoamino Oxidasa
MPP ⁺	1-Metil-4-Fenilpiridinio
MPTP	1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido.
NOS	Óxido Nítrico Sintasa
$\cdot\text{O}_2^-$	Superóxido
$\cdot\text{OH}$	Radical Hidroxilo

ONOO ⁻	Peroxinitrito
PKC	Proteína Cinasa C
PL	Peroxidación Lipídica
RL	Radicales Libres
SN	Sustancia Negra
SNC	Sistema Nervioso Central
SNc	Sustancia Nigra Pars Compacta
SNr	Sustancia Nigra Pars Reticulada
SOD	Superpóxido Dismutasa
TH	Tirosina Hidroxilasa
VTA	Área Tegmental Ventral
γ- GTA	Gamma Glutamil Transpeptidasa

2. Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por alteraciones del movimiento, asociadas a la disminución en la neurotransmisión dopaminérgica de la vía nigro-estriado. La disminución en el contenido de dopamina (DA) se asocia a la muerte neuronal dopaminérgica causada aparentemente por estrés oxidante. La administración de la neurotoxina 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺) en animales de experimentación reproduce las principales características bioquímicas de la EP. El MPP⁺ inhibe el complejo I de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria y da lugar a una sobreproducción de radicales libres (RL). El aumento en la formación de RL conduce a estrés oxidante, déficit de DA y alteraciones de la conducta. Por su parte, las catequinas son flavonoides (compuestos fenólicos) derivados del té verde, que han demostrado su capacidad como atrapadores de radicales libres, inductores de enzimas antioxidantes, moduladores del estado redox y quelantes de metales de transición. En consecuencia, en el presente trabajo se evaluó el efecto tanto de la administración oral crónica de 40 mg/kg/día de epicatequina (EC) como el efecto de la administración oral aguda de dosis crecientes de EC en contra de las alteraciones conductuales y bioquímicas inducidas por la microinyección intraestriatal de MPP⁺ (10 µg/8µL). Los resultados del estudio dosis-dependiente demuestran que sólo el pre-tratamiento con 100 mg/kg de EC administrada 5 horas antes de la lesión con MPP⁺ es capaz de disminuir significativamente ($p < 0.05$) la conducta de giro inducida por la administración de apomorfina en los animales lesionados con MPP⁺, observándose una disminución significativa ($p < 0.05$) en el contenido de DA inducidos por MPP⁺ y la preservación del analito a causa del pre-tratamiento con EC. Asimismo, se demostró que el pre-tratamiento con EC disminuye significativamente ($p < 0.05$) la formación de productos lipídicos fluorescentes inducido por la infusión de MPP⁺. Los resultados del presente trabajo revelan que el pre-tratamiento con 100 mg/kg de EC es efectivo en contra del daño por MPP⁺; sin embargo, son necesarios futuros estudios para conocer el mecanismo de acción de EC.

3. Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) se define como un desorden neurodegenerativo crónico y progresivo, caracterizado por la pérdida gradual de la capacidad para efectuar movimientos voluntarios como consecuencia de la disminución en los niveles de dopamina (DA) en la sustancia nigra pars compacta (SNc). Este declinamiento ha sido asociado a la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la vía nigroestriatal causada presumiblemente por estrés oxidante. (Blandini et al., 2000; Royal College of Physicians, 2006; Mousey et al., 2011). Los estudios en modelos animales de la EP apoyan la hipótesis del estrés oxidante como la causa principal de la muerte neuronal, debido a que las células dopaminérgicas de la SNc son especialmente vulnerables a las especies reactivas de oxígeno (Blum et al., 2001).

En México, se ha estimado una prevalencia de entre 40 a 50 casos por cada 100,000 habitantes al año. En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía es la cuarta causa de consulta (México, Secretaría de Salud 2010, recuperado 3 de septiembre de 2012).

Actualmente no existe un método de diagnóstico temprano para la EP, éste se basa en las observaciones clínicas de los síntomas (Royal College of Physicians, 2006), entre los que destacan: bradicinesia, hipocinesia, rigidez y temblor en reposo. Dada la etiología desconocida de la enfermedad, las terapias farmacológicas son dirigidas esencialmente al control de los síntomas. Entre los fármacos más utilizados se encuentra la L-dihidroxitifenilalanina (L-dopa) cuya eficacia disminuye en los primeros 5 años de su administración (Blum et al., 2001).

Debido a la alta prevalencia de la enfermedad y la falta de tratamientos efectivos, la EP afecta tanto a los pacientes que la padecen, como a sus familiares de manera indirecta (Royal College of Physicians, 2006). Los cuidados paliativos requeridos por los pacientes parkinsonianos, llevan a los encargados de su cuidado a enfrentar problemas económicos que involucran tratamientos prolongados, estrés, problemas de salud, impotencia y depresión

ante la pérdida del enfermo, principalmente porque la EP es un trastorno de carácter neurodegenerativo, progresivo e incurable (Hasson et al., 2010).

Dada la situación, el presente trabajo sugiere y evalúa el uso de la epicatequina (un flavonoide presente en las hojas del té verde), como una alternativa terapéutica basada en las propiedades antioxidantes con posibles efectos neuroprotectores. La terapia a base de neuroprotectores no pretende compensar el daño en los circuitos neuronales y no puede reemplazar a las celulas dañadas, sin embargo, la neuroprotección ofrece una alternativa para preservar las células restantes y detener la progresión de la enfermedad (Toulous y Sullivan, 2008).

Con base en las características neuroprotectoras que han mostrado las catequinas en diversos modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, en este trabajo se ha propuesto su valoración en contra del daño neuronal dopaminérgico inducido por MPP⁺ como modelo experimental de la EP.

4. Antecedentes

Los síntomas de la EP fueron descritos por primera vez por el médico inglés James Parkinson, quien nombró a la enfermedad como “parálisis agitante” (Micheli, 1998). Para 1861-1862 Charcot y Vulpain describen su experiencia con enfermos de “parálisis agitante” agregando más síntomas a la descripción clínica hecha por Parkinson, adicionalmente, nombran a dicho padecimiento como “Enfermedad de Parkinson” (Huber y Cummings, 1992). En 1912, Lewy, descubre agregados proteícos anormales en el citoplasma de las neuronas en pacientes con la EP (Micheli, 1998). Siete años más tarde, Tetriakoff recalzó una reducción en el número de células pigmentadas en la SN y relacionó estos cambios con las anomalías del tono muscular que presentaban los pacientes (Huber y Cummings, 1992). Hacia 1960, Ehringer y Hornykiewicz observaron y demostraron una disminución de dopamina en el cuerpo estriado. Como consecuencia de estos hallazgos, en 1961 Birkmayer y Hornykiewicz administraron por primera vez L-dopa, bajo el supuesto de una terapia que remplazara la pérdida del neurotransmisor (Micheli, 1998). Para el año de 1989, se identificó por primera vez, un defecto mitocondrial en la SN de pacientes con EP. Estudios posteriores demostraron una deficiencia de hasta el 35% en el complejo I mitocondrial en las células de la SN asociada a la sobreexpresión de la proteína Parkin y PINK1 (Shapira et al., 2011). Esta deficiencia en el complejo I involucra una disminución en los niveles de ATP y en consecuencia la deficiencia mitocondrial (Schapira, 2007). Durante ese mismo año, se observó un decremento en los niveles de glutatión reducido (GSH) en pacientes con EP y en consecuencia alteraciones en el estado redox de la célula (Martin y Teismann, 2009). Finalmente, múltiples contribuciones a finales de los 80`s permitieron dilucidar el papel del hierro como posible actor en la patogénesis de la EP. Un estudio llevado a cabo por Sofic y colabs. en 1988 demostró un aumento de hasta 77% en el nivel de hierro en la SN de pacientes con la EP comparado con sujetos control así como, una disminución en las concentraciones de ferritina (Gerlach et al., 1994). La importancia del hierro libre radica en su capacidad de catalizar reacciones de oxidación en las que los radicales libres se forman, (Lan y Jiang, 1997). A pesar de que los datos acumulados a lo largo del tiempo permiten el establecimiento de hipótesis

sobre las causas de la enfermedad, hasta el día de hoy la etiología de la EP es de carácter desconocido.

5. Generalidades de la enfermedad de Parkinson

La EP se clasifica como una enfermedad multifactorial, con posibles implicaciones metabólicas, genéticas y ambientales. Aunque en la mayoría de los casos (95%), la EP se define como un trastorno idiopático, el 5% restante es el resultado de mutaciones del gen α -sinucleína en el cromosoma 4 (Blandini et al., 2000). La EP inicia frecuentemente durante la sexta y la séptima décadas de la vida. La progresión negativa de los síntomas se presenta aproximadamente 10 años después del inicio de la enfermedad, con una edad promedio a la muerte de 75 años (Gutiérrez et al., 2011). Entre los factores de riesgo se cuenta la edad. La prevalencia de la EP en individuos menores a 40 años es menor a 5 casos en 100,000 habitantes mientras, la prevalencia en individuos de 70 años o mayores es de 700 casos en 100,000 habitantes (Siderowf, 2001). La EP afecta principalmente a los hombres con una proporción de 2:1 respecto a las mujeres, sin importar nacionalidad o edad. Los datos epidemiológicos sugieren un efecto protector por parte de los estrógenos, aunque no existe evidencia contundente que lo sustente (Gillis y Mcarthur, 2010). En conjunto, se sugiere mayor prevalencia de la EP en personas de piel blanca comparado con personas de piel negra, así como un menor número de población afectada en países como Japón, China y África, respecto a Europa y América del norte (Tañer y Goldman, 1997).

5.1. Características clínicas de la EP

El diagnóstico en la EP suele ser de naturaleza clínica, apoyado de técnicas de neuroimagen funcional que permiten observar cambios en el volumen relativo de la SNc (despigmentación). De estas técnicas destacan la tomografía computarizada, resonancia magnética y tomografía por emisión de positrones (Pérez, 2009). Desafortunadamente, los síntomas clínicos no resultan evidentes hasta que se ha perdido de un 50-70% de las neuronas dopaminérgicas y alrededor de 80% de DA, es decir, cuando la enfermedad está relativamente avanzada (Blum et al., 2001).

Los síntomas presentes en la EP pueden clasificarse en: a) síntomas motores, b) síntomas motores secundarios y C) síntomas no motores (Cranwell-Bruce, 2010).

Dentro de los síntomas motores destacan los siguientes (Pérez, 2009):

1. Temblor: el temblor característico de la EP aparece en reposo, es decir, cuando no está presente ningún grado de contracción muscular voluntaria y presenta una frecuencia de 4-6 hz. Este tipo de temblor suele aumentar con la realización de tareas cognitivas o motoras con otras partes del cuerpo y es suprimido por contracciones musculares voluntarias.
2. Rigidez: se manifiesta como un aumento de la resistencia a la movilización de un segmento articular.
3. Acinesia: suele ser el problema motor más incapacitante y se define como la ausencia de movimiento o el retraso para iniciarlo.
4. Hipocinesia: se define como una disminución y lentificación de los movimientos.
5. Bradicinesia: hace referencia a la lentitud observada al iniciar y repetir movimientos.

En la EP se pueden observar también síntomas motores secundarios, que a pesar de ser característicos de la enfermedad no afectan a todos los pacientes (Cranwell-Bruce, 2010):

1. Inestabilidad postural
2. Postura encorvada
3. Disfunción sexual
4. Calambres en los músculos

Además, los pacientes con la EP pueden mostrar síntomas secundarios no motores, entre los que se encuentran (Cranwell-Bruce, 2010):

1. Ansiedad: los trastornos de ansiedad generalizada se observan en pacientes con la EP en estados avanzados; los enfermos suelen sufrir ataques de pánico (Pérez, 2009).
2. Demencia: las funciones ejecutivas y la fluidez verbal se ven afectadas desde etapas tempranas de la EP. Cuando la enfermedad progresa el índice de pacientes que pueden sufrir demencias oscila entre 20 y 78% (Emre et al., 2007). Se estima que los pacientes parkinsonianos desarrollan un riesgo de hasta seis veces superior al de la población general de sufrir estados demenciales (Aarsaland et al., 2001).
3. Trastornos del sueño: más de la mitad de los pacientes con la EP presenta trastornos de conducta durante el sueño MOR. Estos emiten vocalizaciones (chillan, hablan, lloran) y presentan movimientos (sacudidas, patadas, se incorporan) asociados a ensoñaciones desagradables (Shenck et al., 1996).
4. Depresión: se estima que 40% de los pacientes con EP sufren depresión a lo largo de la enfermedad (Tandberg et al., 1996).

La EP puede iniciar de 4 formas distintas (Gutiérrez et al., 2011):

1. **Desorden de la marcha:** caracterizada por movimientos asimétricos de los brazos y arrastre de pies.

2. Una pierna débil o torpe: atraso con una pierna al caminar, (comienza asimétricamente en 75% de los pacientes).
3. Temblor: al descanso, se presenta normalmente en la mano y es asimétrico. Se considera el punto de referencia del diagnóstico en ausencia de otro signo, pero está ausente en 25% de los casos.

A pesar de que estos síntomas son los indicadores inequívocos de la EP, en algunas ocasiones suelen presentarse síntomas no motores algunos años antes (Pérez, 2009; Gutiérrez et al., 2011).

El cuadro clínico que se observa en la EP, coloca a este padecimiento como una alteración que afecta principalmente al sistema motor; por ello resulta indispensable llevar a cabo un análisis de los circuitos motores involucrados en el comportamiento normal, a fin de comprender la etiología de padecimientos neurológicos que los afectan (Kandel, 2000).

6. Organización del movimiento y EP

La ejecución y planificación del movimiento involucra tanto áreas corticales de naturaleza asociativa, encargadas de la jerarquización de la información sensorial a la que el organismo responde. Así como, áreas de la corteza frontal entre las que se encuentran la corteza premotora y la corteza motora primaria involucradas en la planificación y ejecución del movimiento, respectivamente. Además de estructuras subcorticales como los ganglios basales, principalmente afectados en la EP (Kandel, 2000).

Los ganglios basales son estructuras conformadas por cuatro núcleos principales: a) el cuerpo estriado (CE), dividido en dos estructuras macroscópicas: el núcleo caudado y el putamen, b) el globo pálido, constituido por dos segmentos, uno interno (GPi) y uno externo (GPe), c) el núcleo subtálmico y d) la sustancia nigra que comprende a la porción reticulada (SNr) y a la porción compacta (SNc) (Blandini et al., 2000; Yelnik., 2002). En conjunto, estos núcleos representan un componente esencial en la ejecución de movimientos al incluir circuitos subcorticales de retroalimentación regulando áreas motoras corticales y del tronco encefálico (Purves, 2001). Estos reciben proyecciones provenientes principalmente de la corteza motora y proyectan la información de regreso a través del tálamo, logrando así, una planificación y ejecución apropiada del movimiento (Kandel, 2000; Purves, 2001).

6.1. Cuerpo estriado

Dentro de la regulación que ejercen los ganglios basales sobre el movimiento se destacan las conexiones nigroestriatales cuyo principal neurotransmisor es la DA. Los núcleos participantes de esta vía son el CE y la SNc (Yelnik., 2002).

El CE, es el principal receptor de aferencias en los ganglios basales y recibe proyecciones procedentes de áreas motoras corticales, el tálamo, la amígdala, la SNc y el tronco encefálico (Kandel, 2000). Las neuronas del CE son de naturaleza gabaérgica en su mayoría y debido a las proyecciones dopaminérgicas que el CE recibe de la SNc y el área tegmental ventral, estas neuronas expresan receptores dopaminérgicos tanto de tipo D1 como D2 (Blandini et al 2000; Kandel., 2000) (Ver anexo 1).

Las principales eferencias del cuerpo estriado son dirigidas al globo pálido y la SNr (ver anexo 1), a partir de donde la información es proyectada a núcleos tálamicos (Blandini et al., 2000; Kandel, 2000; Purves, 2001) (ver anexo 1) a lo largo de 2 vías (fig.1): Una vía directa que corresponde a una retroalimentación positiva en el circuito entre los ganglios basales y el tálamo, dado que libera neuronas motoras de la inhibición tónica, aumentando la actividad tálamocortical (Merello et al., 1999) y transformando la idea de movimiento en acción (Purves, 2001). La vía indirecta que corresponde a una retroalimentación negativa en el circuito de ganglios basales y tálamo, porque aumenta el nivel de inhibición tónica. (Kandel, 2000), reduciendo la actividad tálamocortical y limitando así el movimiento (Purves, 2001) (fig. 1).

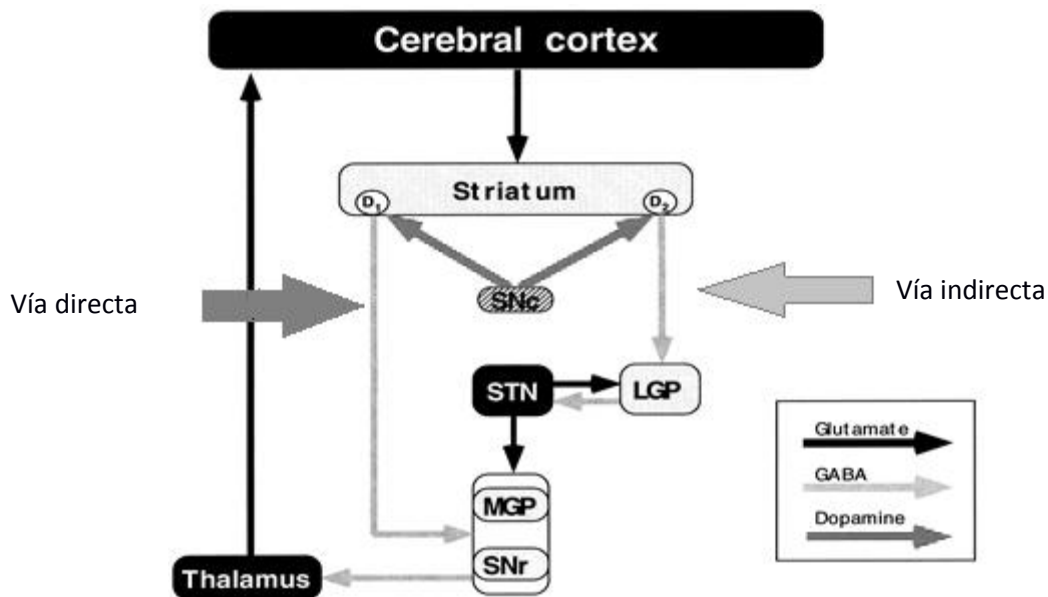


Fig. 1. Representación esquemática de la organización funcional en el circuito de los ganglios basales de acuerdo al modelo clásico de la vía directa e indirecta. Las proyecciones dopaminérgicas provenientes de la SNc ejercen efectos antagónicos a lo largo de las dos vías, facilitando la transmisión para la vía directa e inhibiendo la misma para la vía indirecta permitiendo así, la adecuada ejecución de movimientos (Blandini et al., 2000).

En la EP, el equilibrio entre las vías que regulan la adecuada ejecución de movimientos se rompe a consecuencia de la pérdida dopaminérgica nigroestriatal que afecta principalmente a la vía directa (Yelnik., 2002) (ver anexo 1). La muerte dopaminérgica implica un aumento en la eferencia inhibitoria, por tanto una disminución en la actividad tálamocortical, reduciendo así, el promedio de neuronas motoras superiores activas y en consecuencia alterando la ejecución de movimientos e involucrando cuadros clínicos como los observados en la EP. Por ejemplo, la acinesia es el resultado del aumento en la actividad del GPi y SNr, es decir una mayor inhibición de los núcleos talámicos y menor ejecución de movimiento (Purves, 2001; Yelnik, 2002; Merello, 1999).

7. Trastornos neuroquímicos de la EP

La dopamina (DA) es una catecolamina cuya importancia en el sistema nervioso central involucra funciones tales como las emociones, las adicciones y la conducta motora, entre otras (Bahena et al., 2000; Purves, 2001). La DA está presente en todas las regiones encefálicas, sin embargo, se ha relacionado a 4 vías principalmente (fig. 2): 1) Vía nigroestriatal, que involucra proyecciones de la sustancia nigra dirigidas al cuerpo estriado; 2) la Vía mesolímbica; que dirige proyecciones mesencefálicas a hipocampo, corteza del cíngulo y amígdala; 3) Vía mesocortical, en la que las proyecciones provenientes del mesencéfalo se dirigen a la corteza prefrontal e hipocampo y 4) Vía tubero-infundibular del hipotálamo (Bear et al., 2001). Algunos estudios sugieren que los síntomas motores más severos de la EP, son consecuencia de la degeneración dopaminérgica en la vía nigroestriatal y mesocortical principalmente (Vernier et al., 2004; Ferrer et al., 2012). Adicionalmente, los estudios reportan que las anormalidades cognitivas más frecuentes en la EP son asociadas a una disminución en los niveles de DA en la corteza prefrontal que presentan los cerebros de pacientes postmortem con la enfermedad (Sawamoto et al., 2008).

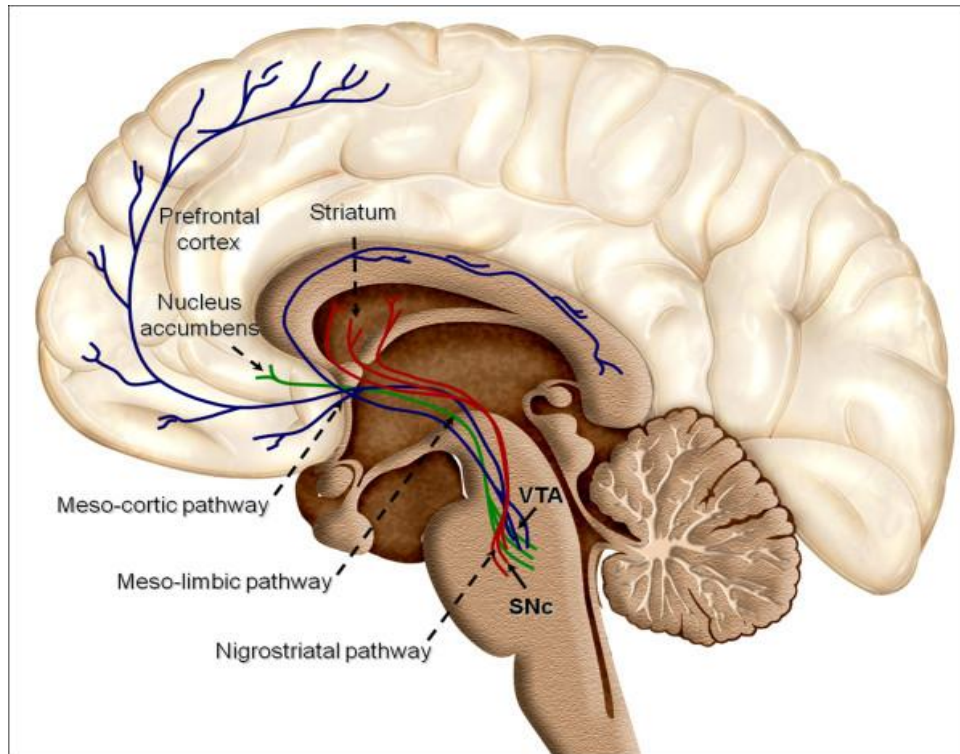


Fig. 2. Visión general de las vías dopaminérgicas en el cerebro. Las neuronas dopaminérgicas están localizadas en la SNc y el área tegmental ventral (VTA), ambas, estructuras mesencefálicas. Sus axones proyectan al cuerpo estriado (núcleo caudado, putamen), núcleo accumbens y hacia la corteza prefrontal dorsal y ventral. Las líneas azules representan la vía mesocortical, las verdes a la vía mesolímbica y las rojas a la vía nigroestriatal (Arias et al., 2010).

La DA se sintetiza a partir del aminoácido L-tirosina (fig. 3). El primer paso de la síntesis es catalizado por la enzima tirosina hidroxilasa en una reacción que requiere oxígeno como cosustrato para sintetizar dihidroxifenilalanina (L-Dopa). A través, del compuesto L-Dopa y a partir de la acción de la enzima Dopa descarboxilasa se produce la DA. Este proceso es llevado a cabo en el citosol, en donde la DA es guardada en vesículas para su posterior liberación en respuesta a determinados estímulos (Bear et al., 2001; Purves et al., 2001).

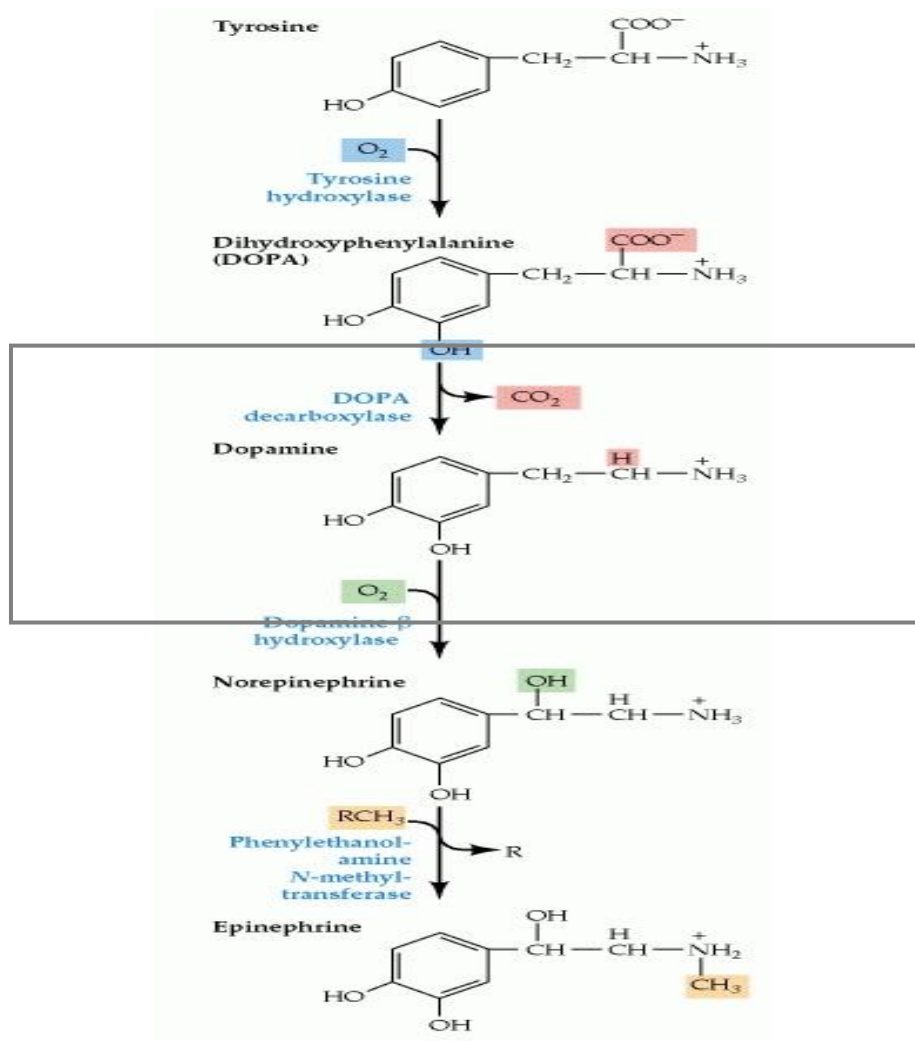


Fig. 3. Vía biosintética para los neurotransmisores catecolaminérgicos. La tirosina hidroxilasa es la enzima paso limitante en la síntesis de la DA y el resto de las catecolaminas sintetizadas a partir del aminoácido L-tirosina (Purves, 2001).

Una vez, que la DA es liberada al espacio extracelular, ejerce su acción a partir de 5 tipos de receptores dopaminérgicos conocidos, todos ellos acoplados a proteína G. Los receptores dopaminérgicos se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC (Bahena-Trujillo et al., 2000).

En cuanto a su degradación (fig. 4), la DA es recapturada del espacio sináptico y convertida por la enzima monoamina-oxidasa, presente en el interior de la terminal nerviosa, en ácido dihidroxifenilacético (Dopac), que se libera al exterior de la terminal para ser convertido en ácido homovanílico (HVA) por la

enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT). El principal metabolito de la DA es el HVA; por ello, cuando los niveles de DA disminuyen, los de HVA guardan la misma relación. En un estudio, se tomaron muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con la EP, el resultado demostró una disminución significativa de HVA en las muestras de estos pacientes comparada con controles (Weiner et al., 1973).

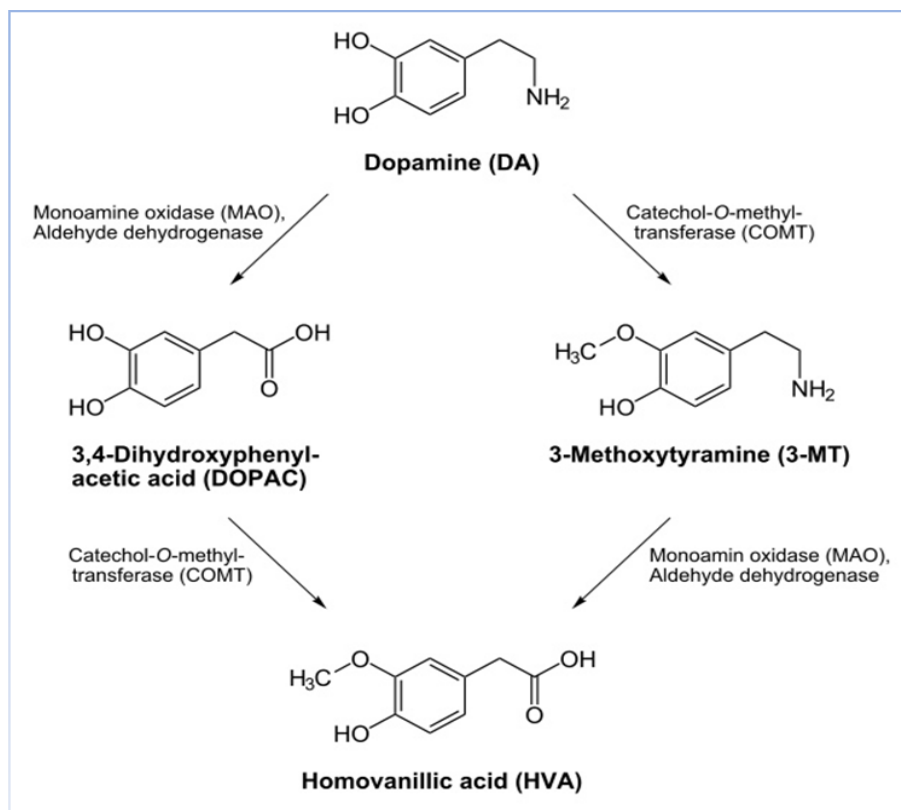


Fig 4. Degradación dopaminérgica. La DA después de ser recapturada en la terminal presináptica por el transportador de DA (DAT) es metabolizada enzimáticamente por la catecol-O-metiltransferasa (COMT) y la monoamino oxidasa (MAO) (Purves, 2001).

El mecanismo responsable por la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas en la EP, ha sido debatido por décadas. Algunas hipótesis sugieren alteraciones en la síntesis de dopamina aún antes de la pérdida de los cuerpos neuronales (Ara et al., 1998), así como vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas en la SNc a radicales libres producidos como resultado de la autooxidación dopaminérgica. Sin embargo, otras alteraciones bioquímicas observadas en la EP sugieren que este no es el único mecanismo responsable de la pérdida neuronal (Surmeier et al., 2011).

8. Características bioquímicas de la EP

Dentro de las características bioquímicas implicadas en la patología de la EP se describe la disfunción mitocondrial. La comprensión del rol que desempeña la mitocondria en la patogénesis de la EP surgió como una contribución accidental a mediados de los 80s, cuando numerosos jóvenes californianos presentaron la EP como un síndrome (Langston et al., 1983). El fenómeno fue el resultado de la autoadministración de una droga ilícita llamada MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6,-tetrahidro-piridina), análogo de la meperidina, un opioide (Langston et al., 1983), que bloquea el complejo I - o NADH deshidrogenasa (nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa u NADH ubiquinona oxidoreductasa) de la cadena respiratoria. Este es el primer complejo multienzimático en la cadena de transporte de electrones localizado en la membrana interna de la mitocondria y que forma parte fundamental del sistema de la fosforilación oxidativa, un proceso metabólico a partir del cual se sintetiza ATP (Alberts, 2002; Cranwell-Bruce., 2010).

La mitocondria juega un papel central en la regulación de la sobrevivencia celular, porque controla los niveles de ATP, (anexo 2), la producción de radicales libres (RL), entre ellos las especies reactivas de oxígeno (ERO), la detoxificación y los procesos apoptóticos (Srividhya et al., 2009). Los estudios en cerebros postmortem de pacientes con EP, muestran una reducción en la actividad del complejo I mitocondrial (Keeney et al., 2006) y en consecuencia

disminución en los niveles de ATP en la célula. Esta deficiencia de ATP involucra alteraciones en el potencial de membrana, aumento de calcio intracelular y un aumento de hasta siete veces más en la formación de radicales libres, tal como se observa en cerebros post mortem de pacientes con ésta enfermedad (Blandini et al., 2000; Martinez- Lazcano et al., 2010).

8.1. Radicales libres

Los RL se definen como moléculas inestables y altamente reactivas por la presencia de un electrón desapareado; estas moléculas tienden a estabilizarse oxidando elementos de la célula, particularmente lípidos de membrana y ácidos nucleicos. Los RL, entre ellos las ERO se producen a partir de procesos fisiológicos normales tales como la respiración e inflamación y son considerados intermediarios en la reducción del oxígeno. Para prevenir el impacto de estas moléculas, las células cuentan con agentes antioxidantes capaces de neutralizar los efectos oxidantes, liberando electrones y estabilizando los compuestos (Avello et al., 2008). La superóxido dismutasa (SOD), la glutatión-peroxidasa, la glutatión transferasa, el glutatión reducido (GSH), el ácido ascórbico (vitamina C) y proteínas transportadoras de metales como la cupreína y ferritina, representan las principales fuentes de defensa antioxidante enzimática y no enzimática (Avello et al., 2008). Sin embargo, uno de los primeros cambios bioquímicos observados en la EP es un decremento en los niveles de GSH y un aumento de ERO en la SNc (Blandini et al., 2000; Martin y Teismann, 2009).

El aumento de ERO observado en pacientes con la EP (Blandini et al., 2000), condujo al postulado de una hipótesis que propone al estrés oxidante como un mecanismo relevante en la patogénesis de la enfermedad (Gerlach et al., 1994). El aumento en la producción de RL (tabla 1) que rebasa los sistemas de defensa antioxidante causando daño a la célula, se define como estrés oxidante (Gerlach et al., 1994).

Tabla 1. Radicales libres (Sies H., 1993).

INTERMEDIARIO	FORMULA	TIEMPO DE VIDA MEDIA (SEGUNDOS)
Radical Hidroxilo	$\cdot\text{OH}$	9-10
Anión Peroxinitrito	ONOO	0.05 – 1
Radical Peroxilo	ROO	7
Oxido Nítrico	NO	1-10
Peróxido de Hidrógeno	H_2O_2	Descomposición enzimática
Radical Superóxido	$\cdot\text{O}_2^-$	Descomposición enzimática

9. Estrés oxidante

Comparado con el resto del cerebro, la SNc está expuesta a altos niveles de estrés oxidante (Gerlach et al., 1994). El catabolismo de la dopamina por la monoamino oxidasa B (MAO-B) que involucra la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y las altas concentraciones de hierro observadas en la SNc son factores que inducen la formación de ERO. El H_2O_2 es relativamente inerte y no tóxico para la célula, pero cuando éste interactúa con metales de transición como el hierro (II) o cobre (I) en la reacción de Fenton (fig. 5), se descompone en el radical hidroxilo altamente reactivo ($\cdot\text{OH}$) (Gerlach et al., 1994; Blandini et al., 2000).

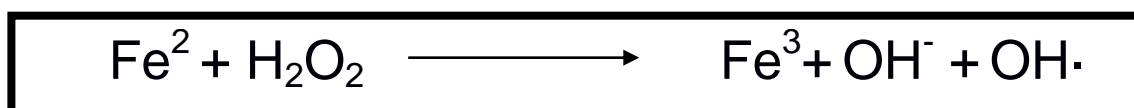


Fig. 5 Reacción de Fenton. El Fe interactúa con el H_2O_2 modificando el estado redox del metal entre su estado ferroso y férrico (Fe^{2+} y Fe^{3+}) con la resultante formación cíclica del radical $\cdot\text{OH}$ (Avello y Suwalsky, 2008).

Los estudios en cerebros post mortem de pacientes con EP demostraron un aumento en los niveles de lipoperoxidación en la SNc, así como, una disminución en las concentraciones de GSH y de los sistemas de defensa antioxidante en líquido cefalorraquídeo (Martinez-Lazcano et al., 2010). Datos que confirman el papel clave del estrés oxidante en la patogénesis de la EP.

10. Fármacos utilizados en tratamiento de la EP

El objetivo farmacológico de la mayoría de los tratamientos utilizados en la EP está dirigido únicamente a los síntomas (Cranwell-Bruce, 2012). Tanto los tratamientos, como los esfuerzos para atender los cambios bioquímicos en la EP son escasos y la respuesta de los pacientes a estas terapias son pobres (Chan et al., 2008).

En general, el objetivo de la terapia en estados tempranos de la EP, pretende restaurar la actividad dopaminérgica en los ganglios basales (Tarrants et al., 2012). Entre los fármacos dopaminérgicos se incluyen agonistas a los receptores D2, inhibidores de la dopa-descarboxilasa e inhibidores del metabolismo de la dopamina (Cranwell-Bruce, 2012). Adicionalmente, se emplean anticolinérgicos como una alternativa para el control sintomático de la EP (Cranwell-Bruce, 2012).

10.1. Fármacos dopaminérgicos

Dado que la pérdida dopaminérgica es la causa de las alteraciones motoras en la EP, la terapéutica farmacológica se orienta a restaurar esa anomalía en la neurotransmisión a través de la administración de levodopa, el precursor de la dopamina (Cranwell-Bruce, 2012; Tarrants et al., 2010). En SNC la levodopa difunde a las neuronas y se convierte en dopamina dentro de aquellas que tienen la enzima descarboxilasa correspondiente. Adicionalmente, la levodopa liberada activa los receptores dopaminérgicos, particularmente los D2, restaurando temporalmente la neurotransmisión dopaminérgica del cuerpo estriado (Cranwell-Bruce, 2012; Tarrants et al., 2010). Aunque el uso clínico de

la levodopa comenzó hace 40 años, hoy día sigue siendo el tratamiento de referencia de la terapia sintomática de la EP (Pérez, 2009), sin embargo, presenta varios efectos adversos por ejemplo; favorece el inicio de complicaciones motoras como las discinesias y en algunos casos se presentan síntomas psicóticos, incluyendo alucinaciones y delirio (Pérez, 2009; McGowan et al., 2004).

10.2. Fármacos anticolinérgicos

Entre los anticolinérgicos útiles en el tratamiento de la EP se encuentra el trihexifenidilo, que es un antagonista competitivo de la acetilcolina (Cranwell-Bruce, 2012). Su acción benéfica depende de su capacidad de bloquear el componente colinérgico del sistema nigroestriado al parecer sobre estimulando a consecuencia de la degeneración de las fibras dopaminérgicas inhibitoras (Cranwell-Bruce, 2012). En pacientes con EP tienen efectos favorables sobre el temblor, mejoran el estado de ánimo y reducen la secreción salival. Entre sus efectos adversos más graves se describe la confusión, alucinaciones y sedación con pérdida de la memoria anterógrada (Drachaman et al., 1977), como una extensión de su acción de bloquear los receptores muscarínicos (Cranwell-Bruce, 2012). El retiro abrupto de los fármacos anticolinérgicos puede causar un efecto rebote con un marcado deterioro del parkinsonismo (Horrocks et al., 1973; Goetz et al., 1981).

Los tratamientos utilizados en la actualidad para tratar a los pacientes con EP, están enfocados primordialmente a restablecer los niveles dopaminérgicos, Sin embargo, la efectividad de dichos tratamientos decrementa con los años e involucra efectos secundarios adversos (Chan et al., 2008). Por lo cual se ha puesto especial interés en la búsqueda de alternativas terapéuticas que puedan mejorar la calidad de vida de los pacientes y atender el proceso de neurodegeneración.

11. Modelos experimentales de la EP

11.1. MPTP Y 6-OHDA

Entre los modelos animales utilizados por su capacidad para reproducir las propiedades bioquímicas de la EP pero no sintomatológicos se encuentra el tratamiento con las neurotoxinas; 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) y 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Duty et al., 2011).

A partir de la síntesis accidental del MPTP, esta neurotoxina ha sido utilizada como modelo experimental en diferentes especies, incluidos roedores y primates (Duty et al., 2011). El MPTP, es una molécula lipofílica que cruza fácilmente la barrera hematoencefálica y una vez en el cerebro es convertida por la enzima MAO-B (presente mayormente en las células gliales y neuronas serotoninérgicas) en su metabolito activo 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP^+) (Chiba et al., 1984).

Hasta el día de hoy, la administración de la neurotoxina MPTP es considerada como el modelo que asemeja mayormente las características bioquímicas de la EP. Los estudios en el patrón de muerte neuronal en roedores, causado por la administración prolongada de la neurotoxina MPTP, demuestran semejanzas en la pérdida neuronal observada en pacientes con la EP (Sundstrom et al., 1990). Así como, la inclusión de cuerpos de Lewy característicos de la EP (Fornai et al., 2005). A estos datos se suma la caracterización de los síntomas conductuales observados en roedores después del tratamiento con MPTP, entre los que se describe una disminución en la actividad locomotriz (Duty et al., 2011).

11.2. MPP⁺ como modelo experimental para la EP

El MPP⁺ es una molécula polar que no atraviesa la barrera hematoencefálica. Cuando su precursor MPTP es convertido en el metabolito MPP⁺ por la enzima MAO-B, éste es liberado al espacio extracelular donde posteriormente se transporta al interior de las células dopaminérgicas vía el transportador de dopamina (DAT) por el cual presenta una alta afinidad (fig. 6). La acumulación del metabolito en el citoplasma desencadena la producción de ERO contribuyendo a la neurotoxicidad en general, sin embargo, la mayoría del MPP⁺ es eventualmente acumulado en el interior de la mitocondria, donde comienza el mecanismo tóxico vía la inhibición del complejo I mitocondrial (Duty et al., 2011). Esta acción lleva a la disminución en los niveles de ATP y un aumento en la producción de radicales libres (Duty et al., 2011).

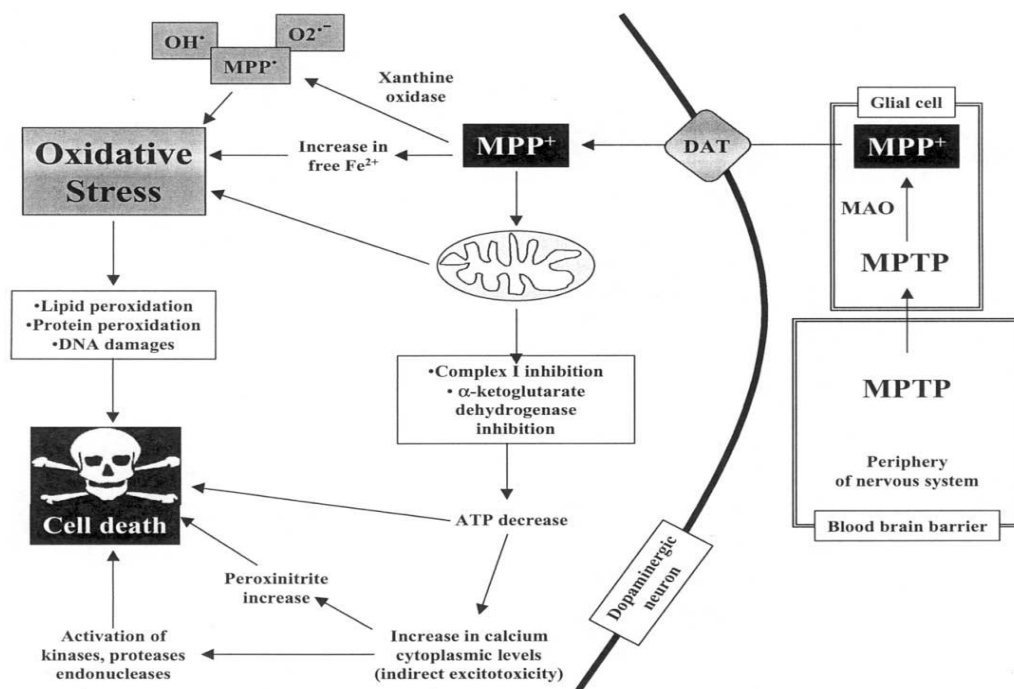


Fig. 6 Mecanismo hipotético de la toxicidad inducida por MPTP. Una vez que MPTP cruza la barrera hematoencefálica es transformado en su metabolito activo MPP⁺ por la MAO-B en las células gliales. La acción tóxica comienza cuando cruza la membrana celular produciendo estrés oxidante e inhibiendo el complejo I mitocondrial, ocasionando el aumento en los niveles de calcio celular y una deficiencia en la producción de ATP. El estrés oxidante generado directamente por MPP⁺ y la subsecuente inhibición mitocondrial conduce a la peroxidación y muerte celular (Blum et al., 2001)

Aunque la administración consecutiva de MPTP es considerada un modelo exitoso de la EP, para 2004 Goralski y Renton demostraron que la administración intraestriatal unilateral de MPP⁺ (10 µg) era capaz de ocasionar una pérdida dopaminérgica significativa (80-90%) en el estriado de la rata (fig. 7). Observaron que la pérdida neuronal comienza 24 horas posterior a la microinyección, alcanzando un pico máximo 7 días después de la administración (Goralski y Renton, 2004).

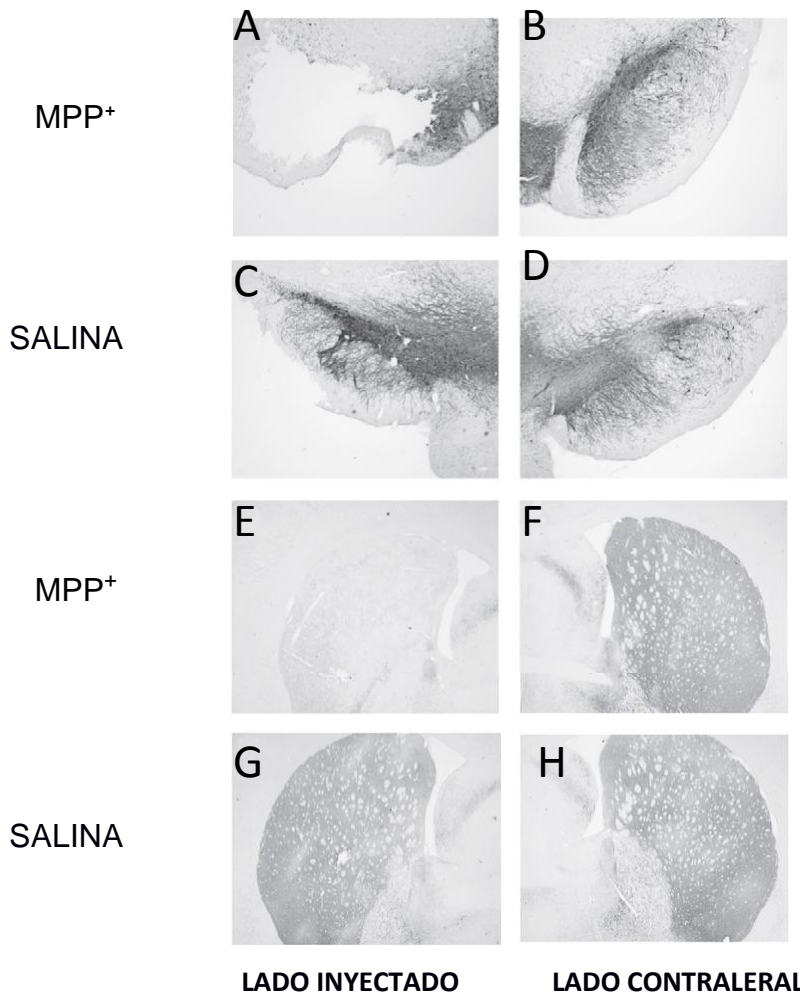


Fig. 7. Representación del efecto de la administración intraestriatal de MPP⁺ sobre la tirosina hidroxilasa en el sistema nigroestriatal. SN (A-D) y CE (E-H). La inmunodetección de tirosina hidroxilasa se evaluó 7 días después de la administración de MPP⁺ en el haz medial del cerebro anterior. El panel izquierdo (A,C,E,G) representa el sitio de inyección, mientras el panel derecho (B,D,F,H) el sitio contralateral (tomado de Goralski y Renton, 2004).

El modelo presentado por Goralski y Renton que involucra una lesión unilateral a partir de la microinyección con MPP⁺ permitió evaluar la pérdida dopaminérgica respecto al sitio contralateral aportando un control interno. Una de las aproximaciones para describir y cuantificar el efecto de la lesión unilateral sobre la conducta, es la llamada “conducta de giro”. Aunque, actualmente no existe un convenio respecto a la naturaleza de los giros producto de la lesión unilateral con MPP⁺, algunos estudios reportan la inducción de giros contralaterales a partir de agonistas dopaminérgicos como la apomorfina (APO) cuando la microinyección de MPP⁺ se realiza en la SN (Lang, 1990). Esta conducta ha sido asociada a la hipersensibilidad de los receptores dopaminérgicos (D2) como consecuencia de la disminución en los niveles de DA. Sin embargo, algunos otros estudios han reportado giros ipsilaterales cuando MPP⁺ es microinyectado en el CE y en la SN, sugiriendo que la administración de agonistas dopaminérgicos activa el estriado contralateral y denota la pérdida dopaminérgica en el sitio inyectado (Sindhu et al., 2006). Bajo estos parámetros, la conducta de giro es una técnica relativamente sencilla, ya que no involucra entrenamiento previo y puede ser analizada cualitativa y cuantitativamente (Schwartzing y Huston, 1996). Adicionalmente, la lesión unilateral de MPP⁺ permite evaluar no solo las alteraciones conductuales sino también los niveles de DA, las concentraciones de ERO presentes y la peroxidación de lípidos.

12. Epicatequina

Los flavonoides son compuestos fenólicos presentes en vegetales, semillas, frutas y bebidas. Estos compuestos de bajo peso molecular comparten un esqueleto que tiene dos anillos bencénicos o aromáticos unidos a través de una cadena de átomos de carbono (Martínez et al., 2002).

Una de las principales fuentes de flavonoides es el té verde (*Camelia sinesis*), su consumo data de hace cinco mil años en países como China e India (Mandel et al., 2008). En la actualidad su inclusión en la dieta involucra el descubrimiento de los efectos biológicos y farmacológicos con potencial benéfico para la salud del hombre (Mandel et al., 2004).

Las propiedades medicinales del extracto del té verde han sido asociadas a su alto contenido de flavonoides, conocidos como catequinas. Las principales catequinas encontradas en las hojas de té fresco son (fig. 8): (-)-epicatequina (EC), (-)-epigallocatequina (EGC), (-)-epicatequina galato (ECG), y (-)-epigallocatequina galato (EGCG) (Higdon. et al., 2003). Cada una de ellas, difiere de la otra en su conformación química (Mandel et al., 2004), pero todas demuestran tener potentes efectos antioxidantes, resultado directo de sus propiedades como atrapadores de radicales libres, inductores de enzimas antioxidantes, moduladores del estado redox de la célula, quelantes de metales de transición (Balentin et al., 2000) y reguladores de vías de señalización involucradas en la sobrevivencia, crecimiento y diferenciación de las células, entre ellas la vía de la proteína quinasa C (PKC) (Mandel et al., 2008).

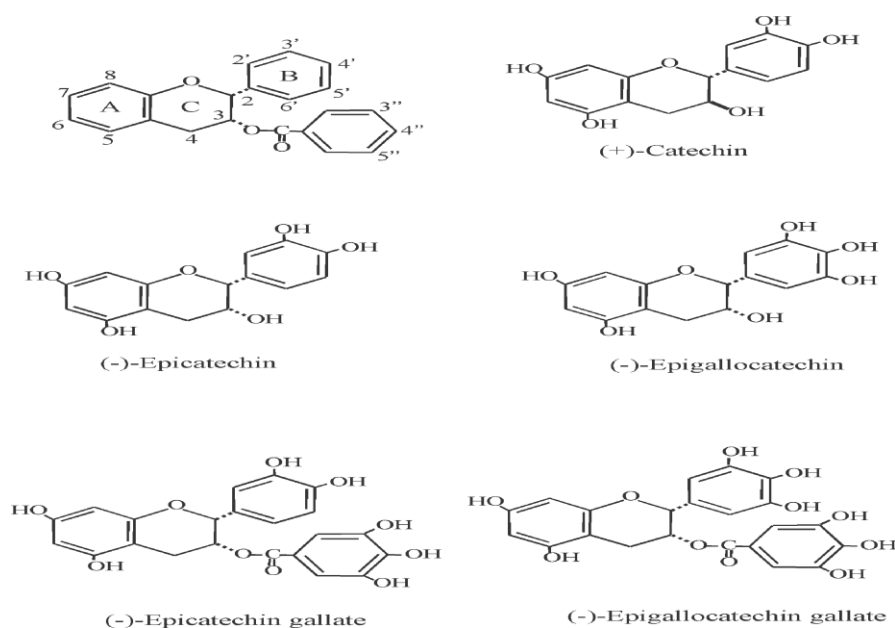


Fig. 8. Estructura y nomenclatura de las principales catequinas encontradas en el té verde. La EC tiene un grupo dihidroxilo en la posición orto del anillo B en los carbonos 3' y 4' y un grupo hidroxilo en el carbono 3' del anillo C. La EGC presenta un grupo trihidroxilo en los carbonos 3', 4' y 5' del anillo C. ECG difiere de EC en el grupo galato del carbono del carbono 3 en el anillo C, mientras, EGCG presenta tanto un grupo trihidroxilo en los carbonos 3', 4' y 5' del anillo C, como un grupo galato en el carbono 3' del anillo C (Higdon et al., 2003).

Numerosos estudios *in vivo* e *in vitro*, han demostrado que las catequinas del extracto del té verde poseen un rol neuroprotector contra las enfermedades neurodegenerativas y son capaces de mantener la viabilidad celular (Mandel et al., 2000). En un estudio *in vitro* en el que se utilizaron cultivos primarios de células mesencefálicas de rata que fueron expuestos a las neurotoxinas 1-metil4-fenilpiridina (MPP⁺) y 6 hidroxidopamina (6-OHDA), cada una de ellas demostró un potencial dañino que ocasiona 100% de muerte celular. Sin embargo, cuando los cultivos fueron expuestos a las neurotoxinas en presencia de catequinas (300 μM), la viabilidad celular se mantuvo cercana a los niveles de los controles, demostrando un efecto protector (Mercer et al., 2005) (fig. 9).

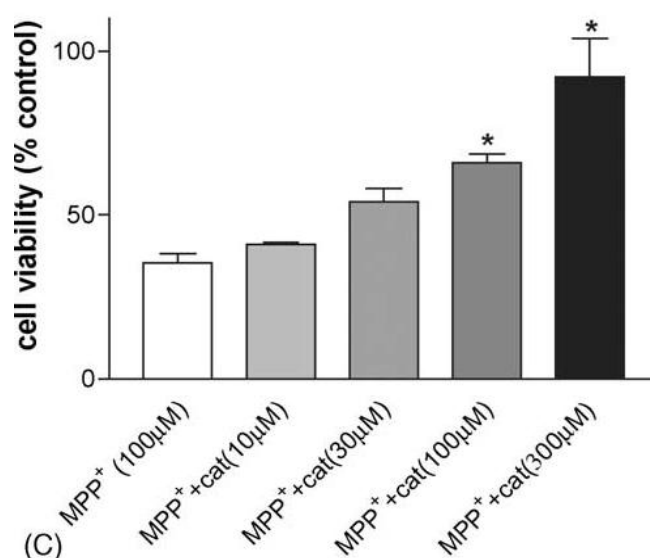


Fig. 9. Efecto dosis-dependiente de las catequinas en cultivos mesencefálicos tratados con MPP⁺. Las catequinas (10-300μM) proveen una protección dosis-dependiente en cultivos mesencefálicos tratados con MPP⁺ (100 μM/48h) *P<0.05 (Mercer et al., 2005).

Adicionalmente, se observó que las catequinas son capaces de prevenir la deficiencia dopaminérgica en modelos *in vivo*. En un estudio se utilizaron ratones machos tratados con diferentes dosis del extracto del té verde (0.5, 1 y 5 mg/kg i.p) como pretratamiento y la administración oral de MPTP durante 4 días consecutivos como modelo de la EP. En el caso de los controles (ratas que recibieron solución salina), la administración sistémica de MPTP ocasionó

una marcada reducción en los niveles dopaminérgicos estriatales después de 4 días Sin embargo, cuando la administración de MPTP fue precedida por el extracto del té verde, se observó un efecto protector ante la reducción dopaminérgica para las dosis de 0.5 y 1 mg/kg, comparado con los controles, aunque no se observó el mismo efecto para la dosis de 5 mg/kg. Estos datos fueron obtenidos a través de un ensayo de medición de Dopac, producto resultante de la acción de la enzima MAO, sobre la dopamina (Levist et al., 2001).

Por otro lado, se ha observado que la administración durante 30 días consecutivos del compuesto EGCG este es capaz de disminuir los niveles de peroxidación de lípidos en el cerebro de ratas envejecidas comparadas con ratas controles (Sirvidhya et al., 2009). Así mismo, la administración del extracto del té verde (150 mg y 450 mg/kg) durante 7 días previos a la microinyección intraestriatal de 6-OHDA es capaz de disminuir la peroxidación de lípidos (Guo et al., 2007).

Parte del efecto tóxico atribuido a la microinyección de las neurotoxinas 6-OHDA y MPP⁺ involucra un aumento en la formación de RL (Duty y Jenner, 2011), el potencial que las catequinas han mostrado para prevenir este aumento se atribuye a su capacidad para neutralizar dichos radicales (Higdon y Frei, 2003). Estudios *in vivo* demuestran a partir de resultados de espectrometría, que la administración de EGCG neutraliza principalmente al radical $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{O}_2^-$ (Levits et al., 2002; Guo et al., 2007).

Todos los antecedentes previamente descritos sugieren por lo tanto que las catequinas poseen un efecto neuroprotector en modelos animales de la EP tanto *in vivo* como *in vitro*. Por otra parte, estudios epidemiológicos han evaluado la asociación entre el efecto de los componentes químicos bioactivos del té verde como antioxidantes y la incidencia de enfermedades neurodegenerativas en diferentes poblaciones (Mandel et al., 2008).

12.1. Investigación epidemiológica en humanos

En 1998, Chang y colaboradores condujeron un estudio cuyo objetivo fue evaluar factores ambientales relacionados con la incidencia en la enfermedad de Parkinson. Bajo este supuesto, se reclutaron 215 pacientes con EP y un grupo de 313 controles en Hong Kong; ambos grupos fueron examinados por un geriatra y un neurólogo a fin de mantener los criterios de inclusión. Cada participante respondió a un cuestionario estándar enfocado en los posibles factores de riesgo. La entrevista abarcó datos como; edad, lugar de residencia y hábitos alimenticios en donde se incluyó el consumo de té. Los datos obtenidos en el cuestionario fueron sometidos a un análisis estadístico, utilizando una regresión lineal univariada. El análisis demostró una relación inversa entre el hábito de consumir té verde (una o más tazas al día) y la EP. Estos datos permitieron concluir que el consumo de té podía tener una relación con una menor probabilidad de presentar la EP, debido a sus efectos antioxidantes. Adicionalmente, un estudio llevado a cabo en 2002 por Checkoway y cols, describió una correlación inversa entre el consumo de 2 o más tazas de té al día y la EP, esta vez en una población caucásica en Estados Unidos. Ambos estudios describen un posible efecto neuroprotector ante el riesgo de padecer la EP en diferentes poblaciones.

Aunque, la investigación del efecto neuroprotector de las catequinas del té verde se ha basado primordialmente en la EGCG debido a que representan más del 10% del peso total del extracto del té verde y se ha demostrado que sus metabolitos se incorporan al cerebro de ratas y ratones así como, a varios órganos (Mandel et al., 2004), los estudios sugieren que el efecto neuroprotector que se observa en los modelos de MPP⁺ y 6-OHDA de la EP por parte de la EGCG se debe parcialmente a la internalización del DAT a través de la vía de la PKC que podría estar mediada por la presencia del grupo galato en la tercera posición del anillo C (Pan et al., 2003; Mandel et al., 2004; Li et al., 2006). Por su parte, algunos otros estudios sugieren que la EGCG actúa como atrapador de radicales libres y ejerce un efecto indirecto sobre la expresión de enzimas antioxidantes a través de la activación de factores de transcripción (Mandel et al., 2004).

Dado que los estudios respecto a la internalización del DAT mediada por la EGCG no son concluyentes y no hay un consenso respecto al mecanismo de acción como agente neuroprotector por parte de la EGCG, el presente estudio sugiere como alternativa el uso de la EC porque no presenta el grupo galato al que se le ha atribuido el proceso de internalización del DAT. Por su parte, los estudios han reportado que el mecanismo neuroprotector de la EC involucra la inducción de enzimas antioxidantes de fase II como la hemoxigenasa 1 (HO1) a través de la activación de factores de transcripción como Nrf2 (Shah et al., 2010).

Finalmente, el uso de la EC en la terapia farmacológica presenta diversas ventajas. Entre ellas se reporta que los metabolitos de la EC logran distribuirse homogéneamente por todos los tejidos corporales (Mandel et al., 2006; Escamilla et al., 2009).

El metabolismo de la EC y otros flavonoides del té verde se lleva a cabo en el intestino delgado e hígado principalmente. Algunos estudios han reportado que la inyección intraperitoneal (Ip) de 100 mg/kg de la EGCG incrementa significativamente las concentraciones en plasma de enzimas hepáticas como alanina aminotransferasa (ALT). Así mismo, se reporta que la Ip de 150 mg/kg es letal en ratones. Por su parte Awwiuro y cols han demostrado que la administración oral de diferentes dosis del extracto del té verde bajo un esquema crónico de administración no presenta efectos deletéreos al hígado, este hecho fue comprobado a través de las concentraciones en plasma de diferentes biomarcadores como la enzima fosfatasa alcalina (ALP), gamma glutamil transpeptidasa (γ -GT) y alanina aminotransferasa (ALT). Estas enzimas se encuentran en las células hepáticas, pero permean hacia la circulación sanguínea cuando existe daño hepático.

Dadas las propiedades previamente descritas, el presente trabajo pretende evaluar el uso de la epicatequina en contra de la neurotoxicidad inducida por MPP⁺ como modelo experimental de la EP en rata.

13. HIPÓTESIS.

La presencia de epicatequina en la SN de la rata es capaz de neutralizar radicales libres contrarrestando las alteraciones bioquímicas y conductuales inducidas por MPP⁺.

14. OBJETIVO GENERAL.

Determinar el efecto de la administración de epicatequina en el modelo de la EP inducido por MPP⁺ en el estriado de rata.

14.1. Objetivos Particulares.

- Determinar el efecto de la administración oral de epicatequina en una dosis aguda así como, una administración crónica a través de la conducta de giro inducida por apomorfina (APO) siete días después de la microinyección intraestriatal de MPP⁺.
- Determinar el efecto de la epicatequina tanto en el esquema de administración agudo como en el crónico sobre el contenido de DA y HVA en el CE tras la lesión intraestriatal con MPP⁺.
- Determinar el efecto de la administración aguda de 100 mg/kg de EC sobre la peroxidación de lípidos producida por la microinyección de MPP⁺ en el cuerpo estriado de la rata.
- Determinar el efecto de la administración de EC sobre marcadores de daño hepático.

15. MÉTODO.

Animales

En el presente trabajo se utilizaron ratas macho Wistar (250 a 280 g) con acceso libre a comida y agua, y ciclos de luz–obscuridad de 12 h, ajenos a la exposición de otros tratamientos. El manejo de los animales se llevó a cabo en base a la Norma Oficial Mexicana (NOM 062 ZOO1999) para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

Procedimiento quirúrgico

La microinyección unilateral de MPP⁺ de 10 µg disuelto en 8 µL de solución salina (Rubio-Osornio et al., 2009), se realizó en el estriado a través de coordenadas estereotáxicas específicas, tomando como referencia a Bregma: +0.5 mm anterior, -3.0 mm lateral y -4.5 mm ventral a la dura (Paxinos y Watson 1998).

Tratamiento farmacológico

La distribución de los animales y el tratamiento farmacológico correspondió a los siguientes cuatro grupos: sham (vehículo/s.s) control (EC), control de daño (MPP⁺) y experimental (EC/MPP⁺) en un esquema agudo con la administración oral de 100 mg/kg de EC 5 horas previas a la a la microinyección intraestriatal de MPP⁺ (10 µg/8µL), tiempo en el que se reporta un pico máximo de concentración de EC en plasma (Da Silva et al., 1998; Cuevas et al., 2009).

Esquema agudo de administración (100 mg/kg)	
Grupo:	n=8
Sham (vehículo/s.s)	✓
Control (EC)	✓
Control (MPP ⁺)	✓
Experimental (EC / MPP ⁺)	✓

Adicionalmente, se administraron cuatro grupos más; sham (vehículo, s.s), control (EC), control de daño (MPP⁺) y experimental (EC/MPP⁺) bajo un esquema crónico (Leaver et al., 2009; Srividhya et al., 2009), con una administración consecutiva de 40 mg/kg de EC (Da Silva et al., 1998) durante siete días previos a la microinyección intraestriatal de MPP⁺ (10 µg/8µL). En ambos casos el grupo control recibió solución salina.

Esquema crónico de administración (40 mg/kg/7 días)	
Grupo:	n=8
Sham (vehículo/s.s)	✓
Control (EC)	✓
Control (MPP ⁺)	✓
Experimental (EC/MPP ⁺)	✓

Conducta de Giro

La conducta de giro se registro en tres periodos de tiempo; 24 y 48 horas y siete días posteriores a la cirugía, las ratas fueron administradas con 1 mg/kg de hidroclicloruro de apomorfin disuelta en 1 ml de solución salina y ácido ascórbico (1:1 ^{w/w}) (Santamaría et al., 1997); la evaluación de la conducta de giro se llevó a cabo en cajas de acrílico de 40x60x10 cm. El periodo de tiempo para el conteo de giros por rata fue de 60 minutos.

Marcadores de daño hepático

La evaluación del daño hepático se llevó a cabo considerando los niveles de fosfatasa alcalina (ALP), gamma glutamil transpeptidasa (γ -GT) y alanina aminotransferasa (ALT) en plasma obtenido por punción cardiaca y utilizando un espectrofotómetro Pekin Elmer UV/VIS Lambda 20 de doble haz. Todos los resultados se reportaron en unidades de $\mu\text{mol/L/min}$. Cada una de las muestras se evaluó por duplicado en conjunto a las muestras blanco. Para la ALP, fue preparada la mezcla de reacción (0.25 ml buffer de GLy 0.1 M, MgCl_2 1mM, pH 10.5, 0.25 ml de sustrato de p-nitrofenilfosfato) y se incubó a 37°C durante 5 minutos, se inició la reacción añadiendo 50 μL de la muestra y se dejó incubar durante 30 minutos a 37°C. Se detuvo la reacción con 5ml de NaOH 0.02 N y se leyó la absorbancia a 410 nm. En el caso de la γ -GT, se inició la reacción (0.25 mL solución sustrato 0.25 ml suero problema) y se incubó durante 60 minutos a 37°C. Se continuó la reacción (0.25 mL reactivo cromógeno, 0.05 mL suero problema) y se incubó durante 15 minutos a 37°C. La reacción se detuvo con NaOH 0.4 N y se leyó la absorbancia a 515 nm. Para ALT, se preparó la mezcla de reacción (400 μL Tris-HCL 200mM, pH 8.2, 100 μL MgCl_2 200mM, 100 μL Glicil-Glicina 40 mM, pH 8.2, 200 μL Gamma-Glutamil-p-nitroanilida 10 mM). Previa incubación por 10 minutos a 37°C, se inició la reacción con 200 μL de suero. Se Incubo a 37°C por 30 minutos y se detuvo la reacción con 2 mL de ácido acético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) 1.5 M, se leyó la absorbancia a 410 nm.

Niveles de DA por HPLC

El contenido de DA se evaluó por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector electroquímico (Rubio-Osornio et al., 2009). Siete días posterior a la cirugía con MPP⁺ el cuerpo estriado fue disecado, pesado cuidadosamente y homogenizado por sonicación en una solución antioxidante de metabisulfito de sodio (1:15 w/v). El homogenizado se centrifugó a 4000 x g durante 15 min a una temperatura de 4°C y el sobrenadante fue analizado por HPLC (columna Alltech 100 x 4.5 mm), bomba Perkin-Elmer LC-250 y detector electroquímico Metrohm (mod. 641-VA) con un integrador Hewlett-Packard 3396-II. Las áreas bajo la curva obtenidas fueron procesadas por interpolación a la curva de calibración estándar construida a partir de estándares específicos de concentración (concentración Nm; 200, 400, 800, 1600 y 3200). Los resultados fueron expresados como µg de DA por mg de tejido húmedo.

Peroxidación de Lípidos (PL)

El ensayo de formación de productos lipofluorescentes fue monitoreado en el cuerpo estriado de la rata utilizando la técnica descrita por Santamaría y cols en el 2003. Las muestras de tejido estriado se homogenizaron en 3.0 ml de solución salina. Alícuotas de 1 ml por duplicado del homogenado fueron adicionadas con 4 ml de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v); enseguida, en tubos cubierto de la luz, la mezcla se agitó vigorosamente durante 10 segundos y se conservó en hielo durante 30 minutos para permitir la separación de las fases. La fase acuosa (sobrenadante) fue desechada y 2 ml de la fase clorofórmica fueron transferidos a una celda de cuarzo y adicionados 200 µL de metanol. La fluorescencia se midió en un espectrofotómetro de luminiscencia LS50B Perkin-Elmer a 370 nm de excitación y 430 nm de emisión. La sensibilidad del espectrofotómetro se ajustó a 140 unidades de fluorescencia con un estándar de quinina (100 µg/1mL) preparado en una solución de ácido sulfúrico 0.05 M previo a la medición de las muestras. Los resultados serán expresados como unidades de fluorescencia por µg de proteína.

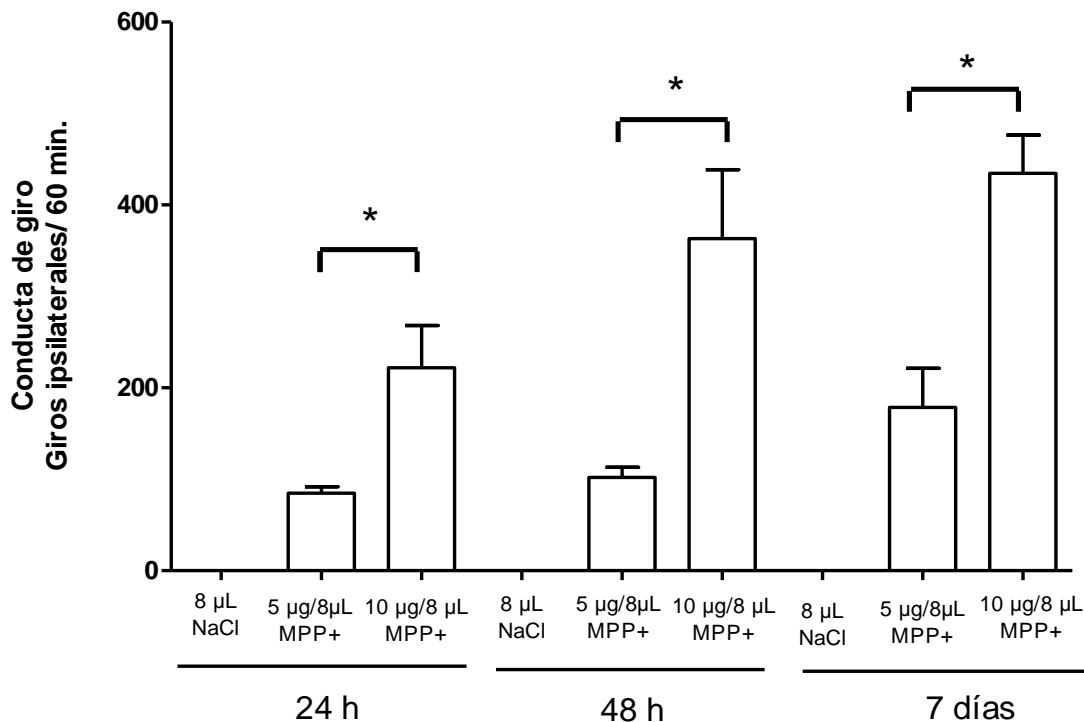
16. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en cada uno de los procedimientos experimentales realizados en este trabajo, fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA de una y dos vías, seguido de una prueba de comparación de medias de Tukey.

17. RESULTADOS.

17.1. Efecto de dosis crecientes de MPP⁺ sobre la conducta de giro

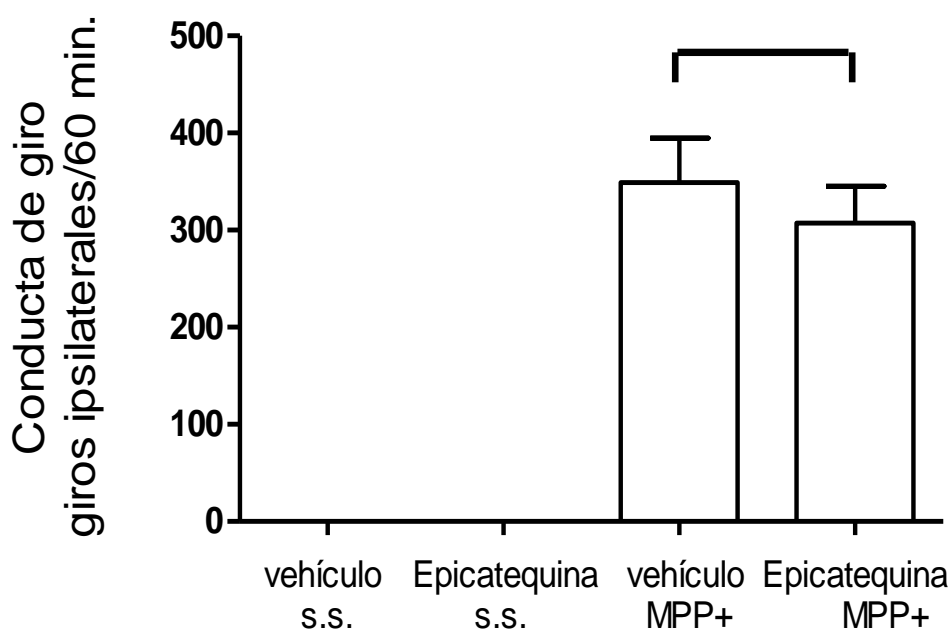
El análisis cuantitativo del efecto tóxico de la microinyección intraestriatal de MPP⁺ (5 y 10 µg/8µL) sobre la conducta de giro inducida por apomorfina (1 mg/kg) se evaluó 24, 48 horas y siete días posteriores a la cirugía (Goralski y Renton, 2004). El análisis estadístico mostró un efecto dosis-dependiente en el número de giros ipsilaterales en 24, 48 horas y siete días posteriores a la microinyección. Adicionalmente, se observó un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en el promedio de giros (434.6 ± 41.8 , correspondiente al 100%) cuando los animales fueron lesionados con una dosis de 10 µg/8µL comparado con el promedio de giros (178 ± 42 , correspondiente a 41%) de una dosis menor (5 µg/8µL) y el de los controles (Gráfica 1).



Gráfica 1: Efecto de la microinyección intraestriatal de MPP⁺ (5 y 10 µg/ 8µL) sobre la conducta de giro inducida por apomorfina (1 mL/kg subcutáneo) 24, 48 horas y 7 días posterior a la cirugía. Los resultados son expresados como la media \pm E.S. ($n = 5$). Las diferencias entre los grupos en la conducta de giro se consideran estadísticamente significativas a partir de una $*P < 0.05$. Anova de una vía seguida de prueba de Tukey.

17.2. Efecto de la administración crónica de EC (40 mg/kg/día) a través de la conducta de giro

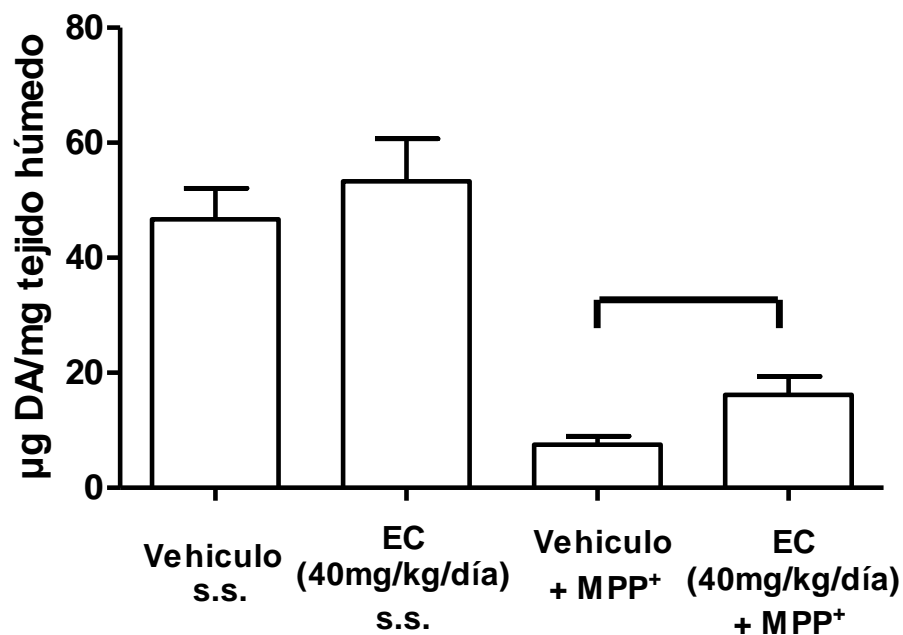
Para el esquema de administración crónico, los animales fueron pretratados con 40 mg/kg/día de EC durante 7 días previos a la microinyección intraestriatal de MPP⁺. Se evaluó la conducta de giro siete días posteriores a la cirugía. Los controles recibieron solución vehículo o EC en ausencia de MPP⁺. El análisis de datos demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas en el número de giros ipsilaterales (307.2 ± 37, correspondiente a 87.9%) entre los animales pretratados con EC (40 mg/kg/día) y los controles (348.8 ± 45.9, correspondiente a 100%) (Gráfica 2).



Gráfica 2. Efecto de la administración de EC (40 mg/kg/día) a través de la conducta de giro inducida por apomorfina (1 mL/kg subcutáneo). En los resultados se presenta la media ± el E.S. (n=8). El análisis de datos (Anova de dos vías seguida de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney) no mostró diferencias estadísticamente significativas.

17.3. Contenido estriatal de DA, esquema de administración crónico

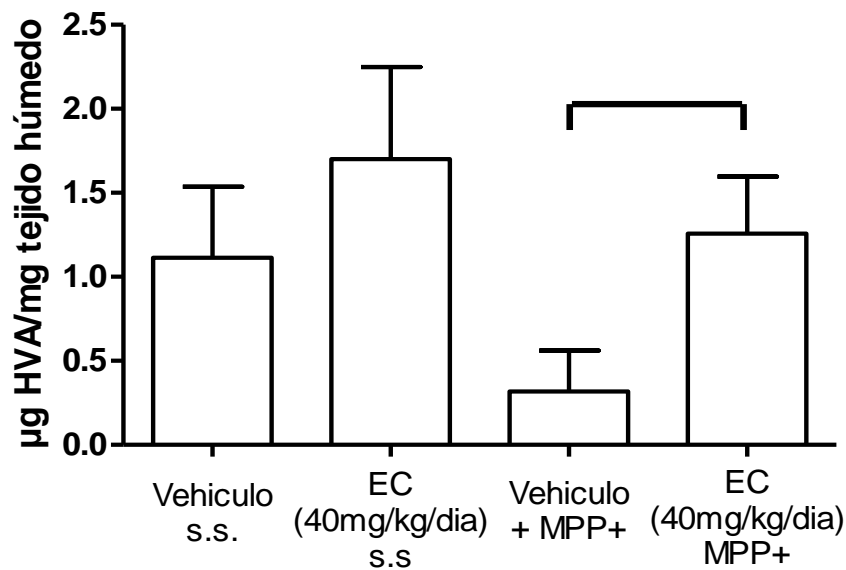
En el caso de la administración crónica, los niveles de DA estriatales ($46.67 \pm 5.4 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido húmedo, 100%) de los animales microinyectados con solución salina fueron considerados como grupo control. El pretratamiento con EC (40 mg/kg/día) no afectó significativamente los niveles de DA ($53.32 \pm 7.3 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido húmedo, 114.2%). La microinyección intraestriatal de MPP^+ disminuyó drásticamente los niveles estriatales de DA ($7.5 \pm 1.4 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido húmedo, 4.3%). El pretratamiento con 40 mg/kg/día de EC no demuestra diferencias estadísticamente significativas frente a la disminución en el contenido de DA estriatal ($16.15 \pm 3.18 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido húmedo, 34.6 %) cuando los animales son microinyectados con MPP^+ (Gráfica 3).



Gráfica 3. Efecto de la administración crónica de 40 mg/kg de EC sobre la disminución del contenido de DA estriatal inducido por MPP^+ . En los resultados se presenta la media \pm E.S (n= 8). Los datos fueron analizados con Anova de dos vías seguida de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney). No se observan diferencias estadísticamente significativas en el contenido de DA de los animales pretratados con EC con respecto a los no tratados.

17.4. Contenido estriatal de HVA, esquema de administración crónico

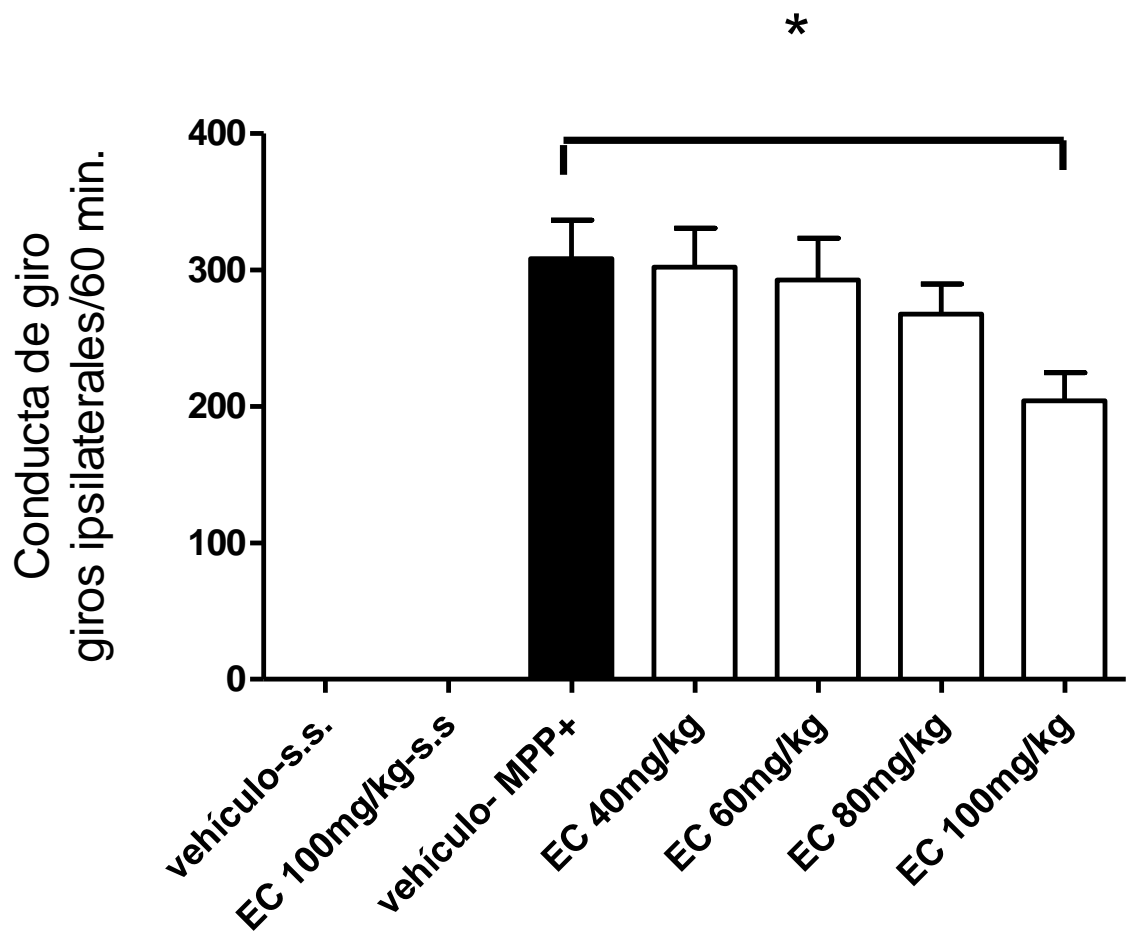
En el caso de la administración crónica los niveles de HVA estriatal (1.1 ± 0.82 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido húmedo, 100%) de los animales microinyectados con solución salina fueron considerados como el grupo control. El pretratamiento con EC (40 mg/kg/día) no afectó significativamente los niveles de HVA (1.7 ± 0.63 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido húmedo, 154%). La microinyección intraestriatal de MPP^+ disminuye los niveles estriatales de HVA (0.31 ± 0.24 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido húmedo, 28%). El pretratamiento con 40 mg/kg/día de EC no demuestra diferencias estadísticamente significativas frente a la disminución en el contenido de HVA estriatal (1.2 ± 0.34 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido húmedo, 109 %) cuando los animales son tratados con MPP^+ como se presenta en la gráfica 4.



Gráfica 4: Efecto de la administración crónica de 40 mg/kg de EC sobre la disminución del contenido de HVA estriatal inducido por MPP^+ . Los resultados son presentados como la media \pm el E.S. ($n=8$). No se presentan diferencias estadísticamente significativas en el contenido de HVA entre grupos. Anova de dos vías seguida de prueba de Tukey.

17.5. Efecto de dosis crecientes de EC a través de la conducta de giro inducida por MPP⁺

El efecto del pretratamiento con dosis crecientes de EC (40, 60, 80,100 mg/kg) 5 horas previas a la cirugía, fue evaluado mediante la conducta de giro como consecuencia de la lesión producida por la microinyección intraestriatal de MPP⁺ (10 µg/8µL). El análisis de la conducta se llevó a cabo 7 días posteriores a la cirugía. El efecto de la administración aguda de 100 mg/kg de EC sobre la conducta de giro, se evaluó en presencia y ausencia de MPP⁺ con el fin de determinar la injerencia del pretratamiento sobre este parámetro. No se observó la conducta de giro bajo esta condición, lo que sugiere que el tratamiento no guarda relación con la conducta. El promedio de giros ipsilaterales (308.30 ± 28.15, correspondiente a 100%) de los animales administrados con el vehículo y microinyectados con MPP⁺ fueron considerados los grupos controles de daño. El pretratamiento con EC a diferentes dosis demostró un efecto dosis-dependiente, con una disminución significativa ($p < 0.05$) en el promedio de giros ipsilaterales (204.07 ± 20.70, correspondiente a 66.2%) para el pretratamiento de EC con 100 mg/kg 5 horas previas a la cirugía comparado con los controles y las dosis menores (40, 60,80 mg/kg) (Gráfica 5).



Gráfica 5. Efecto de la administración de dosis crecientes de EC (40, 60, 80,100 mg/kg) sobre la conducta de giro inducida por la microinyección intraestriatal de MPP⁺ (10 µg/ 8µL). Los animales microinyectados con MPP⁺ (10 µg/8µL) y sin tratamiento fueron considerados controles. Se observan diferencias significativas $P < 0.05$, para el pretratamiento con EC 100 mg/kg. En los resultados se presenta la media \pm E.S. (n = 10). Anova de dos vías seguida de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney.

17.6. Marcadores de daño hepático

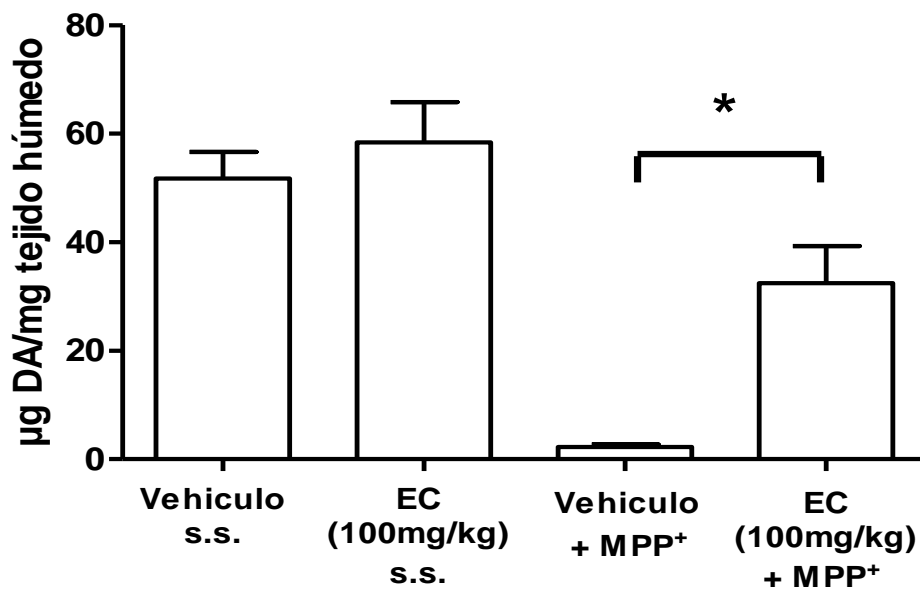
Se evaluó el efecto de la administración aguda de 100 mg/kg de EC en el hígado. El análisis se realizó 24 horas posteriores a la microinyección intraestriatal de MPP⁺ a partir de los niveles en plasma de las enzimas; ALP, γ -GT y ALT. Los niveles enzimáticos de los animales administrados con solución vehículo y microinyectados con solución salina (s.s) fueron considerados como controles en el caso de las tres enzimas. Los resultados demostraron que no existen diferencias significativas entre aquellos grupos tratados con EC en presencia o ausencia de MPP⁺ comparado con los controles (Tabla 1).

Parámetro	Vehículo + s.s	EC 100mg/kg + s.s	Vehículo + MPP ⁺	EC 100mg/kg + MPP ⁺
ALP $\mu\text{mol/L/min}$	56.20 \pm 4.2	66.51 \pm 6.21	61.26 \pm 9.32	52.53 \pm 2.91
γ -GT $\mu\text{mol/L/min}$	15.54 \pm 2.45	14.52 \pm 1.22	13.79 \pm 1.09	12.53 \pm 1.20
ALT $\mu\text{mol/L/min}$	20.09 \pm 1.4	21.27 \pm 1.5	17.49 \pm 1.1	18.92 \pm 2.9

Tabla 1. Concentración en plasma de ALP, γ -GT y ALT. Análisis realizado 24 horas después a la administración de 100 mg/kg de EC y 10 $\mu\text{g}/8\mu\text{L}$ MPP⁺. Las diferencias entre grupos no resultan estadísticamente significativas.

17.7. Contenido estriatal de DA, esquema de administración agudo

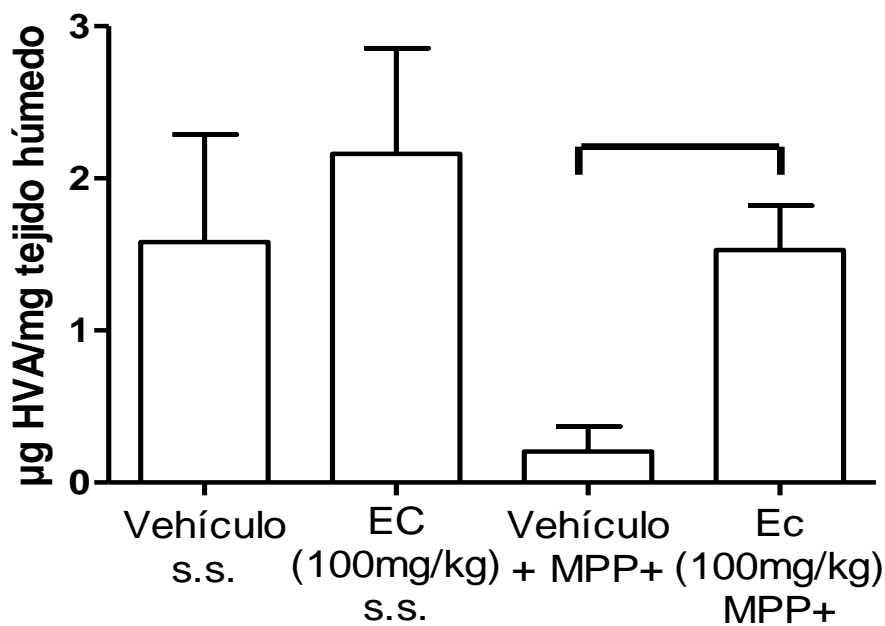
Los niveles de DA estriatales ($51.72 \pm 4.9 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido húmedo, 100%) de los animales microinyectados con solución salina fueron considerados como el grupo control. El pretratamiento con EC (100 mg/kg) no afectó significativamente los niveles de DA ($58.40 \pm 7.4 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido húmedo, 112%). Por otra parte, la microinyección intraestriatal de MPP⁺ disminuyó significativamente ($p < 0.05$) los niveles estriatales de DA ($2.26 \pm 0.43 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido húmedo, 4.3%). Sin embargo, el pretratamiento con 100 mg/kg de EC es capaz de prevenir significativamente ($p < 0.05$) la pérdida en los niveles de DA ($32.41 \pm 6.84 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido húmedo, 62.66%) (Gráfica 6).



Gráfica 6. Efecto de la administración de 100 mg/kg a través de la disminución de DA estriatal inducida por MPP⁺. Los resultados son expresados como la media \pm E.S. de 8 animales por grupo. La diferencia en el contenido de DA entre grupos se considera estadísticamente significativa $P < 0.05$. Los datos fueron analizados con Anova de dos vías seguida de prueba de Tukey.

17.8. Contenido estriatal de HVA, esquema de administración agudo

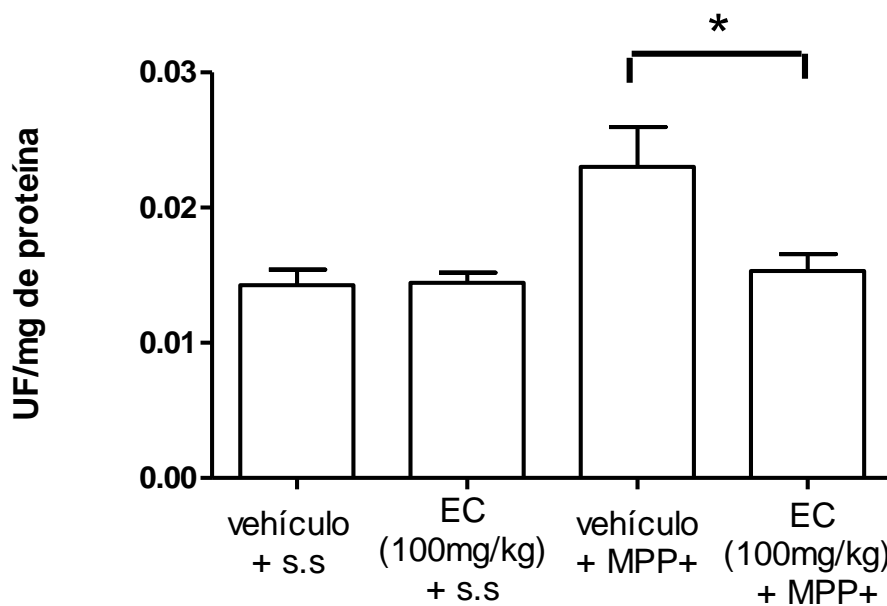
Los niveles de HVA estriatal ($1.58 \pm 0.70 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido húmedo, 100%) de los animales microinyectados con solución salina fueron considerados como el grupo control. El pretratamiento con EC (100 mg/kg) no afectó significativamente los niveles de HVA ($2.1 \pm .69 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido húmedo, 132%). Adicionalmente, la microinyección intraestriatal de MPP⁺ disminuye los niveles estriatales de HVA ($0.20 \pm 0.16 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido húmedo, 10%). El pretratamiento con 100 mg/kg de EC no demuestra diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles en los niveles de HVA ($1.5 \pm 0.29 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido húmedo, 96.2%) (Gráfica 7).



Gráfica 7: Efecto de la administración aguda de 100 mg/kg de EC en contra de la disminución de HVA estriatal inducido por MPP⁺. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre grupos, el pretratamiento con EC (100 mg/kg) no demuestra mantener los niveles de HVA. En los resultados se presenta la media \pm E.S. (n= 8). Anova de dos vías seguida de prueba de Tukey.

17.9. Peroxidación de lípidos

La evaluación del efecto de 100 mg/kg de EC sobre la peroxidación de lípidos fue analizada 24 horas posteriores a la microinyección intraestriatal de MPP⁺ a partir de la formación de productos lipofluorescentes en el estriado de la rata. La línea base de productos lipofluorescentes se estableció a partir del grupo administrado con solución vehículo y microinyectado con S.S (0.014 ± 0.001). La microinyección intraestriatal de MPP⁺ induce la formación de productos lipofluorescentes (0.026 ± 0.003). El pretratamiento con EC demostró disminuir significativamente (p<0.05) los niveles de productos lipofluorescentes, hasta el rango de los controles (0.015 ± 0.001). Este puede considerarse de manera indirecta como un parámetro del efecto de la EC como atrapador de radicales libres (Gráfica 8).



Gráfica

8. Efecto de la administración de 100 mg/kg de EC en la formación de productos lipofluorescentes inducidos por MPP⁺ en el estriado de rata. Los resultados expresan la media ± el E.S. (n=8). Existen diferencias estadísticamente significativas P<0.05 entre los grupos. Anova de dos vías seguida de prueba de Tukey.

18. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la administración oral de epicatequina (EC) como alternativa terapéutica a través de las alteraciones conductuales y bioquímicas inducidas por la microinyección intraestriatal unilateral estereotóxica de MPP⁺ como modelo experimental de la EP en la rata. La EC es un flavonoide de bajo peso molecular derivado del té verde cuya estructura química le confiere presumiblemente efectos antioxidantes a partir de su capacidad para donar electrones e inducir la expresión de enzimas antioxidantes (Mandel et al., 2008). Durante los últimos años diversos estudios han demostrado efectos protectores a partir del uso de flavonoides del té verde en modelos experimentales de la EP tanto *in vivo* como *in vitro* (Levits et al., 2001; Mercer et al., 2005; Guo et al., 2007). Actualmente, la terapia farmacológica utilizada en pacientes con EP tiene como principal objetivo reducir las alteraciones conductuales mediante el restablecimiento de los niveles de DA. Sin embargo, dicha terapia no presenta efectos directos en contra del proceso de estrés oxidante, mismo que ha sido sugerido como el principal actor en el fenómeno neurodegenerativo (Tarrants et al., 2012). La microinyección unilateral de MPP⁺ produce la muerte neuronal dopaminérgica selectiva, involucrando una gama cuantificable de alteraciones conductuales que puede ser utilizadas para determinar el impacto de la lesión, como es el caso de la conducta de giro (Sindhu et al., 2006) que nos permite evaluar la efectividad de algunos tratamientos en este caso en particular de la EC. En el presente estudio se evaluó la conducta de giro (giros ipsilaterales) como parámetro para determinar el daño a las neuronas dopaminérgicas causado por diferentes concentraciones de MPP⁺. El modelo animal utilizado en este trabajo ha sido elegido por producir hemi-parkinsonismo. La infusión intranigral e intraestriatal de MPP⁺ produce sensibilidad a la apomorfina que estimula los receptores de tipo D2 dando lugar a la conducta de giro ipsilateral (Sindhu et al., 2006). Esta conducta ha sido observada en neuronas estriatales dañadas a partir de la administración de 100-200 nmoles de MPP⁺ (Banerjee et al., 2006). La lesión estriatal mediante la inyección de 10 µg/8µL de MPP⁺ (Rubio-Osornio et al., 2009) utilizada en este estudio es equivalente a 33.6

nmoles que no ha sido reportado produzca efectos deletéreos a neuronas de tipo gabaérgicas. La concentración de MPP⁺ utilizada en este estudio es consistente con estudios previos que reportan la producción de giros ipsilaterales (Sindhu et al., 2006). Asimismo, se evaluó una concentración de 5 µg/8µL equivalente a 16.82 nmoles obteniendo como resultado la manifestación de giros ipsilaterales.

En consecuencia, al evaluar el efecto de ambas dosis de MPP⁺ sobre la conducta de giro, se observó un aumento significativo en el promedio de giros ipsilaterales entre los grupos microinyectados con MPP⁺ y el grupo control, sugiriendo una pérdida dopaminérgica significativa en 24, 48 horas y hasta los siete días posteriores a la microinyección estereotáxica. Este estudio registró el mayor número de giros ipsilaterales producidos a los siete días, a partir de la cirugía en las ratas lesionadas con 10 µg/8µL de MPP⁺. Dicho dato es consistente con algunos otros estudios que sugieren un pico máximo (80-90%) de pérdida dopaminérgica en el estriado lesionado hacia el séptimo día posterior a la cirugía (Goralski y Renton, 2004).

Es conveniente agregar que no existe un consenso respecto al mecanismo involucrado en la ejecución de giros ipsilaterales, nosotros consideramos que el mecanismo de daño inducido por MPP⁺ no genera hipersensibilidad. Dado que el estriado ipsilateral se encuentra dañado, es hiposensible y el hemisferio contralateral no dañado es normosensible, entonces, el estímulo por apomorfina ejerce su efecto sobre receptores D2 en la región contralateral y no en la región dañada, efecto que da lugar a los giros ipsilaterales. Además, se ha propuesto que la inducción de giros ipsilaterales es una exhibición de la pérdida dopaminérgica y el daño a las neuronas gabaérgicas a lo largo de la vía nigro-estriatal, tal como se observa en el modelo de la enfermedad de Huntington (Lang, 1990).

Aunque el mecanismo neurotóxico del MPP⁺ se asocia a la capacidad de esta molécula polar de inhibir el complejo I de la cadena de transporte de electrones (Duty et al., 2011), y disminuir la actividad estriatal de la ferroxidasa, aumentando la producción de radicales libres en las neuronas dopaminérgicas (Blum et al., 2001), la disminución estriatal en los niveles de DA se asocia presumiblemente al proceso de nitración de la TH por una especie química altamente reactiva, el peroxinitrito ONOO⁻ (evento temprano en el proceso neurotóxico del MPP⁺). La nitración de residuos de tirosina, es suficiente para inactivar la proteína y comenzar a disminuir los niveles de DA, involucrando así, alteraciones neuroquímicas incluso antes de la pérdida de los cuerpos neuronales (Ara et al., 1998; Rubio-Osornio et al., 2009).

En base a los resultados conductuales observados previamente, el presente trabajo evaluó a continuación el efecto de la administración oral de 40 mg/kg/día de EC y 100 mg/kg en la conducta de giro (Cuevas et al., 2009; Da Silva et al., 1998; Leaver et al., 2009). No se observó una disminución significativa en el número de giros ipsilaterales para los animales pretratados con 40 mg/kg/día de EC, lo que sugiere que bajo esta dosis y esquema la EC podría no acumularse en el organismo, dejando sin protección a la población de neuronas dopaminérgicas frente al daño inducido por MPP⁺. Sin embargo, se observó que los animales administrados con 100 mg/kg de EC, 5 horas previas a la cirugía disminuyeron significativamente el número de giros ipsilaterales en el día siete posterior a la cirugía. Este efecto resulta consistente con reportes previos que sugieren que la administración del extracto del té verde, es capaz de mantener la viabilidad celular frente a diversas neurotoxinas (Mercer et al., 2005; Mandel et al., 2008).

A fin de corroborar el efecto protector de la EC bajo ambos esquemas de administración (agudo y crónico), se evaluó el contenido dopaminérgico estriatal y los niveles de HVA (principal metabolito de la DA). La dosis aguda de EC (100 mg/kg), demostró preservar significativamente los niveles estriatales de DA y HVA frente a la pérdida inducida por MPP⁺. Estos resultados guardan relación con la mejora observada en la conducta de giro para dicha dosis. La

administración de una dosis crónica de EC (40 mg/kg/día), no demostró preservar significativamente los niveles de DA y HVA, tal como se observa en la conducta de giro previamente evaluada bajo este parámetro. Aunque el efecto neuroprotector de la EGCG frente a las neurotoxinas MPP⁺ y 6-OHDA observado tanto *in vitro* como *in vivo*, ha sido atribuido a la internalización del DAT a través de la vía de la PKC (Pan et al., 2003; Li et al., 2006). No se tienen datos concluyentes que sugieran el mismo efecto por parte de la EC, de hecho, se reporta que el tratamiento con EC (30 mg/kg) aumenta la expresión de la hemoxygenasa-1 (HO-1) en neuronas corticales de ratones. Adicionalmente se ha observado que el tratamiento con EC previene el aumento en la expresión de la caspasa 3 y 7 provocado por la actividad de agentes estresores como el H₂O₂ (Shah et al 2010).

Por otra parte, se reporta que el pretratamiento con el extracto del té verde es capaz de prevenir el aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en el cerebro y disminuir la peroxidación de lípidos (Hong et al., 2000; Guo et al., 2005). Las ERO están envueltas en diferentes funciones biológicas como la transducción de señales o la regulación del crecimiento celular. La sobreproducción que involucra el mecanismo tóxico del MPP⁺ convierte a estas especies en altamente dañinas debido a su capacidad para oxidar biomoléculas como lípidos de membrana (Gomes et al., 2005). En estos términos, el efecto del pretratamiento de 100 mg/kg de EC logra disminuir significativamente los productos lipídicos fluorescentes en el estriado de rata, sugiriendo la capacidad de atrapar radicales libres. Algunos estudios reportan que la tasa de eliminación de radicales hidroxilo de la EC está tan sólo por debajo de la ECG y al menos 10 veces más fuerte que el de la EGCG y EGC. Este hecho, apoya la idea de que el grupo hidroxilo del anillo C presente en EC y ECG, desempeña un papel importante en el secuestro de dichos radicales libres (Guo et al., 2005).

Finalmente, se sabe que la transformación de los flavonoides tiene lugar en dos localizaciones en primer lugar el hígado, por medio de reacciones de biotransformación de fase I en las que se introducen o se exponen grupos polares. En segundo lugar en el intestino delgado (Martínez-Flórez et al., 2002). En este sentido, el presente trabajo determinó el efecto de la administración de

100 mg/kg de EC en el hígado a partir de las concentraciones en plasma de las enzimas; fosfatasa alcalina (ALP), gamma glutamil transpeptidasa (γ -GT) y alanina aminotransferasa (ALT) para evaluar un posible daño hepático por la administración oral de la epicatequina. El tratamiento con EC no demostró aumentar los niveles plasmáticos de ALP, γ -GT o ALT comparado con los controles. De hecho, se ha demostrado que el consumo de té verde se asocia a una reducción del riesgo de padecer enfermedades del hígado, debido a su capacidad para atrapar radicales libres (Jin et al., 2008).

19. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se observó que el pretratamiento en un esquema de administración crónico de 40mg/kg/día de EC no logra disminuir la conducta de giro por hora, asociada a la disminución en el contenido de DA.

El pretratamiento con 40mg/kg/día de EC, no logra preservar los niveles de DA y HVA en el estriado de la rata, al ser evaluados 7 días posterior a la microinyección estriatal.

El pretratamiento en un esquema agudo de administración de 100 mg/kg de EC, es capaz de disminuir la conducta de giro por hora, asociada a la disminución en el contenido dopaminérgico como consecuencia de la microinyección de MPP⁺.

El pretratamiento con 100 mg/kg de EC es capaz de preservar los niveles de DA y HVA en el estriado de la rata, al ser evaluado 7 días posterior a la infusión intraestriatal de MPP⁺.

La administración de 100 mg/kg de EC previene el aumento de productos lipídicos fluorescentes producidos por la infusión intraestriatal de MPP⁺.

El pretratamiento agudo con 100 mg/kg de EC no afecta la función hepática en la rata.

20. REFERENCIAS

- Abbruzzese G. (2008). Optimising levodopa therapy. *Nuerological Sciences*. 5: S 377-9.
- Ara J., Przedborski S., Przedborski S., Naini A., Jackson-Lewis V., Trifilettis J., Horwitz J., Ischiropoulos H. (1998). Inactivation of Tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to perosynitrite and 1-methyl-4-1-1,2,3,6- tetrahydropyridine (MPTP). *Medical Sciences*. 95, 7659-7663
- Arias-Carrión O., Stamelou M., Murillo-Rodriguez E., Mendez-Gonzales., (2010). Dopaminergic Reward System: a short integrative review. *Int Arch Medicine*. 3, 24-37
- Avello M., Suwalsky M., (2008). Radicales Libres, Estrés Oxidativo y Defensa Antioxidante Celular. Departamento de Farmacia, Universidad Concepción.1-6.
- Awwiuro G., Lyiola S., Aghoghowwia B. (2010). Histological and biochemical markers of the liver of wistar rats on subchoric oral administration of green tea. *North American Journal of Medical Sciences*. 2 (8); 376-380.
- Bahena-Trujillo R., Flores G. y Arias-Montaño J. (2000) Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Revista de Biomedicina*. 11,39-60
- Balentine D., Robinson P., (2000). Tea as a source of dietary antioxidants with a potential role in prevention of cronic disease. *Herbs, Botanical and Teas*. 265-287.
- Bharath S., Hsu M., Kaur D., Rajagopalan S., Andersen J. (2002). Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochemical Pharmacology*. 64, 1037-1048.
- Blandini F., Nappi G., Tassorelli C., Martigoni E. (1999).Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Progress in Nuerobiology*. 62, 63-88.
- Blum D., Torch S., Lambeng N., Nissou M., Benabid A., Sadoula R., Verna J., (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Porgress in Neurobiology*. 65, 135–172.

- Bruce A. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science: (4ta Ed). 852-858.
- Calabresi P., Mercuri N., Sancesario G., Bernardi G. (1993). Electrophysiology of Dopamine-Denervated Striatal Neurons. Implications for Parkinson's Disease. *Brain: a Journal of Neurology*. 116 (pt 2) 433-52.
- Chang D., Woo J., Ho SC., Pang CP., Law LK., Ng PW., Hung WT., Kwok T., Hui E., Orr K., Leung MF., Kay R., (1998). Genetic and Environmental risk factors for Parkinson's Disease in a Chinese Population . *Journal of Neurosurgery Psychiatry*. 65, 781-784.
- Checkoway H., Powers K., Smith-Wellet T., Franklin G., Longstreth J., Swanson P. (2001). Parkinson's disease risk associated with cigarette smoking, alcohol consumption and caffeine intake. *American Journal of Epidemiology*. 155, (8). 732-738.
- Choi Kug D., Koppula S., Suk K., (2011). Inhibitors of microglial neurotoxicity: focus on natural products. *Molecules* 16, 1021-1043.
- Christoffersen C. y Meltzer L.(1995). Evidence for N-Methyl-D-Aspartate and AMPA subtypes of the glutamate receptors on substantia nigra dopamine neurons: Possible preferential role for N-Methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience*. 67(2); 373-81.
- Cranwell-Bruce L. (2010). Drugs for Parkinson's disease. *Nursing Pharmacology*, 19(6), 347-355.
- Cossotte M., Lévesque M., Parent A. (1999). Extrastriatal dopaminergic innervation of human basal ganglia. *Neuroscience Research*. 34(1): 51-4.
- Cuevas E., Limón D., Pérez-Severiano F., Díaz A., Ortega L., Zenteno E., Guevara J. (2009). Antioxidant effects of Epicatechin on the hippocampal toxicity caused by Amyloid-beta 25-35 in rats. *European Journal of Pharmacology*. 616, 122–127.
- Da silva E., Piskula M., Tera J. (1998). Enhancement of antioxidative ability of rat plasma by oral administration of (-)- epicatechin. *Free Radical Biology and Medicine*. 1209-1216.
- Drachman D.(1977). Memory and Cognitive function in man: does the cholinergic system have specific role?. *Neurology*. 27(8) 783-90.

- Duty S., Jenner P., (2011). Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *British Journal of Pharmacology*. 10, 1476-5381.
- Ferrer I., López-González I., Carmona M., Dalfa E., Pujol A., Martínez A. (2012). Neurochemistry and the non-motor aspects of Parkinson disease. *Neurobiology of disease*. 46(508-526).
- Fornai F., Lenzi P., Ferrucci M., Lazzeri G., Poggio A., Busceti C., Biagioni F., Guisani M., Ruggieri S., Paparelli A. (2005). Occurrence of neuronal inclusions combine with increased nigral expression of alpha-synuclein within dopaminergic neurons following treatment with amphetamine derivatives mice. *Brain Research*.
- Fujimoto K. y Kita H. (1993). Response characteristics of subthalamic neurons to the stimulation of the sensorimotor cortex in rat. *Brain Research*. 609(1-2) 185-92.
- Gerlach M., Ben-Shachar D., Riederer P., Youdim B., (1994). Altered Brain Metabolism of Iron as a Cause of Neurodegenerative Diseases. *Journal of neurochemistry* . 63, (3). 793-807.
- Gillies G., McArthur S. (2010). Estrogen actions in the brain and the basis for differential actions in men and women: a case for sex-specific medicines. *Pharmacological review*. 62 (2), 155-198.
- Goetz C., Tanner C., Nauseida P. (1981). Weekly drug holiday in Parkinson disease. *Neurology*. 31 (11); 1460-2.
- Gorkaski B. y Renton W. (2004). Brain inflammation enhances 1-methylphenylpyridinium-evoked neurotoxicity in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 196, 381-389.
- Gomes A., Fernandes E., Lima J. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 65, 45-80.
- Guo S., Bezard E., Zhao B. (2005). Protective effect of green tea polyphenols on the SH-SY5Y cells against 6-OHDA induced apoptosis through ROS-NO pathway. *Free Radical Biology & Medicine* 39; 682 – 695.
- Guo S., Yang J., Yang T., Yang X., Bezard E., Zhao B. (2007). Protective effects of green tea polyphenols in the 6-OHDA rat model of parkinson's disease through inhibition of ROS- NO pathway. *Society of Biological Psychiatry*; 62: 1353-1362.

- Guo S., Zhao B., Li-a M., Shen S., Xin W. (1996). Studies on protective mechanisms of four components of green tpolyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. *Free Radical Biology & Medicine*. 1304, 210-222.
- Gutiérrez M., Argelia R., Gutiérrez H. (2011).Tópicos de actualización en neurobiología. Envejecimiento y Neurodegeneración. Universidad de Guadalajara (1era ed).
- Hasson F., Kernohan WG., McLaughlin M., Waldron M., Chambers H., Cochrane B., (2010). An exploration into the palliative and end-of-life experiences of carers of people with Parkinson's disease. *Palliative Medicine* 24(7) 731–736.
- Higdon J., Frei B. (2003).Tea catechins and polyphenols : health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.43, (1). 89-143.
- Horrocks P., Vicary D., Rees J., Paikes J., Marden C. (1993). Anticholinergic withdrawal and benzonexoi treatment in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 36 (6); 936-941.
- Huber J. & Cummings J. (1992). Parkinson's disease, neurobehavioral aspects. *Oxford University Prees* (1era ed.), 1-10.
- Jin X., Zheng RH., Li YM. (2008). Green tea consumption and liver disease: a systematic review. *Liver International* ISSN. 1478-3223.
- Kandel E. (2000). *Principios de Neurociencia*. Barcelona España: (3era ed)McGraw-Hill Interamericana, 854-856.
- Keeney P., Jing X., Capaldi R., Bennett J., (2006). Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and Is functionally impaired and misassembled. *The Journal of Neuroscience*. 26(19).5256 –5264.
- Kita H. and Hazarti L. (1995). Funcional anatomy of the basal ganglia. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loops. *Brain Research Rewivs*. 20 (1): 91-127.
- Lan J., Jiang D. (1997). Excessive iron accumulation in the brain: a possible potential risk of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Journal of Neuronal Transmission*. 104, 649-660.

- Langston J., Ballard P., (1983). Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *New England Journal of Medicine*. 4: 309-315.
- Lehninger A. (1978) *Bioquímica, Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular*. Ediciones Omega, Barcelona, 2ª edición. 519- 548.
- Levits Y., Weinreb O., Maor G., Moussa Y., Mandel S. (2001). Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, 78,1073-1082.
- Levites Y., Amit T., Mandel S., Moussa B., Youdim H. (2002). Neuroprotection and neurorescue against A β toxicity and PKC-dependent release of non-amyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *The FASEB Journal*. 10,1-23.
- Leaver K., Allbutt H., Creber N., Kassiou M., Henderson J. (2009). Oral pre-treatment with epigallocatechin gallate in 6-OHDA lesioned rats produces subtle symptomatic relief but not neuroprotection. *Brain Research Bulletin*. 80, 397-402.
- Li R., Peng N., Li XP., Le-WD. (2006). (-)-Epigallocatechin gallate regulates dopamine transporter internalization via protein kinase C-dependent pathway. *Brain Research*. 1097, 85-89.
- Mandel S., Amit T., Reznichenko L., Weinreb O., Youdim M. (2006). Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelators-antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders. *Molecular Nutrition*. 50, 229-234
- Mandel S., Amit T., Weinreb O., Reznichenko L., Moussa B., (2008). Simultaneous manipulation of multiple brain targets by green tea catechins: A potential neuroprotective strategy for Alzheimer and Parkinson diseases. *Neuroscience & Therapeutics* 14, 352–365.
- Mandel S. y Youdim MB., (2004). Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology & Medicine*.;37(3):304-17
- Mandel S., Weinreb O., Amit T. (2004). Cell signaling pathways in the neuroprotective actions of the Green Tea Polyphenol (-)-epigallocatechin-3gallate: Implications for neurodegenerative diseases. *Journal of Neurochemistry*. 88,1555-1569.

- Martin H. & Teismann P. (2009). Glutathione- a review on its role and significance in Parkinson`s disease. The FASEB- Journal. 23(10), 3263-3272.
- Martínez- Lazcano J. C., Boll-Woehrlen M.C., Hernández A., Rubio M., Sánchez A., Rios C., Pérez F., (2010). Radicales libres y estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas. Mensaje Bioquímico. 34, 43-59.
- Martínez-Flórez S., González J., Culebras M., Tuñón M. (2002) Los flavonoides : propiedades y acciones antioxidantes. Nutrición Hospitalaria. 16 (6). 271-278.
- Mercer L., Kelly B., Horne M., Beart P. (2004).Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis : investigations in primary rat mesencephalic cultures. Biochemical Pharmacology. 69, 339–345.
- Merello M. (1999)Anatomía funcional de los ganglios basales. Instituto de Investigaciones Neurológicas , Raul Carre “Fleni” , Buenos Aires 11-18.
- México, secretaria de salud 2010, recuperado 3 septiembre 2012) (<http://www.facmed.unam.mx/sq/css/GPC/SIDSS-GPC/gpc/docs/SSA-305-10-ER.pdf>).
- Micheli F. (1998). Enfermedad de Parkinson y otros trastornos relacionados. Editorial Panama (2da ed.), 1-7.
- Moncada S., Palmer R., Higgs E., (1991). Nitric oxide: physiology pathophysiology and pharmacology. Pharmacology Review. 43: 109-142.
- Mounsey B. & Teismann P. (2011). Mitochondrial Dysfunction in Parkinson’s disease: pathogenesis and neuroprotection, ID 6174772, 1-18.
- Pakkenberg B., Moller A., Guandersen H., Mouritzen D., Pakkerberg N. (1991). The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson`s disease estimated with and unbiased stereological method. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry. 54 (1) 30-31.

- Pan T., Fei J., Zhou X., Jankovic J., Le W. (2003). Effects of green tea polyphenols on dopamine uptake and on MPP⁺ - induced dopamine neuron injury. *Life Sciences*. 72, 1073-1083.
- Parent A., & Hazrati L.,(1995). Full-length review Functional anatomy of the basal ganglia. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Research reviews* 20, 91-127.
- Pérez A. (2009). *Enfermedad de Parkinson y Otros Parkinsonismos. Neurología caso a caso*. 1era edición. Hospital de Terrassa Barcelona. 35-98.
- Peterson J., Flood P., (2012). Oxidative stress and microglial cells in Parkinson's disease. *Mediators of Inflammation*. ID 401264, 1-12.
- Purves D., (2001). *Nuerociencia*. Barcelona España. 3era edición. Medica Panamericana.407-449.
- Richfield E., Twyman R., Berent S. (1987). Neurological syndrome following bilateral damage to the head of the caudate nuclei. *Annals of Nuerology*. 22 (6), 768-71.
- Royal college of physicians of London. (2006) *Parkinson's disease, National clinical guideline for diagnosis and management in primary and secondary care*.
- Rubio-Osornio M. Montes S., Pérez S., Aguilera P., Floriano S., Monroy N., Rubio C., Rios C. (2009) Copper reduces striatal protein nitration and tyrosine hydroxylase inactivation induced by MPP⁺ in rats. *Neurochemistry International*.
- Santamaría A, Flores-Escartín A, Martínez J, and Ríos C. (2003) Copper blocks quinolinic acid neurotoxicity in rats: Contribution of antioxidant systems. *Free Radical Biology and Medicine*. 35(4):418-427.
- Sawamoto N., Piccini P., Hotton G., Pavese N., Thielemans K., Brooks D. (2008). Cognitive deficits and striato-frontal dopamine release in Parkinson's disease. 131, 1294-1302.
- Schapira, (2007). Mitochondrial dysfunction in parkinson disease. *Cell death and differentiation*. 14, 1261-1266.

- Schwarting R. & Huston J. (1996). The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits recovery and treatments. *Progress in Neurobiology*. 50, 274-331.
- Shah Z., Li R., Ahmad A., Kensler W., Yamamoto M., Biswal S., Dore S. (2010). The flavanol (–)-epicatechin prevents stroke damage through the Nrf2/HO1 pathway. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 30, 1951–1961.
- Siderowf Andrew. (2001). Parkinson`s disease, clinical features, epidemiology, and genetics. *Movement disorders*. 19 (3), 565-579.
- Sies Helmut. (1993). Strategies of Antioxidant Defense. *European Journal of Biochemistry* .215, 213-219.
- Sindhu K., Banerjee R., Senthilkumar K., Saravanan K., Raju B., Rao J., Mohanakumar K. (2006). Rats with unilateral median forebrain bundle but not striatal or nigral, lesions by the neurotoxins MPP⁺ or rotenone display differential sensitivity to amphetamine and apomorphine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 321-329.
- Srividhya R., Zarkovic K., Stroser M. (2009). Mitochondrial alterations in ageing rat brain : effective role of epigallocatechin gallate. *International Journal of Developmental Neuroscience* . 27, 223–231.
- Surmeir J., Guzman J., Sanchez J., Schumacker P., (2011). The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson`s disease. *Neuroscience*. 198, 221-231.
- Tanner C., Goldman S., (1997). Epidemiology of Parkinson`s disease. *Neuroepidemiology*. 14 (2), 317-335.
- Tarrants MI., Denarié MF., Castelli J., Millard J., Zhang D. (2010). Drug therapies for Parkinson`s disease: A database analysis of patient compliance and persistence. *The American Journal of Geriatric Pharmacotherapy*. 8, (4). 374-383.
- Toulouse A. y Sullivan A. (2008). Progress in parkinson`s disease-Where we do stand?. *Progress in Neurobiology* . 85, 376-392.

- Vernier P., Frederic M., Callier S., Snappyan M., Wersinger C., Sidhu A. (2004). The degeneration of dopamine neurons in Parkinson's disease. *Annals New York Academy of Sciences*. 135(231-249).
- Weiner W., Klawans H. (1973). Failure of cerebrospinal fluid homovanilic acid to predict levodopa response in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Nuerosurgery, and Psychiatry*.36(5):747-52.
- Yelnik J. (2002). Functional anatomy of the basal ganglia. *Movement Disorders*. 17, (3), 15-21.

21. Anexo 1

21.1. Globo Pálido

El globo pálido (GP) utiliza ácido γ -aminobutírico (co-localizado con encefalina), como neurotransmisor (Blandini et al., 2000). Debido a ello, expresa receptores tipo GabaA principalmente. Las aferencias que recibe el globo pálido, provienen principalmente del cuerpo estriado y núcleo subtálmico, la mayoría de estas proyecciones son de naturaleza gabaérgicas y glutamatérgicas respectivamente (Blandini et al., 2000). Mientras, las eferencias del Gp tienen como blanco al núcleo subtálmico, la sustancia SNc, núcleo entopeduncular y núcleo pedunculopontino localizados en la formación reticular. Además, el Gp, parece recibir proyecciones de tipo dopaminérgicas a partir de las fibras colaterales de la vía nigroestriatal. (Cossette et al., 1999), este dato, es confirmado por la expresión de receptores dopaminérgicos de tipo D1 y D2 en el Gp (Richfield et al., 1987; Yung et al., 1995).

21.2. Sustancia Nigra

Las neuronas de la SNc son dopaminérgicas principalmente y contienen neuromelanina, un pigmento oscuro derivado de la dopamina oxidada (Blandini et al., 2000; Kandel, 2000). Las eferencias de la SNc son enviadas principalmente al cuerpo estriado mientras, recibe aferencias de diferentes estructuras, tales como proyecciones glutamatérgicas de la corteza prefrontal, el núcleo subtálmico y el núcleo tegmental pedunculopontino, así como proyecciones de tipo serotoninérgicas provenientes del núcleo dorsal y medial del rafe (Blandini et al., 2000). Dentro de los receptores que se encuentran en la SNc, se reportan glutamatérgicos de tipo inotrópicos principalmente (AMPA, NMDA), que parecen regular la actividad eléctrica de las neuronas dopaminérgicas (Christoffersen y Meltzer, 1995).

Por su parte, las neuronas de la SNr utilizan GABA como neurotransmisor, por lo cual las proyecciones que envían hacia el núcleo ventral anterior y ventral lateral del tálamo son de naturaleza inhibitorias. Sin embargo, las aferencias

que esta estructura recibe son tanto inhibitorias (gabaérgicas), como excitatorias (glutamatérgicas) (Blandini et al., 2000) siendo el cuerpo estriado y el globo pálido la principal fuente de las proyecciones gabaérgicas (Parent y Hazrati, 1995).

21.3. Núcleo subtálmico

El núcleo subtálmico que se encuentra inmediatamente por debajo del tálamo y por encima de la parte anterior de la sustancia nigra, está conectado anatómicamente con ambos segmentos del globo pálido y la sustancia nigra. Este es el único núcleo de los ganglios basales cuyas prolongaciones son de naturaleza excitadora, es decir glutamatérgicas (Purves., 2001). Los blancos de las proyecciones subtálamicas incluyen la SNr y el globo pálido interno principalmente, así como la corteza motora y el cuerpo estriado (Parent y Hazrati, 1995)

Las aferencias que este núcleo recibe son de tipo gabaérgicas, principalmente y provienen del Gpe. Otras proyecciones inhibitorias que recibe incluyen el pálido ventral y el estriado ventral sin embargo, el núcleo subtálmico, recibe también aferencias glutamatérgicas cuya fuente incluye la corteza sensorio-motora (Fujimoto y Kita, 1993).

22. Anexo 2

22.1. Cadena Respiratoria Mitocondrial

La cadena respiratoria mitocondrial constituida por una serie de transportadores de electrones, muchos de ellos proteínas integrales de la membrana, son capaces de aceptar y donar electrones, entre ellos se encuentran los complejos I a IV, de los cuales el I, III y IV actúan como bombas de protones. Cada complejo acepta o dona electrones a "acarreadores móviles" como la coenzima Q y el citocromo C que los transportan hasta la presencia del oxígeno, para reducirlo a agua (Alberts, 2000).

La relevancia de la cadena respiratoria en el proceso de fosforilación oxidativa se explica a partir de la teoría quimiostática. Que señala que la energía liberada en el transporte de electrones (e^-) se utiliza para bombear protones (H^+) en contra del gradiente electroquímico. Dado que la membrana interna es impermeable a H^+ , estos se acumulan en el espacio intermembranal formando un gradiente electroquímico. Para disminuir su concentración, los H^+ son reintroducidos a la matriz mitocondrial a favor del gradiente, mediante otro complejo enzimático, conocido como ATP-sintasa (Alberts, 2002; Lehninger, 2000).

La ATP- sintasa es la enzima directamente responsable por la síntesis de ATP. Los H^+ regresan a la matriz mitocondrial a través de un canal presente en la enzima, cuando el gradiente electroquímico se disipa la energía liberada se utiliza en el proceso de fosforilación de ADP para formar ATP. Es por ello que el desacople en la cadena transportadora de electrones no solamente disminuye los niveles de ATP en la célula sino que conduce a un aumento de hasta siete veces más en la formación de radicales libres, tal como se observa en la enfermedad de Parkinson (Martínez- Lazcano et al 2010).

