



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**Efecto de la coadministración de L- Dopa-Melatonina sobre
la neurogénesis en la SNc de ratas lesionadas con 6-OHDA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

MARIA MONTSERRAT MORENO RIVERA



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. VERÓNICA ANAYA MARTÍNEZ**

Estado de México, 2014



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.

Cuando empujas tu trabajo intelectual

Más allá de tu zona de confort puedes

CAMBIARLO TODO.

Dedicada a:

- Imelda Rivera
- Salvador Moreno
- Carmen Moreno

AGRADECIMIENTOS

“Extraña es nuestra situación aquí en la tierra. Cada uno de nosotros viene a una corta visita, sin saber por qué, aunque a veces pareciera que vislumbramos un propósito. Desde el punto de vista de nuestra vida diaria, sin embargo, hay algo que sí sabemos: que los humanos estamos aquí por el bien de otros humanos, sobre todo por aquellos sobre cuyas sonrisas y bienestar descansa nuestra propia felicidad. Todos los días me recuerdo a mí mismo cientos de veces que mi vida interior y exterior está basada en el trabajo de otros hombres, vivos y muertos, y que me debo dedicar yo mismo a dar en la misma medida que he recibido y sigo recibiendo.”

Albert Einstein

A los míos: Mi madre Imelda, Mi padre Salvador y mi Hermana Carmen. Por darme siempre un poco más de lo que necesito. Por su apoyo, pero sobretodo por inculcar en mí un espíritu libre que siempre busca ser y hacer lo que ama. Son mi más grande bendición.

Para Ana Silva la que a través de los años se convirtió en mi segunda hermana, a la “chaparra” con el espíritu más fuerte, emprendedor y disciplinado que conozco. Gracias por tomar mi mano y no soltarme, por convertirte en una constante en mi vida.

A ti Lyhé Arredondo. Por que las cosas siempre encuentran el lugar y la forma adecuada y como escribió García Márquez *“De tu mano no fui capaz de distinguir los límites entre la vida y la poesía”* te amo mi Fermina Daza.

A todos mis compañeros que durante la carrera hicieron mucho más grato el camino, especialmente a: Montserrat Paredes con quien la complicidad *“sobrenatural”* me regalo tantos momentos de alegría, a Omar González que por un tiempo crecimos *“tomados de la mano”* y a Karla Rivera con quien las sonrisas nunca faltaron.

A todos y cada uno de los compañeros del laboratorio de Neuromorfología, particularmente a Carmen Torres, Ricardo García y Ana Gutiérrez quienes más que compañeros fueron de manera importante mis tutores de este lado de la “trinchera” y también grandes amigos. Y un agradecimiento muy especial a las “Damitas”, con ustedes retome el gusto por lo que amo y recordé que uno está aquí porque quiere no por que deba.

A mi tutora la Dra. Verónica Anaya Martínez porque basada en la premisa de que “*Los ojos no ven lo que el cerebro no conoce*” me hizo descubrir nuevos mundos. Gracias por la infinita paciencia y las enseñanzas, que un Dios bondadoso siempre vigile tus pasos.

A la Dra. María Rosa Ávila por permitirme formar parte de este equipo y por ser ante mis ojos sinónimo de fortaleza y perseverancia. De las diferencias también se aprende.

Quiero agradecer de manera especial a mi comité Tutorial por las aportaciones brindadas para este trabajo.

- Dra. Verónica Anaya Martínez
- Dra. María Rosa Ávila Costa
- Dra. Laura Colín Barenque
- Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero
- Mtro. Enrique Montiel Flores

El apoyo financiero para la realización del trabajo de investigación: Efecto de la coadministración de L-Dopa/Melatonina sobre la neurogénesis en la SNc de ratas lesionadas con 6-OHDA, se obtuvo gracias a los proyectos:

- PAPPIT-DGAPA-UNAM AI202214-2
- PAPPIT-DGAPA-UNAM IN215114
- FESI-DIP-PAPCA-2014-16
- FESI-DIP-PAPCA-2014-18

ABREVIATURAS

5-HT	5-Hidroxitriptamina/Serotonina
5-HTP	5-Hidroxitriptófano
6-OHDA	6-Hidroxidopamina, 2,4,5-Trihidroxifeniletilamina
AADC	Descarboxilasa de L-Aminoácidos aromáticos
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
APO	Dihidro-apomorfina/Apomorfina
ATP	Adenosin Trifosfato
BHE	Barrera Hematoencefálica
BO	Bulbo Olfatorio
COMT	Catecol-O-Metiltransferasa
DA	Dopamina
DAT	Transportador de Dopamina
DOPAC	Ácido Dihidroxifenilacético
EP	Enfermedad de Parkinson
ERO-ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
GABA	Ácido Gamma Amino Butírico
GB	Ganglios Basales
GCS	Ganglio Cervical Superior
GD	Giro Dentado
GP	Globo Pálido
Gpe	Globo Pálido Externo
Gpi	Globo Pálido interno
GSH-Px	Glutación Peroxidasa
HIOMT	Hidroxindol-O-Metiltransferasa
HVA	Ácido Homovanílico
IP	Intraperitoneal
L-DOPA	L-3,4-Dihidroxifenilalanina
MAO-A	Monoaminoxidasa A
MAO-B	Monoaminoxidasa B
mfb	Haz Medial del Cerebro Anterior
MPP+	1-Metil-4-Fenilpiridinio
MPTP	1-Metil-4-Fenil-1,2,3, 6-Tetrahidropiridina
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NAS	N-Acetilserotonina
NAT	Serotonina N-acetiltransferasa
NC	Núcleo Caudado
NE	Núcleo Estriado
NG2	Condroitínsulfatoproteoglicano
NP	Núcleo Putamen

NPV	Núcleo Paraventricular
NSQ	Núcleo Supraquiasmático
NST	Núcleo Subtálmico
PQ	1,1-Dimetil-4,4-Bipiridina o Paraquat
RL	Radicales Libres
SGZ	Zona Subgranular
SN	Sustancia Nigra
SNC	Sustancia Nigra Compacta
SNr	Sustancia Nigra Reticular
SOD	Superóxido Dismutasa
SVZ	Zona subgranular
TH	Tirosina Hidroxilasa
TRH	Retino-Hipotalámico
VD	Vía Directa
VI	Vía Indirecta
VL	Ventriculos Laterales
VRM	Vía Rostral Migratoria

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ENFERMEDAD DE PARKINSON	2
2.1 ETIOLOGÍA	3
2.2 SINTOMATOLOGÍA	4
2.3 PATOLOGÍA	6
2.4 BIOQUÍMICA	7
3. GANGLIOS BASALES	10
3.1 ANATOMIA DE LOS GANGLIOS BASALES.....	10
3.2 ORGANIZACIÓN FUNCIONAL.....	12
3.3 INTERACCIÓN ENTRE NEUROTRANSMISORES Y CONSECUENCIAS DE LA PERDIDA DOPAMINERGICA	13
4. MODELO CON LA 6-OHDA	16
5. TRATAMIENTOS EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	18
5.1 AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS	18
5.2 L-DOPA	19
5.3 ANTIOXIDANTES	21
6. NEUROGÉNESIS	24
6.1 COMPOSICIÓN DE REGIONES NEUROGENICAS.....	25
6.2 FACTORES EFECTORES DE LA NEUROGÉNESIS	27
7. JUSTIFICACIÓN	30

8. OBJETIVOS.....	30
8.1 OBJETIVO GENERAL	30
8.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
9. MATERIALES Y METODOS.....	31
9.1 LESIÓN.....	31
9.2 GIRO INDUCIDO	31
9.4 TRATAMIENTOS	32
9.5 ADMINISTRACIÓN DE BRDU.....	32
9.6 PERFUSIÓN INTRACARDIACA	33
9.7 PRUEBAS INMUNOHISTOQUIMICAS	33
10. RESULTADOS	34
10.1 CONTEO DE NEURONAS: INMUNOHISTOQUIMICA TH	34
10.2 CONTEO DE NEURONAS: INMUNOHISTOQUIMICA BRDU/TH	35
11. DISCUSIÓN	40
11.1 NEURONAS INMUNORREACTIVAS A TH EN LA SNC.....	40
11.2 NEURONAS INMUNORREACTIVAS A BRDU/TH EN LA SNC	43
12. CONCLUSIONES	48
13. BIBLIOGRAFIA.....	49
APENDICE 1	66
APENDICE 2	68
APENDICE 3	69

1. INTRODUCCIÓN.

La actividad motora está controlada intrínsecamente por la acción de tres regiones principales del encéfalo: corteza cerebral, cerebelo y ganglios basales (GB).

Funcionalmente el sistema motor se separa en dos subsistemas: el sistema motor piramidal y el sistema motor extrapiramidal, el primero se relaciona con el movimiento voluntario y el segundo con la iniciación motora (Kandel *et al.*, 2000). Sin embargo, algunas entidades simultáneas participan en diferentes redes neuronales en ambos subsistemas, así, el sistema motor piramidal coincide en la corteza con el sistema motor extrapiramidal.

El sistema motor piramidal se compone de dos tipos principales de neuronas: las neuronas motoras superiores y las neuronas motoras inferiores. El sistema motor extrapiramidal es un conjunto de circuitos paralelos que unen las estructuras subcorticales con la corteza motora. Sus principales componentes son: el núcleo estriado (NE), el globo pálido (GP), el núcleo subtálamico (NST), y la sustancia nigra (SN) todos pertenecientes a la categoría anatomofuncional de los GB (Taloz *et al.*, 2008).

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un padecimiento del sistema nervioso central que implica el trastorno de las funciones normales de los GB y el deterioro progresivo del control motor.

2. ENFERMEDAD DE PARKINSON.

Las enfermedades neurodegenerativas son procesos crónicos y progresivos que están caracterizados por la pérdida selectiva de neuronas en el sistema motor, sensorial y/o cognitivo (Mayoral, 2008).

La EP es un desorden neurodegenerativo de etiología desconocida la cual afecta a los GB dejando incapacitado al paciente para ejecutar correctamente movimientos voluntarios.

Se caracteriza por la muerte de neuronas dopaminérgicas en la zona compacta de la sustancia nigra (SNc) y la degeneración progresiva de la vía nigroestriatal, siendo la pérdida dopaminérgica en el estriado la responsable de las principales alteraciones motoras (Radad *et al.*, 2005).

Fue descrita por James Parkinson en el tratado "*An essay on the Shaking Palsy*" en 1817 con el nombre de "parálisis agitante" o "parálisis temblorosa" y señala los síntomas o signos que se observaron en 6 casos clínicos. Define a la enfermedad como "movimiento involuntario tremulante con la disminución parcial de la potencia muscular, en parte, no durante la acción y aún apoyado, con la tendencia de inclinar el tronco hacia adelante y a pasar de un paso de marcha al de correr. Los sentidos y el intelecto permanecen intactos" (Michelli, 1998).

En México, la EP es la segunda patología crónica degenerativa del sistema nervioso central (Rodríguez *et al.*, 2011) y una de las principales causas de atención médica en personas mayores de 64 años (Sandoval y Richard, 2007). Afecta a una de cada 1,000 personas en el mundo. De acuerdo con el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía en el 2008 se estimó que existen al menos 500,000 pacientes con EP en nuestro país, con un rango de 50 a 100 casos por cada 100,000 habitantes (Góngora *et al.*, 2005). En la ciudad de México, en el 2005 se encontraba como la décima octava causa de muerte en hombres mayores de 65 años y la vigésima en mujeres en el mismo rango de edad (INEGI, 2005).

2.1 ETIOLOGÍA.

La etiología específica de esta enfermedad aun no es clara; determinadas mutaciones genéticas, eventos proinflamatorios posteriores a traumatismos, o la exposición viral o bacteriana en el desarrollo prenatal podrían estar implicadas en la etiología de la EP (Ringheim y Conant, 2004).

En los últimos años se ha hecho hincapié en factores ambientales, excitotoxicidad y estrés oxidativo. Estos factores se han propuesto como la causa de la muerte de las neuronas dopaminérgicas que tienen lugar en la EP.

Factores ambientales: Diversos estudios han reportado la asociación entre la EP y factores ambientales, como son: habitar en ambiente rural, consumo de agua de pozo, exposición a pesticidas y a conservadores de la madera (factores que reflejan la posible exposición a compuestos neurotóxicos -Gorell *et al.*, 1999-). La exposición prolongada a cobre y manganeso o la exposición combinada con plomo, cobre y hierro, se han relacionado con mayor riesgo para presentar EP (Olanow y Tatton, 1999).

Excitotoxicidad: Implicada en la EP basada en dos posibles mecanismos:

- Incremento en la liberación de glutamato: Las neuronas de la SNc son ricas en receptores para glutamato y reciben una extensa innervación glutamatérgica provenientes de la corteza y del NST, cuando se incrementa la tasa de disparo en las aferencias excitatorias a la SNc, se puede provocar daño excitotóxico (Rodríguez *et al.*, 1998).
- Alteración del calcio mitocondrial: La mitocondria es un organelo que está presente en el citoplasma de las células, cuya principal función es la de generar energía en forma de adenosin trifosfato (ATP), a partir de la oxidación de sustratos energéticos por parte de la cadena de transporte de electrones. La reducción de la energía por defecto del complejo I mitocondrial permite que la concentración fisiológica del glutamato medie un aumento en el flujo de calcio (Ca^{2+}) al interior de la célula (Olanow y Tatton, 1999). El Ca^{2+} es un ión fundamental en procesos intracelulares, interviene en la producción del potencial de acción y la liberación de neurotransmisores; Sin embargo, la entrada masiva de Ca^{2+} o el fallo de los mecanismos que regulan su concentración intracelular desencadenan una serie de

acontecimientos que conllevan a la muerte neuronal (Yu *et al.*, 2001; Bahena *et al.*, 2000).

Estrés Oxidativo: Las reacciones de óxido-reducción (REDOX), son reacciones biológicas esenciales y necesarias que conducen a la formación de diferentes compuestos en los procesos metabólicos celulares, estas involucran la transferencia de electrones y pueden generar productos conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO o ROS por sus siglas en inglés *reactive oxygen species*). Se consideran ERO a macromoléculas que son tanto radicales libres (RL) como productos del metabolismo celular que pueden causar daño. Dentro del grupo de RL se encuentran moléculas como: el ozono, oxígeno singlete (átomo de oxígeno en un estado excitado), superóxido, peróxido de hidrogeno, peroxinitrito y radical hidroxilo (Bartosz, 2009).

Los RL son productos normales del metabolismo de las células aeróbicas generados esencialmente a partir de tres fuentes endógenas: por reacciones REDOX como productos intermediarios de metabolización de medicamentos; por activación del sistema inmunológico o por producción de neurotransmisores y hormonas (Ávila, 2001). Estos, al poseer un número de electrones no pareados en su órbita externa, fácilmente forman uniones insaturadas con los ácidos grasos de la membrana, desencadenando una serie de reacciones que afectan a las células, a este proceso se denomina peroxidación lipídica (Freeman y Crapo, 1982).

En condiciones metabólicas normales, existe un balance entre los eventos oxidativos (producto de los RL) y los sistemas de defensa oxidantes (enzimas principalmente -Cadey y Brannock-, 1998). Cuando este balance no se mantiene, ya sea por una pérdida o disminución del sistema protector o por el aumento de la producción de RL, el tejido entra en “*estrés oxidativo*”, dicho estado provoca cambios estructurales de macromoléculas celulares como proteínas, ácido desoxirribonucleico (ADN), carbohidratos y lípidos (Oyama *et al.*, 1996; Clarke, 1999; Leist y Nicotera, 1999).

El tejido nervioso es extremadamente vulnerable al daño inducido por los ERO y RL, debido a su alto requerimiento metabólico de oxígeno; además de que contiene alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados y altas concentraciones de fierro en algunas áreas (Finotti *et al.*, 2000). Así la sobreproducción de RL ataca y daña el tejido

neuronal, contribuyendo de manera directa o sinérgica al desarrollo de los procesos neurodegenerativos (Segura *et al.*, 2003).

Las neuronas poseen mecanismos de defensa altamente efectivos de reducción y remoción, responsables de contrarrestar los efectos tóxicos de las ERO y RL, éstos incluyen a la superóxido dismutasa (SOD) la cual remueve el anión superóxido (O_2^-) y produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que a su vez, es removido por la glutatión peroxidasa (GSH-Px) o catalasa, además la quinona reductasa que utiliza nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH o NADH) para reducir las quinonas (productos oxidados de los compuestos con una estructura catecol) a hidroquinonas, compuestos menos tóxicos. Además de un segundo sistema no enzimático como la vitamina E (α -tocoferol) y la vitamina C (ácido ascórbico) (Sies *et al.*, 1992).

En la EP el estrés oxidativo ha recibido especial atención, debido a que durante el metabolismo de la dopamina (DA) se pueden producir RL.

2.2 SINTOMATOLOGÍA.

El paciente con EP desarrolla principalmente cuatro signos clínicos que ponen de manifiesto las deficiencias motoras:

Temblores, que se presenta cuando el paciente está en reposo, con una frecuencia de alrededor 3-4 Hz; se agrava con las emociones o el estrés y desaparece durante el movimiento y el sueño, se inicia generalmente en una mano, y en menor frecuencia en los labios, mandíbula, lengua o una extremidad inferior (Pastor y Tolosa, 2001).

Rigidez, causada por el aumento del tono muscular que afecta a todos los grupos musculares (flexores, extensores, músculos axiales o de extremidades) y se refiere a la resistencia que presentan algunas partes del cuerpo al movimiento (el miembro del cuerpo no funciona a pesar de que el sujeto desee que se mueva). Al igual que el temblor, la rigidez suele ser asimétrica a lo largo de la evolución de la enfermedad (García *et al.*, 2003).

Acinesia, se manifiesta como la dificultad para iniciar y efectuar movimientos secuenciales voluntarios del tipo más común. Las líneas de la cara del paciente son lisas, su expresión es fija y casi no manifiesta respuesta emocional espontánea.

Alteración de los reflejos posturales, postura encorvada del tronco con la cabeza y los hombros caídos, así como enlentecimiento de la marcha, los pasos son cortos y arrastrando los pies, los brazos se mantienen a los lados y no se balancean rítmicamente ni automáticamente con las piernas como debería suceder, a esto se le denomina “*marcha festinante*”. Aunque el paciente tiene dificultad para dar los primeros pasos, una vez iniciada la marcha, los pasos son cada vez más rápidos, y tiene dificultad para detenerse cuando ha alcanzado su meta (Gilmans y Winan, 1994).

Entre otros síntomas motores menos recurrentes se encuentran: Alteraciones psiquiátricas (demencia, alucinaciones, psicosis) y cognitivas (lentitud de pensamiento y la alteración para llevar a cabo ciertas tareas de planeación o secuenciación) o combinación de cualquiera de ellas (Obeso *et al.*, 2002; Bloem *et al.*, 2006; Martínez, 2006). En la fase tardía de la enfermedad puede presentarse pérdida de la capacidad mental caracterizada por enlentecimiento cognitivo, déficit de atención y deterioro visoespacial (Merello, 2008).

2.3 *PATOLOGÍA.*

La EP fue la primera afección del sistema nervioso identificado como enfermedad molecular causada por un defecto específico del metabolismo de un neurotransmisor.

A comienzos de la década de 1960 se encontraron niveles bajos de DA en pacientes con EP; así como pérdida selectiva de neuronas en la SNc y proliferación de células gliales en las zonas afectadas (Grandas, 2003; Hattori *et al.*, 2004); acompañada de depósitos de material proteico denominados “*cuerpos de Lewy*”, formados principalmente de α -sinucleína; que en condiciones normales regula la actividad de la tirosina hidroxilasa (TH) manteniéndola en estado inactivo no fosforilado, además de regular la concentración del transportador de dopamina (DAT) en el citoplasma (Corti *et al.*, 2005). Se ha descrito que los “*cuerpos de Lewy*” están constituidos por neurofilamentos que se acumulan tras su fragmentación y fosforilación anormal (Bertabet *et al.*, 2002, Otero, 1996); su función

fisiológica no es muy clara, pero se ha propuesto que juegan un papel importante en la regulación y reciclamiento de las vesículas sinápticas (con particular relevancia en el almacenamiento de la DA) (Moore *et al.*, 2005), y la estimulación de la cascada apoptótica y supervivencia neuronal bajo condiciones de estrés oxidativo (Olanow y Tatton, 1999).

Se ha descrito un decremento en la actividad de las enzimas biosintéticas de catecolaminas: TH y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (L-DOPA descarboxilasa) (Lloyd *et al.*, 1975; Waters *et al.*, 1988; Pickel *et al.*, 1992a,b), y aumento de acetilcolina (Segura *et al.*, 2003).

Un aspecto importante es el decremento de un 30-40% en la actividad del complejo I en la cadena respiratoria mitocondrial en las neuronas de la SNc (Schapira *et al.*, 1990). Dicha alteración puede contribuir a la degeneración celular en la EP debido a la disminución en la síntesis de ATP, por el incremento en la generación de RL en este sitio o como un aumento compensatorio de la respiración mitocondrial en el complejo II. Otra posibilidad es que el complejo I estimule la cascada apoptótica, ya que hay evidencias que la reducción en el potencial de membrana mitocondrial puede llevar a la apertura transitoria del poro mitocondrial y propiciar la liberación de proteínas que señalizan el inicio de la apoptosis (Olanow y Tatton, 1999).

Se ha reportado que la concentración de enzimas que inactivan a los RL: La GSH, GSH-Px, la catalasa, así como el ácido ascórbico y el α -tocoferol se encuentran disminuidos dentro de la SNc de pacientes con EP y en general en los GB (Yamamoto, 1998; Jiménez *et al.*, 1999). Cabe mencionar que los bajos niveles de concentración de estas enzimas antioxidantes no han sido detectados en otras áreas del cerebro, ni han sido reportados en ninguna otra EN.

2.4 BIOQUÍMICA.

La DA es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante en el sistema nervioso central, participa en la regulación de diversas funciones como la actividad motora, emotividad la afectividad así como en la comunicación neuroendocrina.

En el sistema nervioso periférico, la DA es un modulador de la función cardíaca y renal, del tono vascular y de la motilidad gastrointestinal (Bahena *et al.*, 2000).

La DA es una monoamina biogénica, se sintetiza en las neuronas de la SNc y tiene lugar en las terminales nerviosas dopaminérgicas donde se encuentran en altas concentraciones las enzimas responsables: La TH y la L-DOPA descarboxilasa. La TH es la enzima limitante de la síntesis de catecolaminas; es una oxidasa que utiliza L-tirosina, O² y Fe²⁺ como sustratos y tetrahidrobiopterina (BH₄) como co-factor para adicionar un grupo OH al aminoácido para formar L-3,4- dihidroxifenilalanina (L-DOPA), esta es descarboxilada a DA por la L-DOPA descarboxilasa en una reacción que precisa piridoxal fosfato (Figura 1). La TH es regulada por los productos (L-DOPA y DA) que la inhiben. La rápida acción de la descarboxilasa hace que la concentración de L-DOPA sea extremadamente baja y que no sea por lo tanto de relevancia para disminuir la actividad enzimática (Bahena *et al.*, 2000).

La DA, una vez sintetizada puede ser liberada directamente al espacio sináptico o bien ser transportada al interior de vesículas sinápticas para ser liberada por exocitosis al fusionarse la membrana vesicular con la sináptica (Bahena *et al.*, 2000).

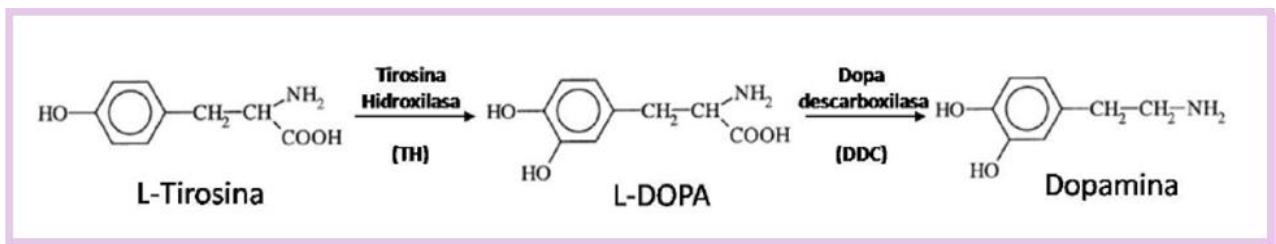


Figura 1. Síntesis de Dopamina (García *et al.*, 2003).

La DA recapturada es convertida por la enzima Monoaminoxidasa-A (MAO-A) en ácido dihidroxifenilacético (DOPAC); La MAO-A es una enzima intracelular que se encuentra localizada en la membrana externa de las mitocondrias y degrada la DA citoplasmática que no está almacenada dentro de las vesículas presinápticas, además está presente en el tejido glandular, hígado, riñones, intestinos y en menor medida en el cerebro donde se encuentra en el interior de la terminal nerviosa. El DOPAC liberado al exterior de la terminal es convertido en ácido homovanílico (HVA) por la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT), esta enzima se encuentra principalmente en el

espacio extracelular además del hígado y riñones (Weiner y Molinoff, 1994; Cooper *et al.*, 1996).

Se han identificado cinco tipos de receptores dopaminérgicos, todos ellos acoplados a proteínas G divididos en dos familias: D₁ y D₂. Los receptores de la familia D₁ (subtipos D₁ y D₅) están acoplados a proteínas G_s, que estimulan la formación de AMPc como principal mecanismo de traducción de señales. Los subtipos pertenecientes a la familia D₂ (D₂, D₃ y D₄), acoplados a proteínas G_i, inhiben la formación de AMPc, activan canales de K⁺ y reducen la entrada de iones de Ca²⁺ a través de canales dependientes del voltaje (Bahena *et al.*, 2000).

3. GANGLIOS BASALES.

El término “Ganglios Basales” (del griego *ganglion*, "conglomerado", "nudo", "tumor") es usado para denominar grupos de núcleos relacionados anatómicamente y funcionalmente, localizados en el telencéfalo, diencefalo y mesencéfalo. Son el sitio de convergencia e integración de múltiples áreas sensoriales, motoras y de asociación (Wilson, 1998; Bolam *et al.*, 2000). Están relacionados con aspectos de planeación de movimientos, selección y memoria motora; aun que también desempeñan funciones importantes denominadas “no motoras” involucradas en mecanismos de alto orden; que van desde el procesamiento del “*feedback*” sensitivo, alternancia de contextos, atención, percepción visual, aprendizaje, memoria de trabajo y toma de decisiones (Merello, 2008).

3.1 ANATOMIA DE LOS GANGLIOS BASALES.

Los GB están formados por cinco núcleos subcorticales conectados entre sí: El núcleo Caudado (NC), el Putamen (NP), el GP, NST y la SN (Gilmans y Winans, 1994) (Figura 2).

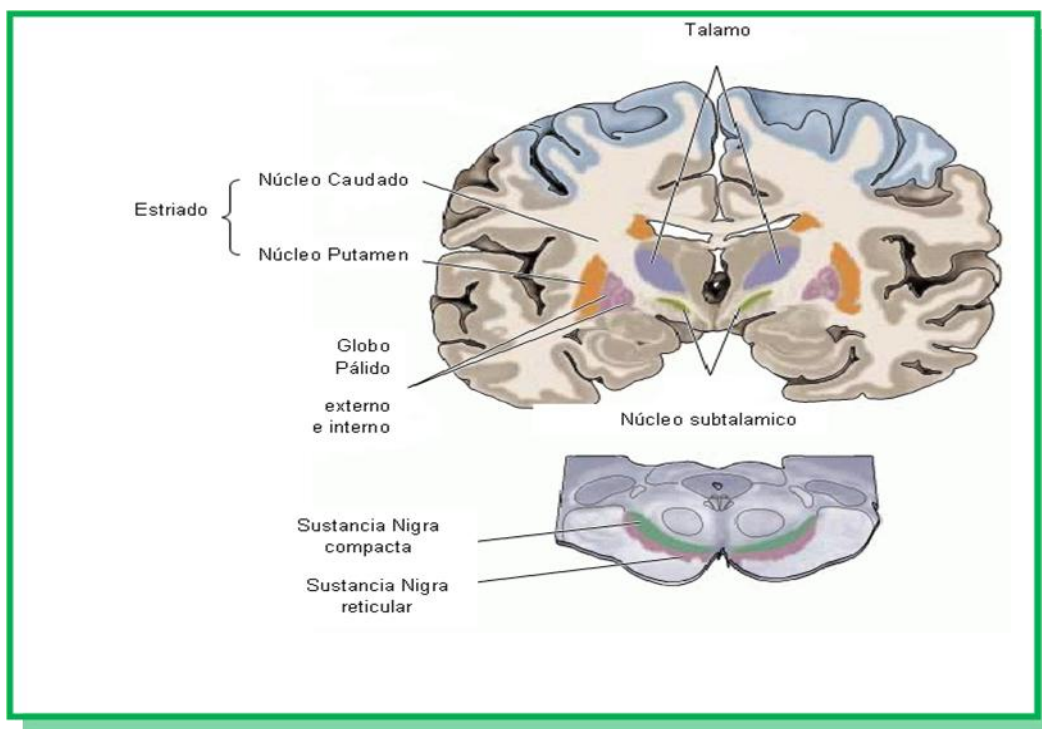


Figura 2. Esquema de los Ganglios Basales. Modificado de Purves *et al.*, 2007.

El NE (en primates) está constituido por la región dorsomedial (NC) y la región ventromedial (NP) separados por la capsula interna (en roedores no existe tal separación y se le denomina neoestriado). A estos dos núcleos se les considera como la entrada hacia los GB, ambos se desarrollan a partir de la misma estructura telencefálica y se componen del mismo tipo celular (Carpenter, 1981). Están constituidos en un 95% por neuronas espinosas medianas de proyección que sintetizan ácido gamma amino butírico (GABA) como neurotransmisor (Kita y Kitai, 1988); el 5% restante de la población está integrada por cuatro clases de interneuronas bien caracterizadas: interneuronas colinérgicas, GABAérgicas que expresan calretinina, parvalbumina y neuropeptido Y/óxido nítrico (Tepper *et al.*, 2008).

La población de neuronas espinosas medianas de proyección, presentan dos tipos de receptores dopaminérgicos; las neuronas que proyectan al globo pálido interno (GPi) que expresan preferencialmente receptores tipo D₁, mientras que las neuronas que proyectan al globo pálido externo (GPe) expresan receptores dopaminérgicos del tipo D₂ lo cual influye en la organización de los GB (Surmeier *et al.*, 2011).

El GP es una estructura compuesta por dos segmentos, el interno y el externo. En roedores el segmento interno se denomina núcleo entopeduncular (DeLong y Georgopoulos, 1981). Las proyecciones de las neuronas palidales (GPe) varían dependiendo del tipo neuronal. Las neuronas que son parvalbumina-positivas proyectan al NST, al GPi o la sustancia nigra reticular (SNr); y otras que son parvalbumina-negativas envían sus proyecciones principalmente al NST. Ambos tipos de neuronas pueden enviar proyecciones recurrentes al estriado; y al igual que este, las neuronas de proyección son GABAérgicas. En los modelos actuales de organización funcional de los GB, el GPe es considerado como un centro de integración y como un importante relevo de la “*vía indirecta*” (VI) conectando el estriado con el NST y los núcleos de salida (GPi/SNr) (Alexander y Crutcher, 1990).

El NST se encuentra en la porción basal del diencefalo, en la unión con el mesencéfalo (Parent, 1990). Es el único núcleo glutamatérgico en los GB (Smith *et al.*, 1998) y juega un papel importante en el control motor. Se ha reportado que en el NST expresa receptores para DA (D₁, D₂ y D₃) (Flores *et al.*, 1999).

La SN se encuentra en el mesencéfalo y presenta dos zonas: una porción ventral (SNr) que se semeja citológicamente al GP y una porción dorsal pigmentada (SNc) compuesta por células dopaminérgicas cuyos cuerpos neuronales contienen neuromelanina (Carpenter, 1976). Este pigmento oscuro (polímero de la DA o sus metabolitos), da a la SNc su nombre, el grado de pigmentación esta correlacionado con la concentración de DA pero la función del pigmento es desconocido (Coté y Crutcher, 1991). El GPi y la SNr constituyen los principales núcleos de salida de los GB.

3.2 ORGANIZACIÓN FUNCIONAL.

Las complejas conexiones de los GB se pueden simplificar en base a circuitos intrínsecos, los cuales están organizados funcional y estructuralmente; además, trabajan en paralelo y están funcionalmente segregados, relacionándose corteza-GB-tálamo-corteza a la fecha se han descrito 5 circuitos principales:

1. **Circuito motor:** proyecta a regiones corticales motores precentrales, tálamo, núcleos ventral lateral (*pars orali*), ventral anterior (*pars parvocellularis*) y ventral anterior (*pars magnocellularis*).
2. **Circuito óculomotor:** proyecta a regiones corticales visuales frontal, suplementaria y tálamo.
3. **Circuito prefrontal:** proyecta a la corteza prefrontal, dorsolateral y tálamo.
4. **Circuito orbitofrontal lateral:** proyecta hacia la corteza prefrontal, orbitofrontal, lateral y al tálamo.
5. **Circuito límbico:** proyecta a la corteza cingulada anterior, a la corteza orbitofrontal medial y tálamo (Alexander y Crutcher, 1990; Hoover y Strick, 1993; Parent y Hazrati, 1995; Smith *et al.*, 1998).

El circuito motor se ha descrito como una vía de reentrada, a través de la cual la inervación proveniente de las áreas sensoriomotoras de la corteza precentral y poscentral van de regreso a ciertas áreas motoras precentrales después de procesos intermedios dentro de los GB y el tálamo (Alexander y Crutcher, 1990; Wichmann y DeLong, 1993).

Este circuito motor se basa en la llamada “*vía directa*” (VD) y “*vía indirecta*” para procesar, integrar y transmitir a través de los GB la información recibida proveniente de la corteza, cuyas proyecciones son glutamatergicas; es decir, excitatorias.

Ambas vías inician en el estriado; sin embargo, la VD proyecta directamente hacia los núcleos de salida (GPi/SNr) mientras que la VI hace “relevos” en el GPe y de esta al NST para finalmente dirigirse hacia los núcleos de salida. La integración dentro del estriado se realiza a través de dos subpoblaciones de neuronas espinosas medianas de proyección (Smith y Bolam, 1990). Ambas subpoblaciones se caracterizan por el tipo de receptores y neuropeptidos que expresan. De acuerdo a esto, las células de la VD expresan GABA como principal neurotransmisor, receptores a DA de tipo D₁ y los neuropeptidos sustancia P y dinorfinas; por su parte las células de la VI expresan GABA, receptores de DA de tipo D₂ y como neuropeptido encefalinas (Figura 3).

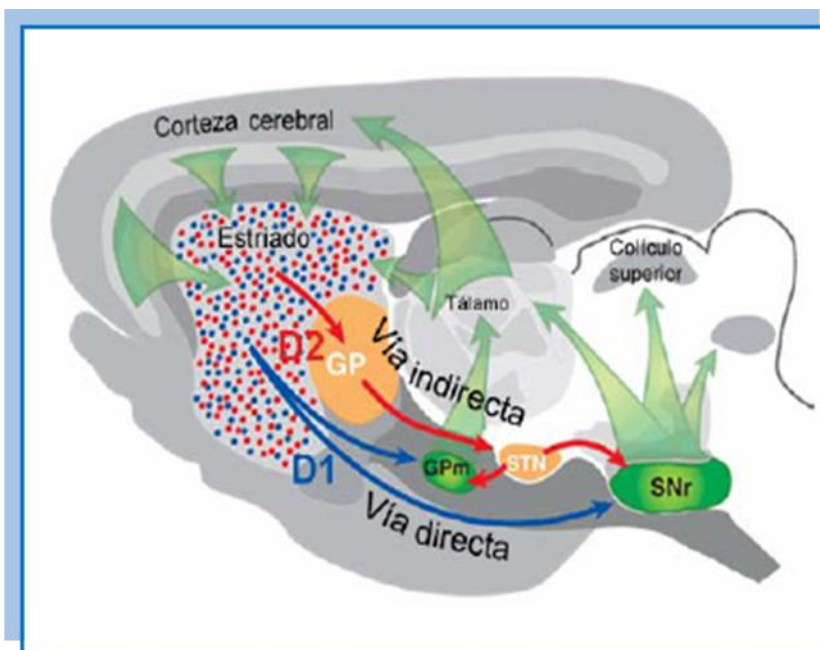


Figura 3. Vías centrales responsables del control del movimiento motor. Vías directa e indirecta señaladas sobre el esquema de una sección sagital de cerebro de ratón. La corteza y el tálamo proporcionan inervación excitatoria (flechas verdes) al estriado. La “*vía directa*” se origina a partir de las neuronas de proyección estriatal (puntos azules, neuronas con receptores D₁) cuyos axones (flechas azules) se extienden hacia los núcleos GP y SNr. La “*vía indirecta*” (puntos rojos, neuronas con receptores D₂) cuyos axones (flechas rojas) terminan dentro del GP, las cuales proyectan al NST, que a su vez proyecta al GP y SNr. Modificado de Gerfen, 2006.

3.3 INTERACCIÓN ENTRE NEUROTRASMISORES Y CONSECUENCIAS DE LA PERDIDA DOPAMINERGICA.

Los GB trabajan en sinergia con la corteza, en donde se relacionan funciones motoras y motivacionales; contienen una marcada diversidad de sustancias neuroactivas que están organizadas en subsistemas funcionales que trabajan de manera balanceada.

Cualquier alteración de este balance da como resultado importantes alteraciones como las que se observan en las enfermedades neurodegenerativas (Graybiel, 1990b; Di chiara *et al.*, 1994).

La DA que es liberada en las células estriatales desempeña funciones diferenciales sobre la actividad de ambas vías. Facilita la transmisión de la VD y decremента la activación de la VI. Funcionalmente, la activación de ambas vías produce efectos opuestos; es decir, al incrementar la actividad de las neuronas de la VD se inhibe tónicamente a las neuronas de los núcleos de salida, los cuales presentan la llamada “desinhibición” de las neuronas del tálamo. Mientras que al incrementar la actividad de las neuronas de la VI, se inhibe tónicamente la actividad del GPe, esto conlleva a la desinhibición de las neuronas del NST y a su vez incrementan la actividad de las neuronas de los núcleos de salida, inhibiéndose las neuronas del tálamo (Alexander y Crutcher, 1990) (Figura 4 A).

En un estado normal, no deficiente de DA está activada la proyección tálamo-cortical. En una situación en la que falta DA, como en la EP, su acción sobre ambas vías conduce a la inhibición anormal de dicha proyección. Así, la deficiencia de DA provocaría sobreactividad de la VI e hipoactividad de la VD. Si la actividad de la VI es mucho mayor que la de su contraparte, se inhibirán los circuitos tálamocorticales del movimiento (Figura 4 B).

El que la DA sólo facilite a las neuronas activadas por la corteza, mientras que ayude a inhibir a las neuronas no activadas, hace que se separen mejor las neuronas que activan a los músculos agonistas de las neuronas que activan a los músculos antagonistas. Esta selección es necesaria para que las secuencias de activación y desactivación muscular sucedan suavemente y no de manera brusca o escalonada. Si esta selección es deficiente, hay co-activación de ambos músculos, lo que provoca rigidez y oposición de las extremidades a ser desplazadas pasivamente, características en la EP (Bargas y Galarraga, 2000).

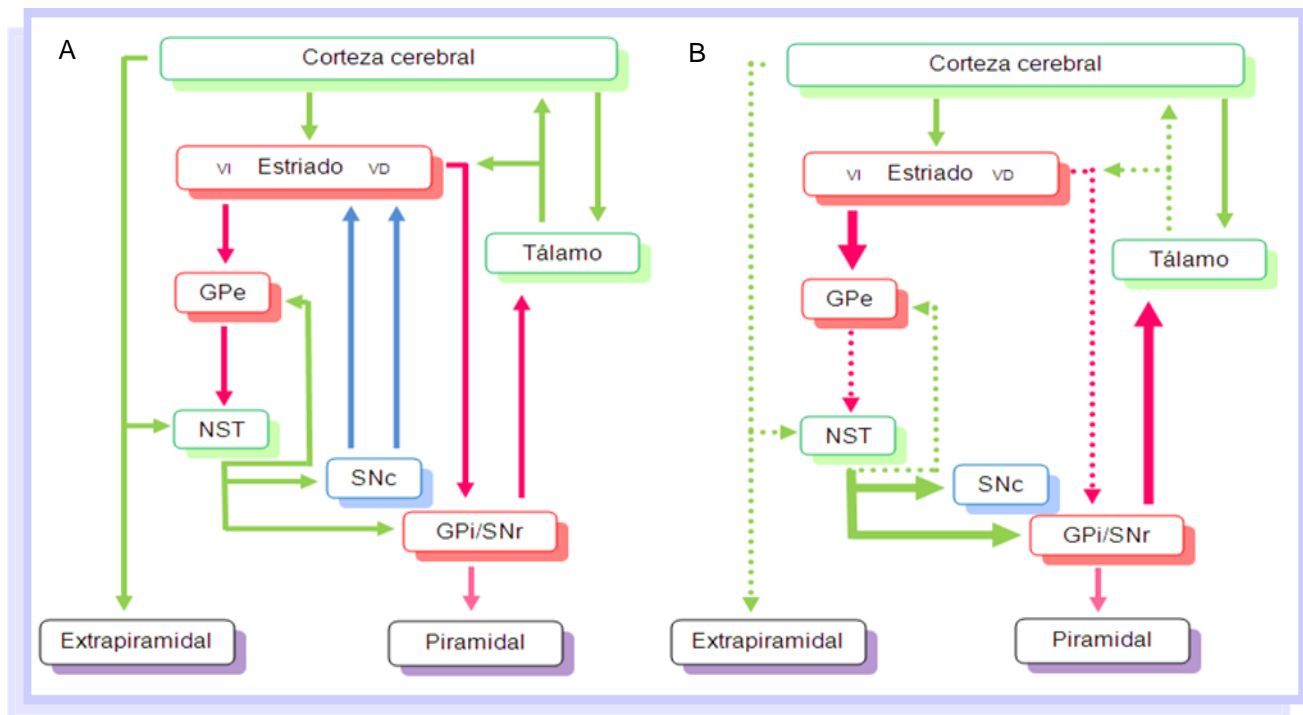


Figura 4. Modelo esquemático tradicional de la organización de los GB. Los colores hacen referencia al neurotransmisor implicado en cada inervación: GABA (rojo), Glutamato (verde) y Dopamina (azul). La DA proveniente de la SNc ejerce funciones diferenciales en las vías directa e indirecta. La vía directa (VD) proyecta directamente al GPi y SNr; mientras que la vía indirecta (VI) establece “relevos” en el GPe y el NST antes de proyectar a los núcleos de salida. En A se representa un sistema íntegro y en B cuando hay deficiencia de DA (Anaya, 2006).

Ahora bien, los receptores D₂ tienen mayor afinidad por la DA que los receptores D₁ y están tónica y parcialmente activados por la liberación basal de DA. En cambio, los receptores D₁ se activan por incremento fásico de la concentración de DA. Esto sugiere que la actividad tónica y generalizada sobre la actividad muscular es modulada por los receptores D₂ (VI), mientras que el efecto fásico de la DA sobre los receptores D₁ (VD) es el que selecciona a que población de neuronas va a activar (Mink, 1996; Gonon, 1997; Hernández *et al.*, 1997). La denervación dopaminérgica estriatal provoca que se incremente la densidad de los receptores D₂ y la disminución en la densidad de los receptores D₁ (Qin *et al.*, 1994), lo cual trae como consecuencia alteraciones en la funcionalidad de los ganglios basales.

Se ha reportado que los neuropeptidos que se encuentran en ambas vías también son regulados por la DA. Así, cuando aumenta la densidad de receptores D₁ se incrementa la

expresión de sustancia P y dinorfinas; mientras que, cuando aumenta la densidad de receptores D₂ se incrementa la expresión de encefalinas (Missale *et al.*, 1998).

4. *MODELO CON LA 6-OHDA.*

Los estudios con animales experimentales, han sido de gran ayuda para dilucidar los mecanismos básicos que regulan la función neuronal tanto a nivel celular, molecular y conductual. La finalidad de generar estos modelos es recrear algunos de los eventos que suceden en las enfermedades neurodegenerativas que presentan y afectan a los humanos (Anaya, 1997).

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

La 2,4,5-Trihidroxifeniletamina (6-Hidroxidopamina o 6-OHDA) es un análogo hidroxilado de la DA (Blum *et al.*, 2001) fue el primer componente descubierto para inducir la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas (Ungerstedt, 1968). Cuando se administra *in vivo* la toxina causa síntomas parkinsonicos por decremento de los niveles de DA y de la actividad de la enzima TH (Lotharius *et al.*, 1999).

Es incorporada a la neurona por el sistema de recaptura de DA de alta afinidad, actúa inhibiendo el complejo I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM), de este modo reduce la generación de ATP (Glinka *et al.*, 1998; Lotharius *et al.*, 1999) además causa un incremento en la producción de ERO, OH⁻, y H₂O₂ induciendo subsecuentemente la degeneración de las terminales axónicas y de los cuerpos celulares (Otero *et al.*, 1996).

La 6-OHDA no puede cruzar la BHE, por lo que se debe administrar intracerebralmente, se estima que la vida media de la 6-OHDA en condiciones fisiológicas es de 38 minutos (Tirmenstein *et al.*, 2005).

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

Generalmente la administración es unilateral y se puede hacer en el haz medial del cerebro anterior (mfb), SNc o en el estriado. Dependiendo del sitio de inyección, el número de inyecciones y la cantidad de neurotoxina, el animal presenta diferente grado de progresión de la enfermedad, la elección de uno u otro sitio de aplicación depende del objetivo del experimento (Emborg. 2004).

La administración en el mfb induce la pérdida de las células dopaminérgicas en aproximadamente el 85-90% de la SNc, provocando la deafferentación del NE, núcleo acumbens y corteza prefrontal. La degeneración inicia 24 horas después de la administración de la 6-OHDA, y la depleción de DA estriatal se puede apreciar 2 o 3 días después de la inyección (Bertabet *et al.*, 2002).

Por lo anterior el modelo con la 6-OHDA es ampliamente utilizado para reproducir algunos aspectos funcionales de esta patología, así como para evaluar la eficacia del trasplante de células, factores neurotróficos y componentes que promueven la supervivencia de las células dopaminérgicas de la SNc en la EP. La desventaja de este modelo es que no se ha mostrado la formación de “*cuerpos de Lewy*”; si se administra bilateralmente en roedores produce adipisia y afagia derivando en la muerte del animal (Bertabet *et al.*, 2002).

Después de la lesión unilateral en el mfb o en la SNc, el animal presenta giro espontáneo ipsilateral y disminuye su conducta exploratoria espontánea (Ungerstedt, 1971a). La conducta de giro puede ser inducida con la administración de algunas sustancias que activan los sistemas dopaminérgicos (Ungerstedt y Arbuthnott, 1970; Ungerstedt, 1971b).

Una de las sustancias que han sido empleadas para inducir el giro es la apomorfina (agonista dopaminérgico), la cual actúa sobre los receptores en las terminales postsinápticas, produciendo una mayor actividad motora en el lado ipsilateral a la lesión; por lo tanto, el animal tiende a girar hacia el lado donde hay menos efecto de la dopamina o su agonista (Miller y Beninger, 1991), reportándose que si se registran 200 giros o más durante 30 minutos se puede afirmar que la denervación de DA estriatal es de un 95% (Ungerstedt, 1971b; Hefti *et al.*, 1980; Marin *et al.*, 2006).

5. TRATAMIENTOS EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.

Desde que se demostró que la EP se debía a una deficiencia en la liberación de DA estriatal, se han establecido diversos tratamientos farmacológicos con el objeto de minimizar los síntomas de esta enfermedad y mejorar la función de las estructuras involucradas (Kienzl *et al.*, 1999); Sin embargo, hasta el momento, ningún tratamiento ha demostrado de forma fehaciente tener la capacidad de modificar el progreso degenerativo (Mínguez y Escamilla, 2005).

5.1 AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS.

El empleo de agonistas dopaminérgicos procede de su capacidad de activar receptores dopaminérgicos (Martínez *et al.*, 1998). Los agonistas para receptores D₁ no son adecuados terapéuticamente debido a que es más probable desarrollar discinesias que con los agonistas de los receptores D₂. Por lo general, el uso de la mezcla de agonistas para ambos receptores proporciona un mejor control de los síntomas de la EP (Biagio y Bernardi, 2005). Entre los agonistas más empleados en la terapéutica de la EP se encuentran:

- ***BROMOCRIPTINA.***

La 2-Bromo- α -Ergocriptina es un derivado del ácido lisérgico y en 1974 fue propuesto como el primer agonista dopaminérgico para la terapia en la EP (Ramaker *et al.*, 2000). Es utilizada en las etapas iniciales de la EP ya que retarda las alteraciones motoras inducidas por la administración a largo plazo de la L-DOPA (Ramaker *et al.*, 2000; Segura *et al.*, 2003). Sin embargo, induce algunos efectos colaterales como náuseas, vómito, cuadros de confusión, alucinaciones y con el pasar del tiempo se presenta una aparente disminución del beneficio (Molina *et al.*, 1999; Ramarker *et al.*, 2000).

- *ROPINIROL.*

El ropinirol es un indol no ergótico que se asemeja estructuralmente a la DA y presenta afinidad selectiva por receptores dopaminérgicos D₂, y nula o escasa actividad sobre los receptores D₁. El ropinirol se ha analizado en múltiples estudios clínicos, tanto como monoterapia como administrada en combinación con L-Dopa. Reduce el riesgo de aparición de discinesias y consigue mantener al paciente en buena situación funcional. El ropinirol habitualmente se tolera bien, aunque con su administración puede presentar efectos adversos, como náuseas, hipotensión, somnolencia, incremento de las discinesias, confusión y alucinaciones (Vivancos, 2006).

- *APOMORFINA.*

La dihidro-apomorfina o bien Apomorfina (APO) es uno de los agonistas dopaminérgicos más usados en la práctica clínica, actúa en ambas familias de receptores dopaminérgicos. La magnitud de su efecto es equivalente al observado con la administración de L-Dopa oral; sin embargo, aunque su efecto es rápido el beneficio tiene menor duración (su actividad terapéutica máxima oscila entre los 30 y 60 minutos después de la inyección) (Katzenschlager *et al.*, 2005; Obeso *et al.*, 2000b).

Se ha reportado que la inyección intermitente de apomorfina por vía subcutánea es utilizada para controlar los periodos de fluctuaciones “*off*”, inducidos por la L-DOPA (Molina *et al.*, 1999; Radad *et al.*, 2005) y aunque su administración puede ser por diversas vías, produce efectos adversos graves, tales como: hipersalivación, hipotensión, náuseas, vómito y sedación; por lo que su utilidad clínica se ve reducida (Neef *et al.*, 1999).

5.2 L-DOPA.

L-Dopa se forma a partir del aminoácido L-Tiroxina como uno de los pasos intermedios en la síntesis de catecolaminas (Otero, 1996) básicamente ocurren dos reacciones: la primera reacción es catalizada por la enzima TH la cual convierte a la tiroxina a L-3,4-Dihidroxifenilalanina L-DOPA (Bahena *et al.*, 2000), el siguiente paso de

esta transformación es la descarboxilación de la L-DOPA, catabolizada por la enzima descarboxilasa de L-Aminoácidos aromáticos (AADC) produciendo DA (Vallone *et al.*,2000).

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

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

Se ha reportado que después de aproximadamente 10 años de tratamiento la L- DOPA deja de ser efectiva (Wooten, 1990; Biagio y Bernardi, 2005). Los trastornos secundarios que se presentan después de un largo periodo de administración de L-DOPA son:

- Pérdida del efecto al final de la dosis (“*wearing-off*”); es decir, cuando la dosis de L-DOPA no es suficiente para mejorar los síntomas de la enfermedad antes del tiempo indicado para la siguiente dosis. Este fenómeno se presenta en promedio después de 3 o 5 años de su administración.
- Estado efectivo-inefectivo (“*on-off*”), complicaciones que se presentan después de tiempo indefinido e impredecible y consiste en periodos de buena respuesta a la L-DOPA seguido por periodos de poca respuesta a este fármaco (Samadi *et al.*, 2006).

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

5.3 ANTIOXIDANTES.

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

- *VITAMINA E.*

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

- *CO-ENZIMA Q.*

La Co-enzima Q es un co-factor de la cadena respiratoria mitocondrial (captador de electrones del complejo I y II) capaz de mejorar la función mitocondrial e incrementar la producción de ATP, además de poseer funciones antioxidantes (Bonuccelli y Del Dotto, 2006). Se ha reportado que esta enzima se encuentra en bajas concentraciones en los pacientes con EP (Agostinho *et al.*, 2005). Cardoso y cols. (2005), mencionan beneficios significativos a nivel sintomático y mayor recuperación en pacientes con EP que recibieron 360 mg CoQ10 en comparación con aquellos pacientes que solo recibieron placebo.

- **MELATONINA.**

La *N*-acetil-5-metoxitriptamina o Melatonina, es una indolamina producida y secretada por la glándula pineal. Esta sustancia es considerada como mensajero químico de transducción de información de fotoperiodos en el cerebro, mediador de ritmos reproductivos circanuales, ritmo circadiano, hibernación, sueño-vigilia y temperatura (Vaneck, 1998; Boutin *et al.*, 2005; Reiter *et al.*, 2005).

Es sintetizada de forma cíclica a partir de un estímulo luminoso que se transmite por el tracto retino-hipotalámico (TRH) que estimula al núcleo supraquiasmático (NSQ) y posiblemente el núcleo paraventricular (NPV) en el hipotálamo; la señal continúa al cerebro anterior, al cordón espinal y al ganglio cervical superior (GCS); el cual posee proyecciones norepinefrinérgicas que estimulan los receptores α y β de los pinealocitos en la glándula pineal; estas células son las encargadas de sintetizar la melatonina, a partir del triptófano por la enzima triptófano 5-hidroxilasa produciendo 5-hidroxitriptófano (5-HTP); éste a su vez, es convertido en 5-hidroxitriptamina o serotonina (5-HT) por la 5-HTP decarboxilasa. Aquí es donde actúa la enzima limitante para la síntesis de melatonina; la serotonina *N*-acetiltransferasa (NAT) (la cual, en la fase oscura se incrementa de 30 a 70 veces), convierte la serotonina en *N*-acetilserotonina (NAS). Finalmente, la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) convierte la NAS en melatonina (García, 2008) (Figura 5).

La melatonina se metaboliza en el hígado, por hidroxilación en 6-hidroximelatonina; posteriormente se conjuga con ácido glucurónico y ácido sulfúrico y se excreta por la orina en forma de su principal metabolito 6-sulfatohidroximelatonina (Rufo, 2002).

En adultos jóvenes se libera durante la noche, siendo la mayor secreción (260 pmol/L) entre las 12 de la noche y las dos de la madrugada y las mínimas (40 pmol/L) entre el medio día y las dos de la tarde observando además que su concentración disminuye con la edad (Simonneaux y Ribelayga, 2003).

En humanos, la administración oral de 2 y 4 mg de melatonina tiene una vida media de aproximadamente 1 hora y su biodisponibilidad es de tan solo 15% aproximadamente, el otro 85% es metabolizado en el hígado (De Muro *et al.*, 2000).

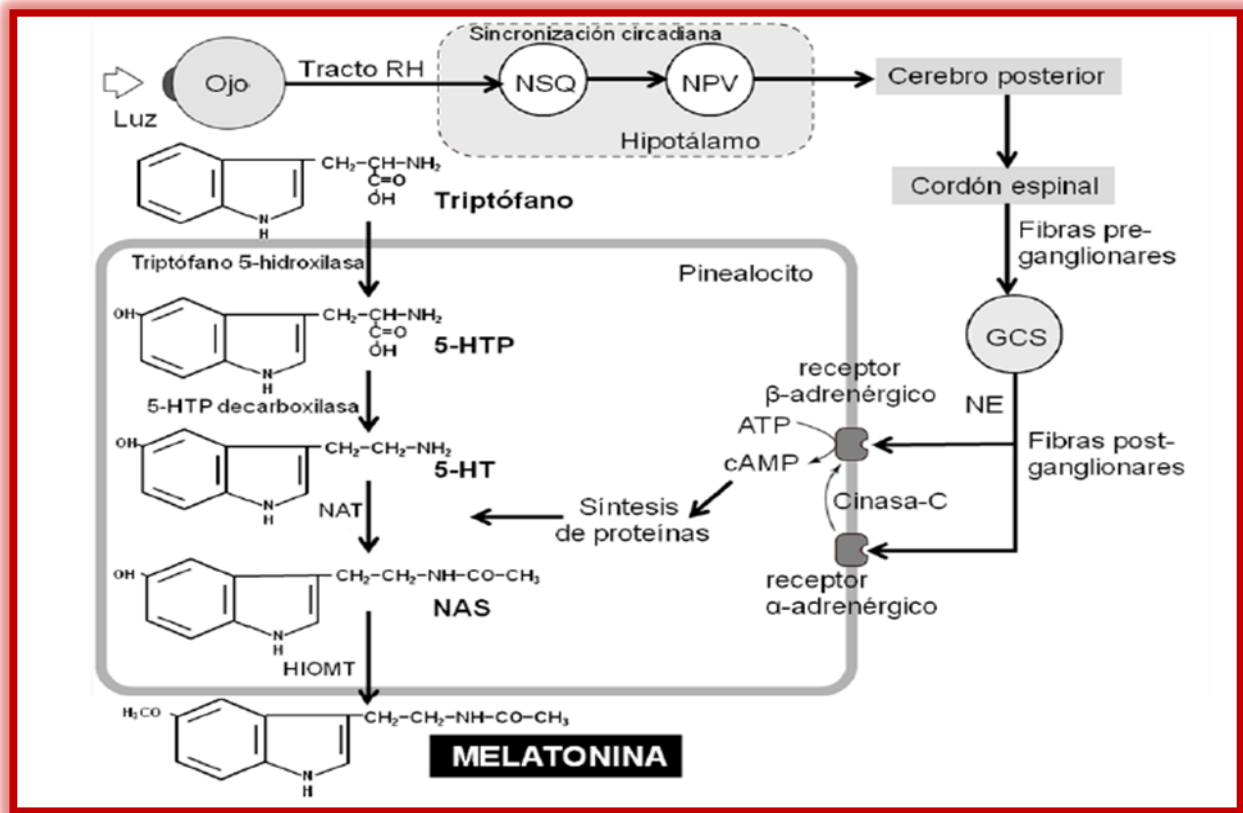


Figura 5. Síntesis de melatonina. Modificado de Arendt *et al.*, 1998.

Hasta el momento se han identificado tres tipos de receptores a melatonina todos acoplados a proteínas G: MT1, MT2 y MT3 (León *et al.*, 2004; Weil *et al.*, 2006), Los receptores MT3 presentan la enzima quinona reductasa 2 la cual puede participar en la protección contra estrés oxidativo por la reducción de quinonas (Seithikurippu *et al.*, 2008).

Una de las principales características fisicoquímicas de la melatonina es su capacidad de difusión; se trata de una molécula altamente lipofílica capaz de atravesar cualquier membrana celular, de manera que puede actuar en todos los niveles celulares (Costa *et al.*, 1995).

6. NEUROGÉNESIS.

“En los cerebros adultos las vías nerviosas son algo fijo, terminado, inmutable. Todo puede morir, nada puede regenerarse”.

Ramón y Cajal

Como neurogénesis adulta se conoce al proceso de formación de nuevas neuronas, comprende desde las señales que inducen la división de la célula precursora hasta su diferenciación y establecimiento definitivo a redes preexistentes como neurona funcional (González, 2010).

Las áreas del cerebro capaces de formar nuevas neuronas se conocen como regiones neurogénicas. En el cerebro adulto de mamíferos hay dos regiones neurogénicas claramente definidas:

- Neuroblastos que nacen en la zona subventricular (SVZ), subyacente al linaje endodermal de los ventrículos laterales (VL), migran a través de la vía rostral migratoria (VRM) hacia el bulbo olfatorio (BO) en donde se diferencian en interneuronas (Figura 6).
- Neuroblastos en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado (GD) que migran dentro de la capa granular adyacente para convertirse en neuronas granulares (González, 2010) (Figura 6).

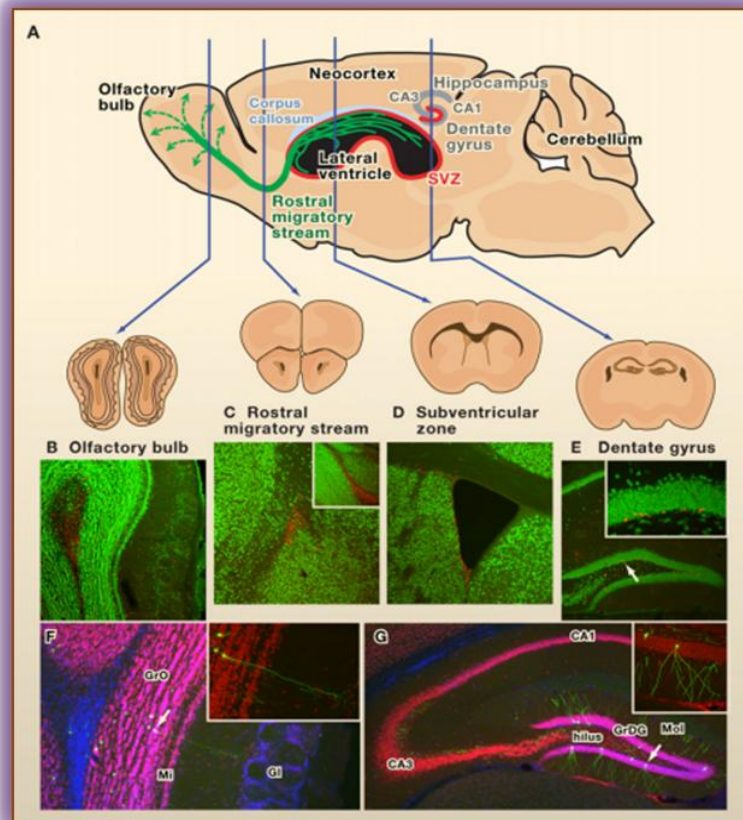
En ambas regiones se producen nuevas interneuronas de forma constante durante toda la vida (Kempermann, 2006). La capacidad neurogénica fuera de estas dos regiones es una cuestión muy controvertida; sin embargo, investigaciones reportan que dicho proceso podría ocurrir en la corteza (Altman, 1963; Kaplan, 1981), estriado (Bedard *et al.*, 2002; Dayer *et al.*, 2005), amígdala (Bernier *et al.*, 2002) y SNc (Lie *et al.*, 2002).

Figura 6. Neurogénesis en el cerebro de roedores adultos.

A. Vistas de cortes sagitales y coronales del cerebro de ratón en áreas donde ocurre la neurogénesis. Las áreas rojas indican las zonas germinales en el cerebro de mamíferos adultos: la SGZ del GD del hipocampo y la SVZ de los VL, las neuronas generadas en la SVZ migran a través de la VRM para incorporarse dentro del BO.

B-E. Neurogénesis revelada por incorporación de BrdU en el BO (B) VRM (C) SVZ (D) y GD (E). Los colores indican: Rojo (BrdU) y verde (NeuN).

F-G. Nuevas neuronas en el BO y el GD marcado con retrovirales mediante la expresión de la proteína verde fluorescente. Vista de las células marcadas por una flecha, los colores indican: rojo (NeuN) verde (GFP) azul (DAPI). Tomado de Zhao *et al.*, 2008



6.1 COMPOSICIÓN DE REGIONES NEUROGÉNICAS.

Los factores que diferencian a las regiones neurogénicas y no neurogénicas en el cerebro adulto son diversos, estos afectan a los precursores y la permisividad del nicho (Suhonen *et al.*, 1996).

Si bien, las regiones no neurogénicas contienen *precursores* (células capaces de dividirse y/o altamente indiferenciadas pero no conservan la capacidad de autorrenovación ilimitada (Palmer *et al.*, 1999; Kondo y Raff, 2000; Kempermann, 2006), éstos no están organizados en grupos y carecen del microambiente permisivo necesario para la formación de neuronas. Este microambiente permisivo (también conocido como nicho de las células madre o nicho germinativo) consta de varios componentes (Kempermann, 2006):

- Las **células madre** (de naturaleza astrocitaria) se caracterizan por ser capaces de autorrenovarse ilimitadamente y ser multipotenciales; es decir, poseer la capacidad de diferenciarse en, al menos, dos tipos celulares diferentes (McKay, 1997; Van der Kooy y Weiss, 2000; Weissman *et al.*, 2001).

La capacidad de autorrenovación a su vez, integra dos propiedades: el control de la proliferación y el mantenimiento del estado indiferenciado (Foshay y Gallicano, 2007; Li y Zhao, 2008; Zhong y Chia, 2008). Dichas propiedades están reguladas por dos moléculas: Noggin/BMPs (Proteína Morfogenética del hueso por: *Bone Morphogenic Proteins* y Notch -Conover y Allen, 2002-). Las cascadas de señalización en las que participan estas proteínas determinan que las células madre se mantengan como tales y proliferen, o salgan del ciclo y se diferencien a linaje glial o neuronal (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 2000).

- Los **astrocitos** desempeñan funciones importantes para el nicho. Tanto en el hipocampo como en el BO se ha demostrado que las células madre son astrocitos (Doetsch *et al.*, 1999a,b; Seri *et al.*, 2001; Merkle *et al.*, 2004), pero en estas regiones existen también otras poblaciones de astrocitos sin potencial neurogénico que favorecen la formación de neuronas (Song *et al.*, 2002); se ha comprobado que dichos astrocitos intervienen en las diferentes etapas de la neurogénesis adulta (Ma *et al.*, 2005). Esta es una habilidad de la que carecen el resto de astrocitos del encéfalo y es de tal magnitud, que incluso favorecen la neurogénesis a partir de precursores en otras regiones, como la médula espinal o la SNc (Shihabuddin *et al.*, 2000; Lie *et al.*, 2002).
- La **microglía** parece tener un papel dual en la regulación de la neurogénesis. Por una parte, la inhibe al producir sustancias como la Interleucina 6 (Mehler *et al.*, 1995; Bonni y Greenberg, 1997; Vallieres *et al.*, 2002). Por otra, al producir neurotrofinas, podría tener también una función trófica (Battista *et al.*, 2006; Walton *et al.*, 2006). Estos componentes celulares del nicho secretan moléculas que actúan de forma paracrina y/o autocrina promoviendo la neurogénesis.

- Los **vasos sanguíneos** (Palmer et al., 2000) producen moléculas como el VEGF (Factor de crecimiento del endotelio vascular, por: *vascular endothelial growth factor*) que contribuirían a la homeostasis de las células madre (Jin et al., 2002; Fabel et al., 2003; Cao et al., 2004; Schanzer et al., 2004), y por ello se les considera componentes esenciales del nicho. Los precursores de las regiones neurogénicas adultas se encuentran íntimamente relacionados con ellos, ya que los precursores emiten un proceso que contacta directamente con los vasos (Filippov et al., 2003; Mirzadeh et al., 2008), lo que ha dado lugar a la teoría del “nicho vascular” (Palmer et al., 2000), en donde las células madre recibirían señales reguladoras mediante factores solubles y moléculas de la matriz extracelular (Leventhal et al., 1999; Mercier et al., 2002; Shen et al., 2004).

6.2 FACTORES EFECTORES DE LA NEUROGÉNESIS.

En su conjunto, la neurogénesis está regulada por múltiples factores tanto extrínsecos como intrínsecos, que intervienen en las diferentes etapas del proceso. Entre estos factores destacamos:

- **EDAD.**

Aunque la neurogénesis persiste en el GD y el BO a través de la vida adulta, la tasa de producción neuronal declina con la edad (Seki y Arai, 1995; Kuhn et al., 1996; Enwere et al., 2004). El declive es atribuido a la reducción de la proliferación o bien a la disminución de células progenitoras, aunque evidencias también indican un decremento en la tasa de maduración (Rao et al., 2005).

Las alteraciones relacionadas con la edad en los microambientes celulares afectan de manera significativa la capacidad de respuesta de los progenitores celulares para la estimulación neurogénica (Lichtenwalner y Parent, 2006).

- *FACTORES NEUROTRÓFICOS.*

Los factores neurotróficos son proteínas producidas por diferentes tipos celulares que actúan sobre el sistema nervioso, dentro de los cuales se encuentran: El NGF (Factor de crecimiento nervioso por: *Nerve Growth Factor*), al BDNF (Factor neurotrófico derivado del cerebro por: *Brain Derived Neurotrophic Factor*) y a las neurotrofinas 3, 4 y 5 (González, 2010).

En general, actúan mediante dos vías: por un lado, promueven la supervivencia de neuronas postmitóticas y el crecimiento de dendritas, mediante la activación de receptores Trk (quinasas tirosinas) (Altar *et al.*, 1998; Caleo *et al.*, 2000) y por otro, desencadenarían la apoptosis uniéndose con baja afinidad al receptor p75 (Coulson *et al.*, 2004). Además, regulan el mantenimiento del fenotipo neuronal, la sinaptogénesis y protege a las neuronas de determinadas situaciones patológicas como la muerte por apoptosis y la acción de diferentes tóxicos (González, 2010).

- *HORMONAS*

Las hormonas son reguladores potenciales del proceso neurogénico, las fluctuaciones cíclicas que sufren los niveles de hormonas sexuales corresponden con transiciones en los eventos neurogénicos (Lenington *et al.*, 2003). De hecho, se ha observado la existencia de dimorfismo sexual en las zonas neurogénicas del cerebro adulto de roedores (Peretto *et al.*, 2001). Concretamente, la testosterona y el estradiol modulan la supervivencia y la integración de las células de nueva generación (Nordeen y Nordeen, 1989; Rasika *et al.*, 1994; Hidalgo *et al.*, 1995; Johnson y Bottjer, 1995).

Por otro lado, se ha descrito que el estradiol modula la función hipocampal a través del incremento en la proliferación neuronal en roedores (Tanapat *et al.*, 1999). Efecto similar lo ejercen la prolactina y las hormonas tiroideas en la ZSV (Lenington *et al.*, 2003), mientras que la progesterona y los glucocorticoides tienen el efecto contrario, de modo que provocan la disminución de la tasa de proliferación en el hipocampo y en la ZSV respectivamente (Sapolsky, 1999; Giachino *et al.*, 2004).

- ***NEUROTRANSMISORES.***

Se ha demostrado que algunos neurotransmisores influyen en la regulación de la neurogénesis adulta. Entre estas moléculas destacan la DA, acetilcolina, serotonina, y glutamato. Todos ellos inducen aumento en la tasa proliferativa (Cardenas *et al.*, 2005; Hagg, 2005; Ming y Song, 2005). El óxido nítrico; sin embargo, parece que ejerce un papel inhibitorio en la regulación de la proliferación celular, probablemente a través del bloqueo de los receptores para el EGF (factor de crecimiento epidermal por: *Epidermal Growth Facto*) (Matarredona *et al.*, 2005; Torroglosa *et al.*, 2007). Por otro lado, algunas de estas moléculas también ejercen su efecto sobre la supervivencia de las células, como la serotonina, papel que lleva a cabo a través del BDNF como mediador (Banasr *et al.*, 2004; Mattson *et al.*, 2004).

7. JUSTIFICACIÓN.

Debido a que la EP es causada por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNc y a que este fenómeno es continuo y acumulativo, es de vital importancia prolongar la sobrevivencia de estas neuronas y conocer cómo responden a los tratamientos farmacológicos. Investigaciones de nuestro laboratorio han mostrado que en animales con la inyección unilateral de 6-OHDA en el mfb y el empleo crónico de L-Dopa induce la muerte de las neuronas remanentes, mientras que la coadministración de L-Dopa/Melatonina aumenta la presencia de neuronas dopaminérgicas, pero de estas se desconoce si son neuronas que recuperan su fenotipo (producción de enzima TH) o son neuronas de nueva creación. Determinar este punto permitirá abrir nuevas posibilidades para mejorar las futuras aplicaciones farmacológicas para pacientes con EP.

8. OBJETIVOS.

8.1 GENERAL.

- Evaluar el efecto de L-Dopa, Melatonina y la coadministración de L-Dopa/Melatonina sobre la neurogénesis de neuronas dopaminérgicas en la SNc de ratas con inyección unilateral de 6-OHDA en mfb.

8.2 PARTICULAR.

- Determinar y comparar el número de neuronas inmunorreactivas a TH remanentes en la SNc ipsilateral y contralateral de ratas con y sin tratamiento farmacológico mediante métodos inmunohistoquímicos.
- Determinar y comparar el número de neuronas inmunorreactivas a TH/BrdU en la SNc ipsilateral y contralateral de ratas con y sin tratamiento farmacológico mediante métodos inmunohistoquímicos.

9. MATERIALES Y METODOS.

9.1 ANIMALES .

Se utilizaron 30 ratas macho de la cepa Wistar con un peso inicial de 160 a 180gr. mantenidas en condiciones de laboratorio con foto-periodo 12/12h (luz-obscuridad) con acceso libre a agua y alimento.

9.2 LESIÓN.

Las ratas se lesionaron quirúrgicamente: se anestesiaron por vía intraperitoneal (IP) con una dosis de 35mg/kg de peso de pentobarbital sódico. Posteriormente fueron fijadas en un aparato estereotaxico para ser lesionadas unilateralmente (lado izquierdo) en el mfb. Se realizó el trepano con un taladro pequeño (mototool, Dremel) en la posición específica respecto a Bregma AP=-3, L=1.6, V=-8.0 a partir de la dura madre de acuerdo a Paxinos y Watson (1986). Se inyectó en esta zona por medio de una jeringa Hamilton acoplada a una micropipeta de vidrio de diámetro entre 50 y 100µm la dosis de 4µl de solución vehículo (solución salina al 0.9% y ácido ascórbico 1%) con 8µg de 6-OHDA (H4381, Sigma) (Truong, 2006).

9.3 GIRO INDUCIDO.

Dos días posteriores a la lesión se les administró a los animales una dosis de apomorfina (A4393, Sigma) de 0.25mg/kg por vía IP. Para evaluar el giro inducido, se colocó una rata a la vez, en caja de acrílico transparente de 60X50cm y se registró el número de giros que de cada rata hacia el lado contralateral a la lesión (derecho). Se tomaron para el estudio las ratas que giraron 200 o más veces en un periodo no mayor a 30 minutos, pudiendo repetir la prueba por dos ocasiones consecutivas (cada 24 horas). Las ratas no lesionadas correctamente no se emplearon, los grupos se formaron incluyendo 6 ratas por grupo.

9.4 TRATAMIENTO.

Después de 24 horas del giro inducido, se inicio la administración de los tratamientos farmacológicos particulares por grupo durante 60 días (Tabla 1). Los fármacos se administraron oralmente mediante una jeringa de 1ml sin aguja. Cabe mencionar que aquellos grupos a los que se les administro L-Dopa se diluyo en agua. Por otra parte, al grupo IV se le administro Melatonina (M5250, Sigma) con Cerelac de Nestlé® en proporción 1:1 diluido con un poco de agua.

GRUPO	INYECCIÓN EN LE HAZ MEDIAL	TRATAMIENTO
Grupo I	Salina-ácido ascórbico	-----
Grupo II	6-OHDA	-----
Grupo III	6-OHDA	7.5mg/kg de L-Dopa
Grupo IV	6-OHDA	10mg/kg de Melatonina
Grupo V	6-OHDA	7.5mg/kg de L-Dopa + 10mg/kg de Melatonina

Tabla 1. Protocolo de tratamiento

9.5 ADMINISTRACIÓN DE BrdU.

Para los estudios de proliferación celular se administró 5-Bromo-2-desoxiuridina (BrdU) (B5002, Sigma); este es un nucleótido sintético análogo de la Timina que se incorpora al ADN celular durante los procesos de replicación (fase S de mitosis). Se administró en una dosis de 50 mg/kg de por vía IP cada tercer día durante las primeras dos semanas del tratamiento (8 inyecciones en total por rata) para la marcación de neuronas de nueva creación.

9.6 PERFUSIÓN INTRACARDIACA.

Al finalizar el tiempo de aplicación de los tratamientos se sacrificaron los animales mediante perfusión intracardiaca vía aórtica; inicialmente pasando solución salina isotónica (0.9 NaCl) seguida de fijador: Paraformaldehído al 2% en buffer de fosfatos salinos (PBS 0.1 M, p-H. 7.4) (Ávila *et al.*, 2006) (Apéndice 1). Ya perfundidos se extrajeron los cerebros y se colocaron en fijador. Posteriormente se realizaron cortes coronales de 50 µm con un vibratomo (Pelco 101 de Ted Pella Inc.) para tomar rebanadas de mesencéfalo conteniendo la SNc ipsilateral y contralateral a la lesión con el fin de procesarlos con la técnica de inmunocitoquímica para TH y BrdU.

9.7 PRUEBAS INMUNOHISTOQUÍMICAS.

Una vez montados los cortes en portaobjetos gelatinizados se deshidrataron con alcoholes en concentraciones crecientes (60%, 70%, 80%, 90%, 96%) diez minutos en cada uno y 3 cambios en alcohol de 100% de 10 minutos. Se realizó el análisis inmunohistoquímico para el conteo de neuronas inmunorreactivas a TH (PB153, Millipore) (Apéndice 2) y BrdU (Apéndice 3) en la SNc ipsilateral y contralateral a la lesión en 6 cortes coronales por cerebro.

Las fotografías fueron tomadas con ayuda de una cámara (Moticam 1000 de Motic y software Motic Images Plus 2.0ML) acoplada a un microscopio óptico (Nikon). El análisis estadístico utilizado fue ANOVA con el Software GraphPad Prism 4.

10. RESULTADOS.

10.1 CONTEO DE NEURONAS INMUNORREACTIVAS A TH.

Se analizó el efecto de la administración de L-Dopa, melatonina y su co-administración sobre la expresión de la enzima TH en las neuronas de la SNc en el lado ipsilateral y contralateral a la lesión.

Como se muestra en la Grafica 1 el grupo sham no muestra diferencias significativas en el número de neuronas TH+ entre el lado contralateral e ipsilateral a la lesión (promedio de 77.40 y 92.26 respectivamente); es decir, la inyección de la solución vehículo no tiene efecto significativo sobre el número de neuronas inmunorreactivas a TH en la SNc (Figura 7).

Cuando se administró la neurotóxina 6-OHDA se observa pérdida importante del número de neuronas TH del lado ipsilateral en todos los grupos con respecto al grupo sham (6-OHDA (86.56%) L-Dopa (82.64%) melatonina (88.21%) combinación (84.97%)), mostrando una vez más el potencial de esta neurotóxina para la depleción de neuronas dopaminérgicas (Grafica 1, Figura 7).

Respecto al lado contralateral a la lesión, el grupo lesionado con 6-OHDA no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo sham presentando en promedio 58.88 neuronas TH. Mientras que, los grupos tratados con L-Dopa (42.27 neuronas TH en promedio) y la combinación terapéutica (52.64 neuronas TH en promedio) si presentaron diferencias significativas al compararlos con el grupo sham, mostrando un menor número de neuronas inmunorreactivas a TH; lo cual implica que, posiblemente la administración de L-Dopa inhibe la expresión de la enzima TH de manera bilateral. Esta hipótesis puede ser corroborada al observar al grupo tratado con melatonina, pues no mostro diferencias significativas en el número de neuronas TH (promedio de 68.16) en el lado contralateral a la lesión con respecto al grupo sham indicando que hay un número similar de neuronas inmunorreactivas a TH en ambos grupos. Sin embargo, hay un aumento significativo del número de neuronas por corte con respecto al grupo tratado con L- Dopa, por lo que podemos inferir, que hay un mecanismo favorecido por la melatonina para la activación de esta enzima o que el fármaco puede proteger a las neuronas evitando su muerte (Grafica 1, Figura 7).

En el lado Ipsilateral a la lesión no existen diferencias estadísticamente significativas en los grupos lesionados con 6-OHDA con y sin tratamiento, lo cual nos indica que el daño patológico influye de manera significativa en el número de neuronas TH a pesar de los diferentes tratamientos (Grafica 1).

10.2 CONTEO DE NEURONAS INMUNORREACTIVAS A BrdU/TH.

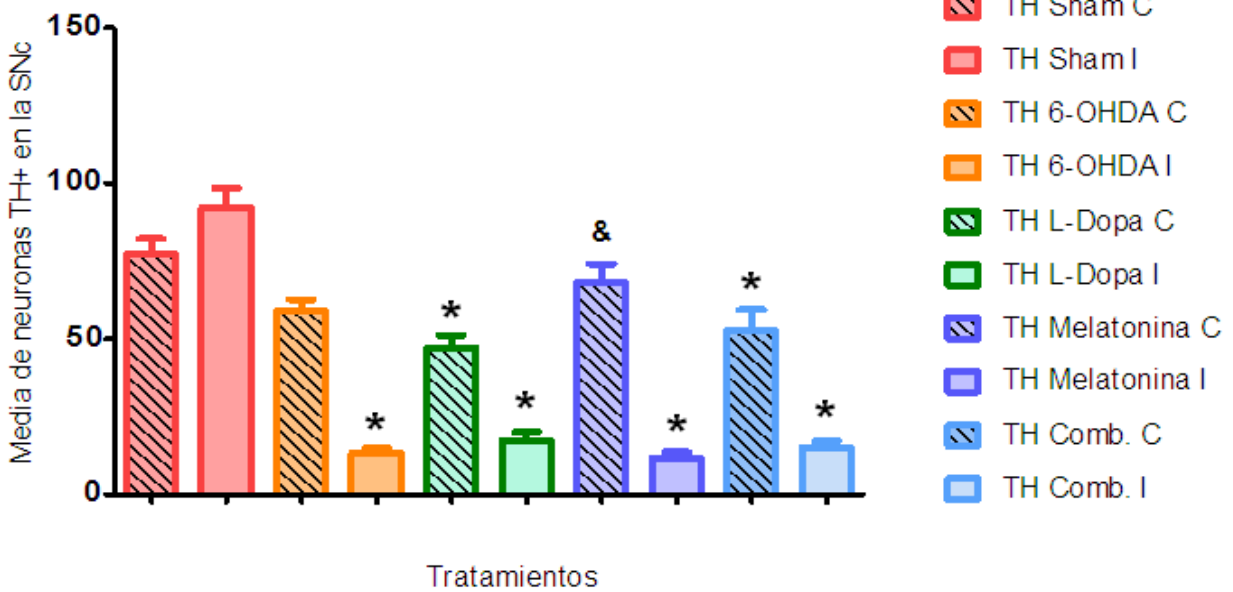
Con la finalidad de establecer cuantas de las neuronas que expresaban TH podría ser neuronas de nueva creación, se contabilizo el número de células inmunorreactivas a TH que co-expresaran BrdU en el lado Ipsilateral y contralateral a la lesión; cabe mencionar que dichas neuronas solo eran consideradas positivas si mostraban un clara delimitación del soma con la marca Inmunorreactiva a BrdU en el núcleo, no en el citoplasma (Ejem. Figura 8).

En la SNc del lado contralateral a la lesión no se mostraron diferencias significativas de células BrdU/TH positivas entre los diferentes grupos lesionados con y sin tratamiento (sham (7.60) 6-OHDA (12.69) L-Dopa (12.11) melatonina (9.58) y combinación (6.57) en promedio). Sin embargo, cabe destacar que los animales lesionados con 6-OHDA y tratados con L-Dopa presentan una tendencia a la presencia de células BrdU/TH positivas (Grafica 2).

En el lado Ipsilateral a la lesión el número de neuronas inmunorreactivas a BrdU/TH fue significativamente mayor en el grupo tratado con la combinación terapéutica mostrando en promedio 32.11 neuronas con la doble marca con respecto al grupo sham (15.22 neuronas promedio) y al grupo tratado con melatonina (14.12 neuronas). No mostraron diferencias significativas con respecto al grupo lesionado con 6-OHDA y el tratado con L-Dopa (promedio de 19.06 y 24.03 neuronas respectivamente) (Grafica 3).

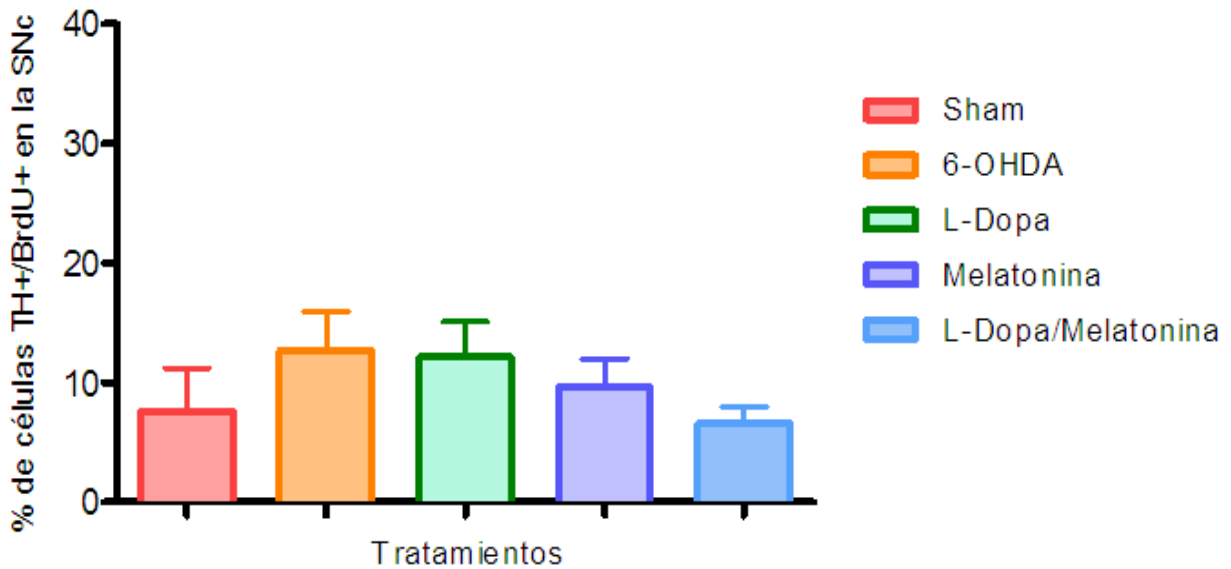
Cabe destacar que el número de neuronas con doble marca siempre fue superior en el lado ipsilateral a la lesión donde los promedios fluctuaron entre 14.12 y 32.11 neuronas con doble marca por corte, mientras que en el lado contralateral el promedio máximo llego a 12.69 (grupo lesionado con 6-OHDA).

Células inmunorreactivas a TH en la SNc

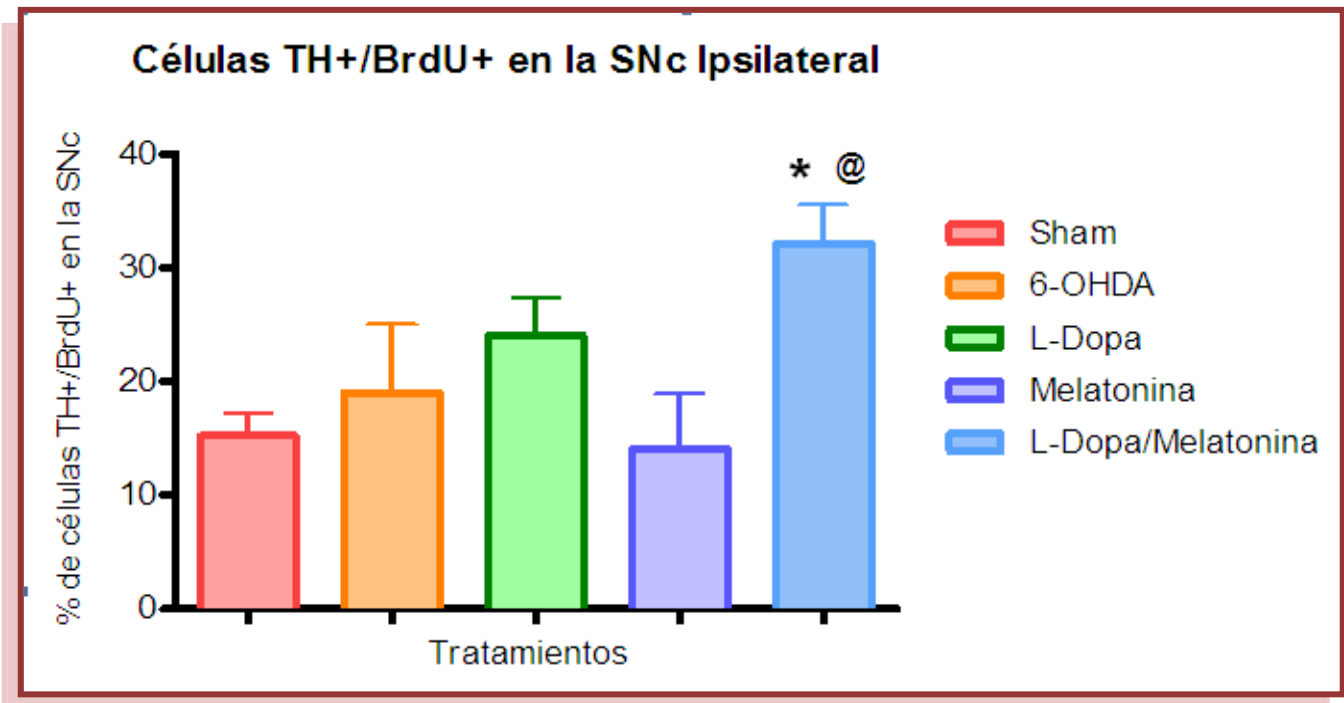


Grafica 1. Media de neuronas inmunorreactivas a TH por corte en la SNc de ratas lesionadas con 6-OHDA en los diferentes tratamientos. I=ipsilateral, C=contralateral, *=Grupos experimentales vs Sham, &=Melatonina vs L-Dopa. P<0.05.

Células TH+/BrdU+ en la SNc Contralateral



Grafica 2. Porcentaje de células inmunorreactivas a TH/BrdU en la SNc del lado contralateral a la lesión en los grupos con y sin tratamiento. P<0.05.



Grafica 3. Porcentaje de células inmunorreactivas a Brdu/TH en la SNc del lado Ipsilateral a la lesión en los grupos con y sin tratamiento. *=Grupos experimentales vs Sham, @=L-Dopa/Melatonina vs Melatonina. P<0.05.

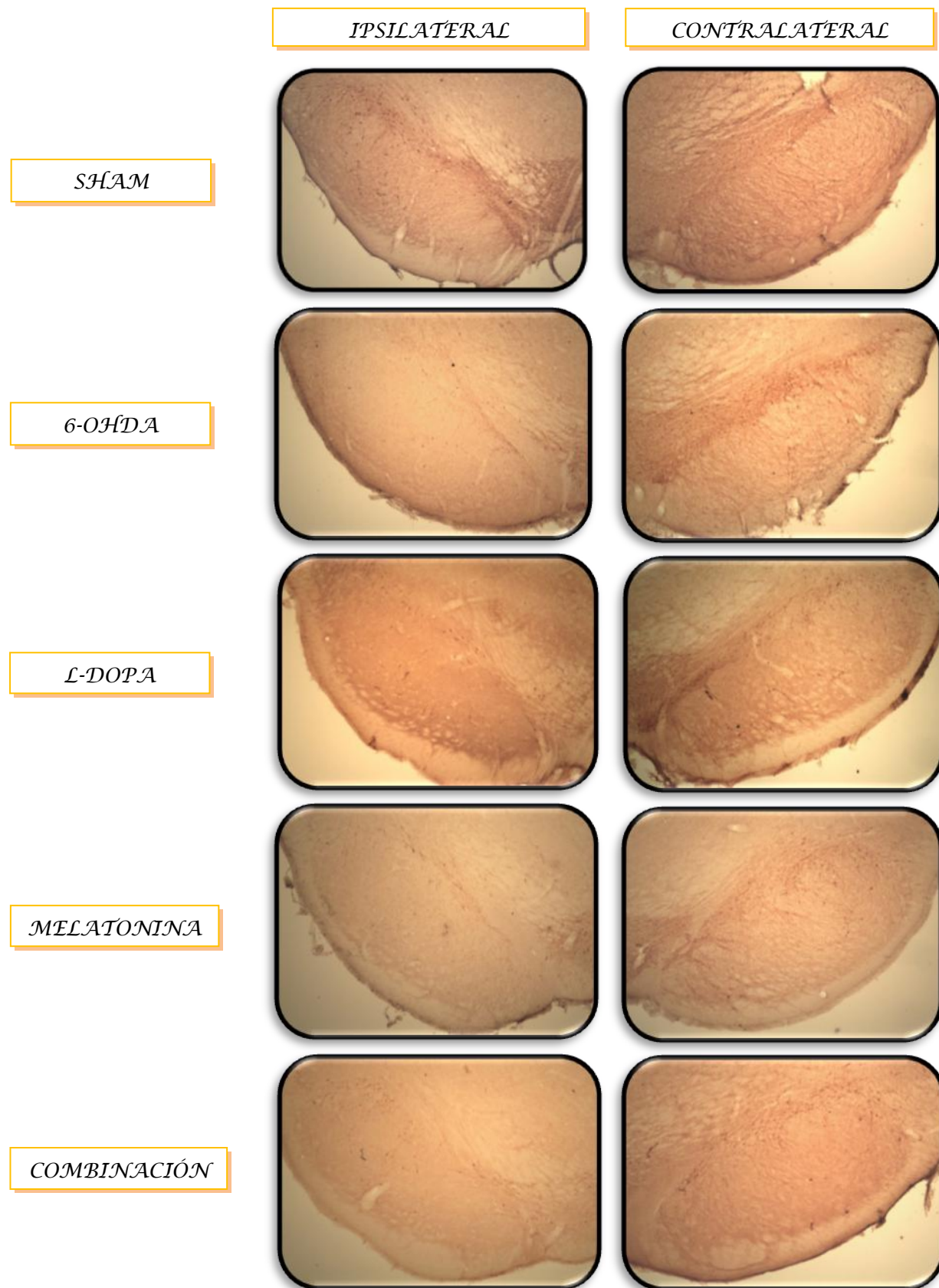


Figura 7. Micrografías 10X de neuronas inmunorreactivas a TH en la SNc del lado ipsilateral y contralateral a la lesión en los grupos con y sin tratamiento.

CÉLULAS INMUNORREACTIVAS A BRDU/TH EN LA SNC

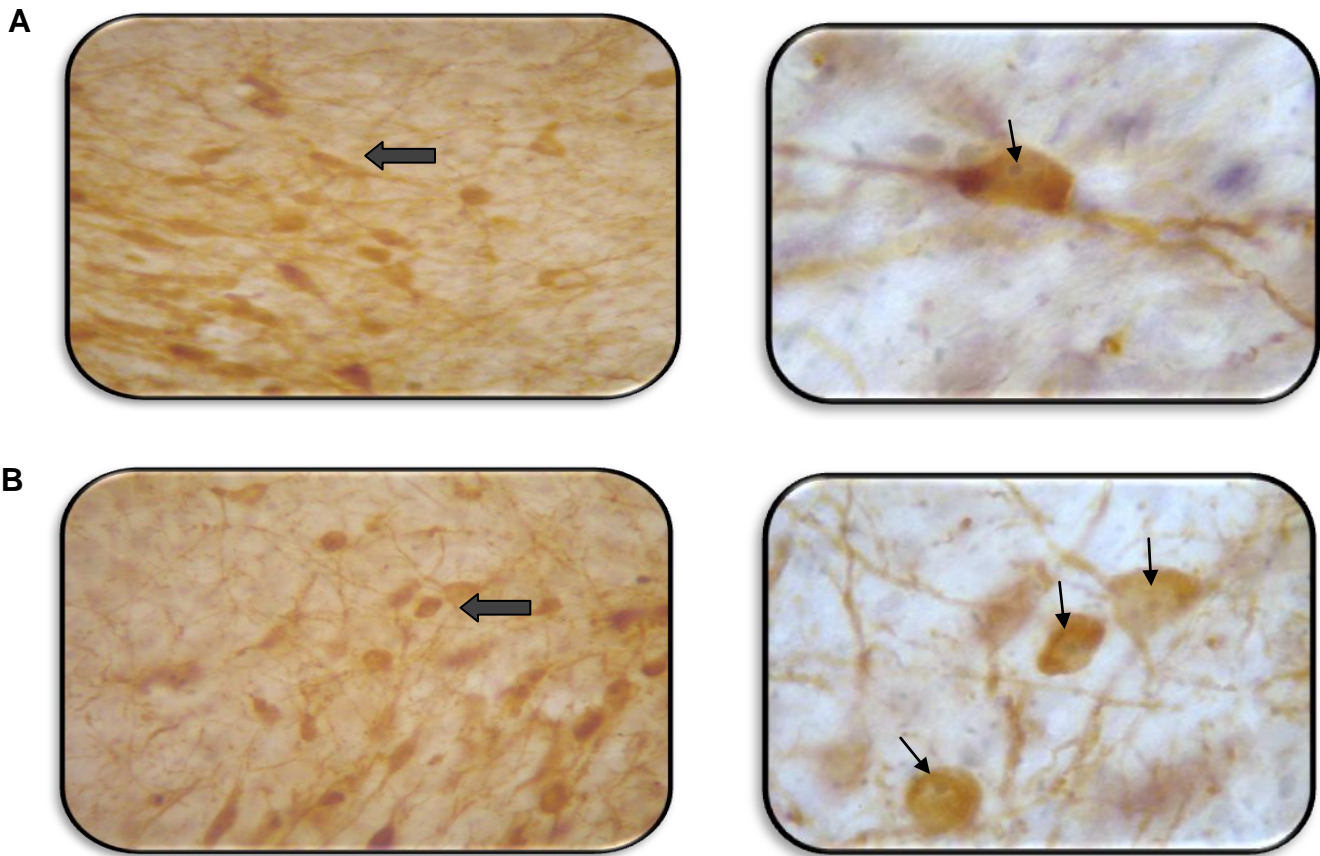


Figura 8. Micrografías de neuronas inmunorreactivas a Brdu/TH en la SNc (40X y 100X respectivamente). Ipsilaterales del grupo tratado con L-Dopa (A) e Ipsilaterales del grupo tratado con L-Dopa/Melatonina (B). Las flechas gruesas indican la neurona o el grupo de neuronas al que se le tomo un acercamiento, las flechas delgadas indican la marca inmunorreactiva a BrdU en el núcleo de neuronas TH.

11. DISCUSIÓN.

11.1 NEURONAS INMUNORREACTIVAS A TH EN LA SNC.

Con respecto al número de neuronas inmunorreactivas a TH en la SNC, se observó que en todos los grupos el mayor número de neuronas con la expresión de esta enzima se presentó en el lado contralateral a la lesión.

Un mayor número de neuronas dopaminérgicas remanentes en el lado contralateral es un fenómeno previamente descrito y confirmado por varios trabajos, se considera que la toxina al ser inyectada unilateralmente solo afectara al lado ipsilateral; sin embargo, estudios de nuestro laboratorio han mostrado que el lado contralateral se ve afectado con el paso del tiempo después de hacer la inyección de 6-OHDA unilateralmente en el mfb (Avila *et al.*, 2006).

La preservación de neuronas dopaminérgicas del lado contralateral a la lesión puede ser debido a que hay una regulación dinámica en la síntesis de TH; cuando un hemisferio es dañado un mecanismo de comunicación permite esta modificación compensatoria en el lado contralateral. En estudios realizados por Kozłowski y cols. (2004) demuestran que en la SNC contralateral a la lesión se han encontrado niveles de TH más altos que en animales control.

Ahora bien, a los grupos a los que se les administro L-Dopa presentaron un menor número de neuronas inmunorreactivas a TH en el lado contralateral a la lesión, por lo cual podríamos inferir que existe uno o varios mecanismos activados por la L-Dopa que inhiben la expresión de esta enzima, o que favorecen la muerte neuronal.

En este sentido, se ha descrito que la L-Dopa produce estrés oxidativo por dos vías: Incrementa la degradación de DA por acción de la MAO-A generando H_2O_2 (Maratos *et al.*, 2003) y la autooxidación de la L-Dopa a DA que resulta en la producción de H_2O_2 , O_2 , OH y quinones (Luo y Roth, 2000). Por lo que se ha propuesto que la pérdida neuronal puede ser causada por mecanismos de oxidación durante el metabolismo de la L-Dopa.

Diversas investigaciones sugieren que la cantidad disponible de DA además de servir como neurotransmisor actúa como neurotoxina lo que propiciaría su participación en procesos de neurodegeneración. En estudios *in vitro* de células expuestas a altas dosis de DA se ha encontrado que la DA es capaz de producir muerte neuronal apoptótica caracterizada por condensación y fragmentación nuclear, decrementa los niveles de GSH e incrementar los niveles de Ca^{++} intracelular en las neuronas, estos efectos de la DA pueden ocurrir *in vivo* bajo condiciones de estrés oxidativo (similares a las inducidas por la presencia de L-Dopa) de tal manera que podrían potenciar la muerte celular (Luo y Roth, 2000).

Ahora bien, la SNc es especialmente vulnerable al daño por ERO, posee altas concentraciones de hierro que podrían reaccionar con la DA del sistema y provocar la inducción de formas hidrolizadas de los productos de la DA, de igual manera, se ha reportado que la L-Dopa estimula la peroxidación lipídica en sistemas *in vitro* (Maharaj *et al.*, 2005) por lo que es fácil inferir que este fármaco produciría un estado alterado en el balance oxidativo en la SNc.

Es por lo anterior que la administración de un antioxidante podría mejorar o retardar el curso de la muerte neuronal en la EP. Nuestros resultados muestran un número similar de neuronas inmunorreactivas a TH en la SNc del lado contralateral en ratas tratadas con melatonina con respecto al grupo control y un mayor número de neuronas con respecto al grupo tratado con L-Dopa; lo cual nos indica que dicho fármaco ayuda a la expresión de la enzima TH y/o a la sobrevivencia neuronal, efecto contrario al presentado por la L-Dopa. Estos resultados pueden estar influidos en gran medida por las acciones antioxidantes de la melatonina. De este modo, la melatonina actuaría sobre los RL formados a partir de la 6-OHDA (Singh *et al.*, 2006) e incluso los producidos por la L-Dopa (Rocchitta *et al.*, 2006).

Existe una amplia evidencia acerca de la capacidad antioxidante de la melatonina. Estudios en nuestro laboratorio muestran que el tratamiento con melatonina es capaz de disminuir las alteraciones producidas por la administración intracerebral unilateral de 6-OHDA; el efecto se caracteriza por recuperación en el desempeño de actividades motoras, mayor sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas en la SNc, menor número de botones sinápticos con edema y mayor prevalencia de contactos sinápticos con

espinas, así como normalización en los niveles de peroxidación de lípidos en el núcleo estriado (Gutiérrez, 2007).

Reiter y cols. (2003) describe los efectos antioxidantes de la melatonina y los divide en acciones directas e indirectas. Dentro de la primera categoría esta la cualidad de la melatonina como barredor de RL (Tan *et al.*, 2002) y ERO; produciendo los compuestos 3-hidroximelatonina y 6-hidroximelatonina quienes a su vez, muestran tener potencial como barredores de RL (Tan *et al.*, 2003; López *et al.*, 2003). Dentro de las acciones indirectas de la melatonina se encuentran: estimulación de enzimas antioxidantes (Reiter *et al.*, 2000 a,b,c; Rodríguez *et al.*, 2004), sinergismo con otros antioxidantes (Gitto *et al.*, 2001 a,b,c) y protección a enzimas antioxidantes frente al daño por estrés oxidativo (Mayo *et al.*, 2002, 2003).

Este y muchos otros efectos protectores que se le atribuyen a la melatonina son debidos no solo, a su alta capacidad como antioxidante, sino también a que estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que la melatonina puede regular la homeostasis mitocondrial, incrementando la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial en el complejo I y IV donando 2 electrones (León *et al.*, 2004; León *et al.*, 2005; Dabbeni *et al.*, 2001). Este mecanismo se relaciona con la expresión del ADN mitocondrial (DNAMt), que codifica el polipeptido de la subunidad I, II y III del complejo IV de la mitocondria (León *et al.*, 2005). Recordemos que esto es de suma importancia debido a que la 6-OHDA actúa afectando directamente la cadena respiratoria mitocondrial; de este modo, la melatonina podría ayudar a revertir el daño causado por esta neurotoxina.

Asimismo, Jin y cols. (1998) describieron que la melatonina es capaz de incrementar la actividad de la TH, además de evitar la autooxidación de la L-Dopa exógena (Rocchitta *et al.*, 2006).

Estudios recientes de Hernández-Baltazar y cols. (2013) reportan que la inyección de la neurotóxina 6-OHDA induce la muerte neuronal apoptótica sin encontrar evidencias de recuperación. Sin embargo, es importante mencionar que bajo algunas condiciones de daño las neuronas pueden dejar de ser funcionales (dejan de producir DA) sin que necesariamente se llegue a su muerte (Kearns y Gash; 1995) o bien, mantienen la síntesis de TH aun estando en proceso apoptótico (Rodríguez *et al.*, 2004).

Es posible que el tratamiento con melatonina active diferentes vías de señalización para aumentar el mecanismo de defensa contra ERO y RL permitiendo a la célula la síntesis de DA; de esta manera, favorece la expresión de TH en lado contralateral; es decir, con menos estrés oxidativo; efecto contrario con la administración de L-Dopa que por su mecanismo de degradación aumenta el estrés oxidativo y dificulta así la producción de DA y/o favorece la muerte neuronal.

11.2 NEURONAS INMUNORREACTIVAS A BrdU/TH EN LA SNC.

- *Lado Contralateral.*

La presencia de neuronas inmunorreactivas a BrdU/TH es un indicativo de la posibilidad de neuronas dopaminérgicas de nueva creación en la SNC. En nuestros resultados no reportamos diferencias significativas entre los diferentes grupos con y sin tratamiento del lado contralateral a la lesión, aunque si existe presencia de neuronas BrdU/TH positivas.

Diversas investigaciones han establecido la posibilidad de neuronas de nueva creación en la SNC de ratas y humanos (Lie *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003; Yoshimi *et al.*, 2005; Van Kampen *et al.*, 2006).

Que existan neuronas inmunorreactivas a BrdU/TH en el lado contralateral puede ser debido al desbalance en su estado de estrés oxidativo. Los reportes indican que los factores neurotróficos juegan un papel importante en la sobrevivencia y proliferación de las células nerviosas. Sin embargo, se ha descrito la interacción entre los factores de crecimiento y las ERO en el funcionamiento celular.

Las ERO pueden fosforilar a los receptores de algunos factores tróficos, modulando las cascadas moleculares activadas por dichos receptores sugiriendo que esta activación sincronizada es necesaria para mantener la homeostasis celular (Castillo y Rivas, 2011). También, se ha descrito la participación de algunas cascadas de señalización que involucran a las ERO y factores de crecimiento que pueden servir como inductores o estimuladores de defensas antioxidantes, las cuales desempeñan un papel trascendente en la regeneración celular (Castillo y Rivas, 2011).

De esta manera los RL formados por la lesión mecánica en el grupo sham o bien por la administración de 6-OHDA en los grupos con y sin tratamiento podría mantener un nivel aceptable de estrés oxidativo en el lado contralateral y así activar las cascadas de señalización involucradas con factores tróficos dando como resultado la presencia de neuronas BrdU/TH positivas.

- *Lado Ipsilateral.*

En el lado ipsilateral a la lesión el grupo tratado con la combinación terapéutica presento un mayor número de neurona BrdU/TH positivas con respecto al grupo control y al grupo tratado únicamente con melatonina. Mostrando así que la coadministración de ambos fármacos ayuda a la inducción de los procesos neurogénicos y que dicho proceso se ve altamente influenciado por condiciones patológicas.

Una gran número de reportes argumentan que, en condiciones fisiológicas, las regiones no neurogénicas producen únicamente células gliales, y que la formación de nuevas neuronas en estas regiones se estimula solo tras un daño o un estímulo patológico (Ming y Song, 2005). Esto explicaría por que no se encontraron diferencias significativas entre los animales lesionados con 6-OHDA y los tratados con la combinación terapéutica.

Ahora bien, como se mencionó anteriormente, el proceso de neurogénesis está restringido a ciertas áreas del encéfalo caracterizadas por poseer ambientes permisivos para dicho proceso, a grandes rasgos los “nichos neurogénicos” poseen: Progenitores celulares, factores tróficos (neurotrofinas) y glía favorecedora; dicho lo cual, si un núcleo puede tener una o varias de estas características específicas podría ser candidato para llevar a cabo un proceso neurogénico. Este es el caso de la SNc.

Un estudio de gran relevancia realizado por Lie y cols. (2002) demuestra que la SNc posee células progenitoras con potencial para diferenciarse en neuronas cuando son provistas con señales “ambientales” correctas.

Por su parte, Hoglinger y cols. (2004) establece que las señales dopaminérgicas pueden favorecer la proliferación celular en la SVZ *in vivo* a través de la estimulación de receptores de la familia D2.

Así mismo, Van Kampen del 2004 al 2006 demostró que la administración de 7-OHDPAT (Agonista del receptor dopaminérgicos D3) incrementa significativamente la proliferación celular en la SNc de ratas hemiparkinsonicas, adoptando un fenotipo neuronal y expresando la enzima TH además de una recuperación funcional en pruebas conductuales. Concluyendo que la expresión de receptores dopaminérgicos D3 juegan un papel importante en la neurogénesis. Dichos receptores se expresan en neuronas dopaminérgicas de la SNc y AVT (Díaz *et al.*, 2000).

De esta manera la DA provista por la administración exógena de L-Dopa podría estar activando receptores dopaminérgicos del tipo D3 ubicados en la SNc y desencadenar las cascadas de señalización relacionadas con el potencial neurogénico de estos receptores; así, estimularía los progenitores celulares presentes en este núcleo. Además de que el potencial de la melatonina como barredor de RL estaría brindando un ambiente más permisivo para desarrollar procesos neurogénicos.

Aunado al potencial neurogénico que se confiere a los receptores dopaminérgicos D3, Lee y cols. (2002) reportó que los receptores acoplados a proteínas G han mostrado ser capaces de activar cascadas de señalización relacionadas con MAPKinasas y receptores mitogénicos de Cinasas Tirosinas (Sistema de señalización de receptores único de neurotrofinas). Así, la activación de receptores de Dopamina D3 podrían a su vez activar potencialmente cascadas de señalización mitogénicas normalmente mediadas por neurotrofinas.

En la neurogénesis embrionaria y adulta, tiene lugar una oleada de muerte celular programada dependiente de la actividad, justo después de que las nuevas neuronas se forman y comienzan a establecer conexiones funcionales. Según la hipótesis propuesta por Levi-Montalcini en 1987, la supervivencia de las células que prevalecen va a depender en gran medida de su capacidad de responder a factores neurotróficos. El aporte de estos factores neurotróficos puede provenir de forma retrógrada de la neurona postsináptica, anterógrada, autocrina (por la propia neurona) o paracrina (por los astrocitos y/o microglía) (Wright *et al.*, 1992; Altar *et al.*, 1998; Kuczewski *et al.*, 2009).

Estudios de Koppers y Beyer (2001) sugieren que el BDNF (neurotrofina) parece estar mediado por la actividad dopaminérgica. La administración de L- Dopa eleva la expresión de BDNF en el núcleo estriado de ratas, efecto bloqueado por antagonistas dopaminérgicos (haloperidol) (Okazawa *et al.*, 1992; Angelucci *et al.*, 2000). Similarmente, el tratamiento con haloperidol reduce significativamente la expresión de BDNF en la SNc y núcleo estriado de ratas (Dawson *et al.*, 2001).

De esta forma la activación de receptores dopaminérgicos D3 puede influir en la expresión o liberación de BDNF (Guillin *et al.*, 2001;2003). Paralelamente la expresión de receptores D3 en el SNc de rata puede ser influenciado a su vez por BDNF sintetizado por las mismas neuronas dopaminérgicas (Sokoloff *et al.*, 2002).

La coexistencia de estos factores induce un ambiente más propicio para la generación de nuevas neuronas, y que estas a su vez expresen fenotipos dopaminérgicos. Lo cual abre la posibilidad de una nueva estrategia terapéutica basada en procesos neurogénicos.

El grupo tratado con L-Dopa no presento diferencias significativas con el grupo de la combinación terapéutica. De manera cualitativa observamos un gran número de células inmunorreactivas a BrdU en la SNc en los grupos que se les administro L-Dopa (datos no mostrados); sin embargo, desconocemos el fenotipo de dichas células, dado que el 90% de la población neuronal en la SNc es de origen dopaminérgico, suponemos que dichas células poseen un fenotipo glial.

Resultados previos demuestran que las células gliales son importantes reguladores de la transmisión sináptica y la homeostasis extracelular en el SNC (Lee *et al.*, 2000; Araque *et al.*, 2001). Lie y cols. (2002), muestra la presencia de nuevas células gliales en la SNc que sugiere un constante reemplazamiento glial. La presencia de núcleos positivos a BrdU “asociados” con neuronas dopaminérgicas da lugar a proponer que esta estrecha asociación es necesaria para la inducción de la diferenciación o como soporte trófico (Lie *et al.*, 2002).

Desde hace unos 20 años existen evidencias experimentales que apoyan la existencia de un cuarto tipo de glía, distribuida por todo el SNC adulto y en desarrollo. Una de las características principales de este tipo glial es la expresión del condroitín sulfatoproteoglicano (NG2), proteína integral de membrana; algunos autores han propuesto la el nombre de “*polidendrocitos*” (Nishiyama *et al.*, 2009). Los polidendrocitos participan en los procesos de plasticidad sináptica y comunicación entre la glía y las neuronas. Se ha propuesto que estas células constituyen un tipo celular que estabilizaría y modularía la función neuronal en las sinapsis y en los nódulos de Ranvier, además de prevenir la formación de colaterales axónicos (Nishiyama *et al.*, 2009). Actualmente se consideran células con potencial para actuar como precursores neuronales, que podrían activarse cuando el tejido nervioso se ve comprometido (Berry *et al.*, 2002; Horner *et al.*, 2002; Stallcup, 2002).

12. CONCLUSIONES.

- La administración exógena de Melatonina ayuda a detener y/o revertir los daños en la SNc causados por la administración intracerebral de la neurotóxina 6-OHDA en ratas.
- Se demuestra la evidencia de células positivas a BrdU/TH en la SNc de ratas lesionadas con 6-OHDA; lo cual es un indicativo de neuronas dopaminérgicas de nueva creación.
- La administración de L-Dopa/Melatonina estimula el proceso neurogénico en la SNc de ratas lesionadas con 6-OHDA.

13. BIBLIOGRAFÍA.

A

- Agostinho P., Pereiraç C. y Oliveira C.R. 2005. Neurodegenerative Pathways in Parkinson's Disease: Therapeutic Strategies. *Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders*. 4:405-419
- Alamo C., Lopez M., Francisco, Bhatara, Vinod, Cuenca y Eduardo. 2004. La contribución de la reserpina al desarrollo de la psiquiatría y su papel en la investigación neurobiológica. *Rev. Psiquiatr. Med. Barc.* 31(3):130-139
- Alexander G. y Crutcher M. 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in Neuroscience* 13 (7): 226-271
- Altar C. A., Fritsche M. y Lindsay R.M. 1998. Cell body infusions of brain-derived neurotrophic factor increase forebrain dopamine release and serotonin metabolism determined with in vivo microdialysis. *Adv Pharmacol* 42:915-21
- Altman J. 1963. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec* 145:573-91
- Anaya M.V. 2006. Colaterales axónicas de las neuronas de la sustancia negra parte compacta inervación dopaminérgica del núcleo reticular talámico. Tesis para obtener el grado de Doctora en ciencias. CINVESTAV.
- Anaya, M.V. 1997. Estudio morfofuncional comparativo entre los trasplantes de médula adrenal en el ventrículo lateral o en el parénquima estriatal. Tesis para obtener el grado de maestría en neurociencias. ENEP-Iztacala. UNAM.
- Angelucci F., Mathe A.A. y Aloe L. 2000. Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor TrkB in rat brain are significantly altered after haloperidol and risperidone administration. *J. Neurosci. Res.* 60:783-794
- Araque A.C., Armignoto G. y Haydon P.G. 2001. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol* 63:795-813
- Arendt J. 1998. Melatonin and pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Reviews of Reproduction*. 3:13-22
- Artavanis T.S., Matsuno K. y Fortini M.E. 1995. Notch signaling". *Science*, 268 (5208):225-232
- Artavanis T.S., Rand M.D. y Lake R.J. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, 284 (5415): 770-776
- Avila C.M.R. 2001. Efecto de la taurina en el sistema nervioso de las ratas expuesta a un modelo de estrés oxidativo producido por ozono: Análisis morfológico- bioquímico y sus relación con la conducta. Tesis de doctorado en ciencias biológicas. Facultad de Ciencias UNAM.
- Ávila C.M.R., Gutiérrez V.A.L., Ordoñez L.J.L., Colín B.L., Espinosa V.J., Aley M.P., Montiel F.E., Anaya M.V., Juárez S.M.L. y Machado S.J.P. 2006. Time course changes of the striatum neuropil after dopamine depletion and the usefulness of the contralateral striatum as a control structure: a Parkinson's disease experimental model. *Neurological Research*. 30:1068-1074

B

- Bahena T.R., Flores G. y Arias M.J.A. 2000. Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central. *Rev Biomed.* 11:39-60
- Banasr M., Hery M., Printemps R. y Daszuta A. 2004. Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology*, 29 (3): 450-460
- Bargas J., Galárraga, E. 2000. La acción neuromoduladora de la dopamina sobre los ganglios basales. *Ciencia al Día Internacional*. México, 2(3):1-18
- Bartosz G. 2009. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers?. *Biochem Pharmacol.* 77:1303-15
- Battista D., Ferrari C.C., Gage F.H. y Pitossi F.J. 2006. Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 23:83-93
- Bedard A., Cossette M., Levesque M., Parent A. 2002. Proliferating cells can differentiate into neurons in the striatum of normal adult monkey. *Neurosci Lett* 328:213–6
- Beker A.B y Joynt R.J. 1990. Extrapiramidal disease. *Clinical Neurology*. 3(38):1-67
- Bernier P.J., Bedard A., Vinet J., Levesque M. y Parent A. 2002. Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11464–9
- Berry M., Hubbard P. y Butt A.M. 2002. Cytology and lineage of NG2-positive glia. *J Neurocytol* 31:457-67
- Bertarbet R., Shered T. y Grenamyre J. 2002. Animal models of Parkinson disease. *Bio Essay* 24: 308-318
- Biagio M.N. y Bernardi G. 2005. The magic of L-DOPA: why is it the gold standard Parkinson's disease therapy?. *Trends in Pharmacological Sciences* 26 (7): 341-344
- Bloem R.B., Grimbergen A.M.Y., Van Dijk G. y Munneke M. 2006. The "posture second" strategy: A review of wrong priorities in Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 248: 196-204
- Blum D.S., Torch N., Lambeng M., Nissou A.L., Bénébid R., Sadoul y Verna J. M. 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP; contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 65:135-172
- Bolam J.P., Hanley J.J., Booth P.A.C. y Bevan M.D. 2000. Synaptic organization of the basal ganglia. *J. Anat.* 196:527-542
- Bonni A., Greenberg M.E. 1997. Neurotrophin regulation of gene expression. *Can J. Neurol Sci* 24:272-83
- Bonuccelli U. y Del Dotto P. 2006. New pharmacologic horizons in the treatment of Parkinson disease. *Neurology* 67(2):30–38
- Boutin J.A., Audinot V., Ferry G. y Delagrange P. 2005. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends in Pharmacological Sciences*. 26(8):412-419

C

- Cadet J.L. y Brannock C. 1998. Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochemistry international*. 32:117-13
- Caleo M., Menna E., Chierzi S., Cenni M.C. y Maffei L. 2000. Brain-derived neurotrophic factor is an anterograde survival factor in the rat visual system. *Curr Biol* 10:1155-61
- Cao L., Jiao X., Zuzga D.S., Liu Y., Fong D.M., Young D. y During M.J. 2004. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat Genet* 36:827-35
- Cardenas A., Moro M. A., Hurtado O., Leza J.C. y Lizasoain I. 2005. Dual role of nitricoxide in adult neurogenesis. *ResBrain*.50(1):1-6
- Cardoso S.M., Moreira P.I., Agostinho P., Pereira C. y Oliveira C. R. 2005. neurodegenerative pathways in parkinsons disease: Terapeutic Strategies. *CNS & Neurological Disorders*. 4:405-419
- Carlsson A., Fuxe J. y Hökfelt T. 1967. Effect of desmethylipramide, protriptyline and (+)-amphetamine on fluorescence of central adrenergic neurons of rats pretreated with A-methyl-dopa and tetrabenazine or reserpine. *European journal of pharmacology*. 2:196-201
- Carpenter M. B. 1976. Anatomical organization of the corpus striatum and related nuclei. En Melvin. D y Yahr, M.D (Eds). *The basal ganglia*. Raven Press, N.Y.
- Carpenter. M.B. 1981. Anatomy of the corpus striatum and brain stem integrating system. En: Brooks, V. (Eds). *Handbook of Physiology: The nervous system, motor control*. American Physiological society, Bethesda, M.D.
- Castillo P.D.V y Rivas A.S. 2011. Interacción entre factores neurotróficos y especies reactivas de oxígeno en los mecanismos de muerte y proliferación celular. *Arch Neurociencia* 13 (1):26-23
- Cenci M.A. Wishaw Q.I. y Schallert T. 2002. Animal models of neurological deficits: relevant is the rat?. *Nature Neuroscience*, 3:574-579
- Chandan K. Sen S.K. y Sashwati R. 2004. Tocotrienol the natural vitamin E to defend the nervous system? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1031: 127–142
- Clarke P.G.H. 1999 Apoptosis versus necrosis. How valid a dichotomy for neurons? En: E.V. Koliastos y R.R. Ratan (Eds) *Cell death and diseases of the nervous system*. Humana press, New Jersey pp.3-29
- Conover J.C. y Allen R.L. 2002. The subventricular zone: new molecular and cellular developments. *Cell Mol Life Sc.*59 (12): 2128-2135
- Cooper J.R., Blomm F.E. y Roth R.H. 1996. *The biochemical basis of neuropharmacology*. Oxford University Press, N.Y.E.U.
- Corti O., Hampe C., Darios F., Ibañez P., Ruberg M. y Bricea A. 2005. Parkinson's Disease. From causes to mechanisms *C.R. Biologies*. 328: 131–142
- Costa E., Lopes R. y Lamy F.M. 1995. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J Pineal Res.* Oct;19(3):123-6
- Coté L. y Crutcher M.D. 1991. Motor functions of the basal ganglia and disease of transmitter metabolism. En: Kandel, E.R. Schwartz, J.H. y Jessel, T.M. (Eds). *Principles of neural science*. Elsevier, U.S.A.

- Coulson E.J., Reid K., Shipham K.M., Morley S., Kilpatrick T.J. y Bartlett P.F. 2004. The role of neurotransmission and the Chopper domain in p75 neurotrophin receptor death signaling. *Prog Brain Res* 146:41-62

D

- Dabbeni S.F., Di santo S., Chini D., Skaper S.D. y Giusti P. 2001. Melatonin protects against 6-OHDA induced neurotoxicity in rats: a role for mitochondrial complex I activity. *The Faseb Journ* 15:164-170
- Dawson N.M., Hamid E.H., Egan M.F. y Meredith G.E. 2001. Changes in the pattern of brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity in the rat brain after acute and subchronic haloperidol treatment. *Synapse*. 39:70-81
- Dawson T. y Dawson V. 2003. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science*. 302 (31); 819-822
- Dayer A.G., Cleaver K.M., Abouantoun T. y Cameron H.A. 2005. New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *J Cell Biol* 168:415–27
- DeLong M.R. y Georgopoulos, A.P. 1981. Motor functions of the basal ganglia. En: Brookhard, J; Mounscatle, V.B; Brooks, V.B. y Geiger, S.R. (Eds) *Handbook of physiology*. American Physiological Society.
- DeMuro L., Nafziger N., Blask E., Menhinick M. y Bertino S. 2000. The absolute bioavailability of oral melatonin. *J. Clin. Pharmacol.* 40:781-784
- Di chiara G., Morelli M. y Consolo S. 1994. Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum A Ch/dopamine/NMADA interactions. *Cell Press*. 7(6)228-233
- Díaz C.F.J., Asanuma M., Miyasaki I. y Ogawa N. 2004. Rotenone induces disassembly of the Golgi apparatus in the rat dopaminergic neuroblastoma B-65 cell line. *Neuroscience Letters* 364:59-63
- Diaz J., Pilon C., Le F.B., Gross C., Triller A., Schwartz J.C. y Sokoloff P. 2000. Dopamine receptors expressed by all mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci* 20: 8677–8684
- Díaz M.A., Pascual G.J. y Pazos C.A. 1998. Terapéutica farmacológica de los movimientos anormales. *Medicine* 7(103):4806-4822
- Doetsch F., Caille I., Lim D.A., García V.J.M. y Álvarez B.A. 1999a. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-16
- Doetsch F., García V.J.M y Álvarez B.A. 1999b. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11619-24

E

- Emborg M.E. (2004). Evaluation of animals models of Parkinson disease for neuroprotective strategies. *Journal of Neuroscience Methods* 139; 121-143
- Enwere E., Shingo T., Gregg C., Fujikawa H., Ohta S. y Weiss S. 2004. Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis and deficits in fine olfactory discrimination. *J Neurosci* 24:8354–65

F

- Fabel K., Fabel K., Tam B., Kaufer D., Baiker A., Simmons N., Kuo C.J. y Palmer T.D. 2003. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 18:2803-12
- Filippov V., Kronenberg G., Pivneva T., Reuter K., Steiner B., Wang L. P., Yamaguchi M., Kettenmann H. y Kempermann G. 2003. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 23:373-82
- Finotti N., Castagna L., Moretti A. y Marzatico F. 2000. Reduction of lipid peroxidation in different rat brain areas after cabergoline treatment. *Pharmacological Research* 42(4): 287-291
- Flint B.M. 2001. Experimental models of Parkinson Disease. *Natural Reviews*. 2(3):252-332
- Flores G., Liang J.J., Sierra A., Martínez-Fong D., Quirion R., Acevez J. y Srivastava L.K. 1999. Expression of dopamine receptors in the subthalamic nucleus of the rat: characterization using reverse transcriptase-polymerase chain reaction and autoradiography. *Neuroscience*. 91(2):549-556
- Foshay K.M. y Gallicano G.I. 2007. Small RNAs, big potential: the role of Micro RNAs in stem cell function. *Curr Stem Cell Res Ther* 2:264- 71
- Franco J., Prediger D.S.R, Pandolfo P., Takahashi N.R., Farina M. y Dafre L.A. 2007. Antioxidant responses and lipid peroxidation following intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats: increased susceptibility of olfactory bulb. *Life Sciences*. 80:1906-1914
- Freeman B.A. y Crapo J.D. 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Investigation*. 47:412-426

G

- García M.J.C. 2003. La enfermedad de Parkinson vista por un afectado *Rev. Neurol.* 7(4):391-400
- García M.R., Alberti A.E. and Catellano O.M.R. 2003 Terapia génica en vivo en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. *Neurol* 36 (11):107-1077
- García R.R. 2008. Efecto de la melatonina y la L-Dopa en ratas lesionadas con 6-OHDA a diferentes tiempos. Tesis para obtener el grado de licenciado en biología. FES- Iztacala, UNAM, México.
- Gerfen C.R. 2006. Indirect-pathway neurons lose spines in Parkinson disease. *Nature Neuroscience* 9:157-158
- Giachino C., Galbiati M., Fasolo A., Peretto P. y Melcangi R.C. 2004. Effects of progesterone derivatives dihydroprogesterone and tetrahydroprogesterone, on the subependymal layer of the adult rat. *JNeurobiol*, 58(4):493-502
- Gilmans y Winans, N.S. (1994). Principios de neuroanatomía y neurofisiología clínica de Monter y Gatz. El manual moderno. 3. Edición. México. D.F. pág. 183-192
- Gitto E., Karbownik M., Reiter R.J., Tan D.X., Cuzzocrea S., Chiurazzi P., Cordaro S., Corona G., Trimarchi G. y Barberi I. 2001b. Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediat Res*. 50: 756–60

- Gitto E., Reiter R.J., Karbownik M., Tan D.X. y Barberi I. 2001c. Respiratory distress syndrome in the newborn: Role of oxidative stress. *Intensive Care Med.*; 27: 1116–23
- Gitto E., Tan D.X., Reiter R.J., Karbownik M., Manchester L.C., Cuzzocrea S., Fulia F. y Barberi I. 2001a. Individual and synergistic actions of melatonin: Studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferrioxamine in liver homogenates. *J Pharm Pharmacol.* 53: 1393–401
- Glinka Y., Tipton K.F. y Youdim M.B.H. 1998. Mechanism of inhibition of mitochondrial respiratory complex 1 by 6-hidroxi-domanine and its prevention by desferrioxamine. *Eur. J. Pharmacol.* 35:121-129
- Góngora A.J.L., Moon P.R.R., Villanueva T.J., Arankowsky S.G., Álvarez C.F.J., Pineda C.J.C. y Bata G. J.L. 2005. La cafeína y los antagonistas de los receptores A2A de la adenosina como posibles ayudantes de la terapia anticolinérgica en la enfermedad de Parkinson. *Rev Biomed.* 16:99-111
- Gonon F. 1997. Prolonged and extrasynaptic excitatory action of dopamine mediated by D1 receptors in the rat striatum in vivo. *J. Neurosci.* 17: 5972-5978
- Gonzales C.G. 2010. Neurogénesis y gliogénesis en el cerebro rostral del ratón adulto heterocigoto para Pax6 (+/SeyDey). Tesis para obtener el grado de Doctor. Salamanca.
- Gorell J.M., Rybicki B.J., Johnson C.C. y Peterson E. L. 1999. Smoking and Parkinson's disease. A dose-response relationship. *Neurology.* 52: 115-111
- Grandas F. 2003. Agonistas dopaminérgicas y neuroprotección en la enfermedad de Parkinson. *Medicina editores.* Barcelona, España. 53p
- Graybiel A.M. 1990a. The basal ganglia and the initiation of movement. *Rev. Neurol.* 146(10): 570-574
- Graybiel A.M. 1990b. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *TINS*, 13, 7: 244-254
- Guillin O., Diaz J., Carrol P., Griffon N., Schwartz J.C. y Sokoloff P. 2001. BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioral sensitization. *Nature* 411:86-89
- Guillin O., Griffon N., Bezard E., Leriche L., Diaz J., Gross C. y Sokoloff P. 2003. Brain-derived neurotrophic factor controls dopamine D3 receptor expression: therapeutic implications in Parkinson's disease. *Eur. J. Pharmacol.* 480:89-95
- Gutiérrez V.A.L. 2007. Comparación del efecto de diferentes fármacos en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias biológicas. FES Iztacala UNAM.

H

- Hagg T. 2005. Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. *Trends Neurosci.* 28(11):589-595
- Hattori K., Yoshiyuki K., Yamamoto I., Kazunori K., Kenji M., Mitsuru O., Takayoshi K., Akinori I., Akinori I., Kayoko M., Syunji Y., Nobuya M., Yoshinori T., y Hiroshi M. 2004. Rational approaches to discovery of orally active and brain-penetrable quinazolinone Inhibitors of Poly (ADP-ribose) polymerase. *J. Med. Chem.* 47 (17): 4151–4154

- Hefti F., Melamed E. y Wurtman R.J. 1980. Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: Biochemical characterization. *Brain Res.* 195: 123-137
- Hernández B.D., Mendoza G.M.E. y Martínez F.D. 2013. Activation of GSK-3 β and caspase-3 occurs in nigral dopamine neurons during development of apoptosis activated by a striatal injection 6-hydroxydopamine. *PLOS ONE* 8:1-13
- Hernandez L.S., Bargas J., Surmeier D.J., Reyes A. y Galarraga, E. 1997. D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca²⁺ conductance. *J. Neurosci.*, 17: 3334-3342
- Hidalgo A., Barami K., Iversen K. y Goldman S.A. 1995. Estrogens and no estrogenicovarian influences combine to promote the recruitment and decrease the turnover of new neurons in the adult female canary brain. *J Neurobiol*, 27 (4): 470-487
- Hoglinger G.U., Rizk P., Muriel M.P., Duyckaerts C., Oertel W.H., Caille I. y Hirsch E.C. 2004. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat. Neurosci.* 7:726-735
- Hoover J.E. y Strick P.L. 1993. Multiple output channels in the basal ganglia. *Science* 259: 819-821
- Horner P.J., Thalimair M. y Gage F.H. 2002. Defining the NG2-expressing cell of the adult CNS. *J Neurocytol* 31:469-80

I

- INEGI. 2005. Defunciones generales 2005. Disponible en: <http://www.issste.gob.mx/website/comunicados/nosotros/enero99/cirug%eda%20sin%20bistur%ed.html>
- Instituto Nacional De Neurología y neurocirugía 2008. Parkinson. Disponible en la web: <http://www.innn.salud.gob.mx/interior/atencionapacientes/padecimientos/parkinson.html>.

J

- Jenner P. 1995. The rationale for the use of dopaminergic agonists in Parkinson's disease. *Neurology* 45 (3):6-12
- Jiménez J.F.J., Molina J.A. y Ortí P. 1999. Mecanismos farmacológicos del tratamiento de las discinecias en la enfermedad de Parkinson. *Rev Neurol.* 28:889-898
- Jin K.B., Shin Y.D., Jeong Y.M., Gwag R.M, Baik W.H., Yoon S.K., Cho H.Y., Joo S.W., Kim S.Y. y Baik H.H. 1998. Melatonin protects nigral dopaminergic neurons from MPP⁺ neurotoxicity in rats. *Neuroscience Letters* 245:61-64
- Jin K., Zhu Y., Sun Y., Mao X.O., Xie L. y Greenberg D.A. 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11946-50
- Johnson F. y Bottjer S.W. 1995. Differential estrogen accumulation among populations of projection neurons in the higher vocal center of male canaries. *J. Neurobiol.* 26 (1): 87-108

K

- Kandell R., Schwartz H. y Jassel M. 2000. Principles of neuroscience. 4^o ed. McGraw Hill Companies. United States of America.
- Kaplan M.S. 1981. Neurogenesis in the 3-month-old rat visual cortex. *J Comp Neurol* 195:323–38
- Katzenschlager R., Hughes A., Evans A., Manson J., Hoffman M., Swinn L., Watt H., Bhatia K., Quinn N. y Lees J. 2005. Continuous subcutaneous apomorphine therapy improves dyskinesias in Parkinson's disease: A Prospective Study Using Single-Dose Challenges. *Movement Disorders*. 20(2):151–157
- Kearns M., y Gash, M.D. 1995. GDNF protects nigral dopamine neurons against 6-OHDA in vivo. *Brain Research* 672:104-111
- Kempermann G. 2006. Adult Neurogenesis. Stem cells and neuronal development in the adult brain. Oxford University Press.
- Kienzl E., Jellinger K., Stachelberger H. y Linert W. 1999. Iron as catalyst for oxidative stress in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Life Sciences*. 65(18/19) 1973-1976
- Kita H. y Kitai S.T. 1988. Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons in the rat neostriatum: their morphological types and populations. *Brain Research*. 447: 346-352
- Kondo T. y Raff M. 2000. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* 289:1754-7
- Kozłowski D.A., Miljjan E.A., Bremer E.G., Harrod C.G., Gerin C., Connor B., George D., Larson B. y Bohn M.C. 2004. Quantitative analyses of GRF α -1 mRNA and tyrosine hydroxylase protein in the nigrostriatal system reveal bilateral compensatory changes following unilateral 6-OHDA lesions in the rat. *Brain Research*. 1016:170-181
- Kuczewski N., Porcher C., Lessmann V., Medina I. y Gaiarsa J.L. 2009. Activity dependent dendritic release of BDNF and biological consequences. *Mol Neurobiol* 39:37-49
- Kuhn H. G., Dickinson A. H. y Gage F.H. 1996. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027–33
- Kuppers E. y Beyer C. 2001. Dopamine regulates brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in cultured embryonic mouse striatal cells. *Neuroreport*. 12:1175-1179

L

- Langston J., Forno L., Tetud J., Reeves A., Kaplan J. y Karluk D. 1999. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of human years after 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol*. 46:598 – 605
- Lee F.S., Rajagopal R. y Chao M.V. 2002. Distinctive features of Trk neurotrophin receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 13:11-17
- Lee J.C., Mayer P.M. y Rao M.S. 2000. Gliogenesis in the central nervous system. *Glia* 30:105-121
- Leist M. y Nicotera P. 1999. Calcium and cell death. En: Koliastos E.V. and Ratan R. (ed). *Cell death and diseases in nervous system*. Human Press. New Jersey pp. 69-91

- Lenington J.B., Yang Z. y Conover J.C. 2003. Neural stem cells and the regulation of adult *neurogenesis*. *Reprod.BiolEndocrinol.* 1:99
- León J., Acuña C.D., Mayo J.C., Tan D.X. y Reiter R.J. 2005. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J. Pineal Res* 38:1-9
- León J., Acuña C.D., Sainz R.M., Mayo J.C., Tan D.X. y Reiter R.J. 2004. Melatonin and mitochondrial function. *Life Science* 75 (7):765-790
- Leventhal C., Rafii S., Rafii D., Shahar A. y Goldman S.A. 1999. Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma. *Mol Cell Neurosci* 13:450-64
- Levi M.R. 1987. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237:1154-62
- Li X. y Zhao X. 2008. Epigenetic regulation of mammalian stem cells. *Stem Cells Dev* 17:1043-52
- Lichtenwalner R.J. y Parent J.M. 2006. Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. *Journal of Cerebral Blood & Metabolism.* 26:1-20
- Lie D.C., Dziejczapolski G., Willhoite A.R., Kaspar B.K., Shults C.W. y Gage F.H. 2002. The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J. Neurosci.* 22: 6639-6649
- Lim D.A., Tramontin A.D., Trevejo J. M., Herrera D.G., García V.J.M y Álvarez B.A. 2000. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28:713-26
- Lloyd K.G., Davidson L. y Hornykiewicks O. 1975. The neurochemistry of Parkinson's disease: effects of L-DOPA therapy. *J. Pharmacol.* 195: 453-464
- López B.S., Tan D.X., Rodríguez G.V., Manchester L.C., Mayo J.C., Sainz R.M. y Reiter R.J. 2003. Melatonin and its derivatives cyclic 3-hydroxymelatonin, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine and 6-hydroxymelatonin reduce oxidative damage induced by Fenton reagents. *J Pineal Res.*; 34: 178-84
- Lotharius J., Dugan L.L. y O-Malley K.L. 1999. Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *The journal of Neuroscience.* 19(4):1284-1293
- Lou Y. y Roth G. 2000. The roles dopamine oxidative stress and dopamine receptor signaling in aging and age-related neurodegeneration. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2 (3) 449-460

M

- Ma D.K., Ming G.L. y Song H. 2005. Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol*, 15 (5): 514-520
- Maharaj H., Maharaj S.D., Scheepers M., Mokokong R. y Dada S. 2005. L-DOPA administration enhances 6-hydroxydopamine generation. *Brain Research.* 1063:180-186
- Maratos E.C., Jackson M.J., Pearce R., Cannizarro C. y Jenner P. 2003. Both short-and long acting D1/D2 dopamine agonist induce less dyskinesia than L-DOPA in the MPTP lesioned common marmoset. *Experimental Neurology.* 179:90-102
- Marin C., Rodriguez-Oroz M.C. y Obeso J.A. 2006. Motor complications in Parkinson's Disease and the clinical significance of rotational behavior in the rat: have we wasted our time? *Experimental neurology.* 197(2):269-274

- Martínez D.A., Gómez P.I.J. y Carro P.A. 1998. Terapéutica farmacológica de los movimientos anormales. *Medicine*. 7 (103): 4809-4822
- Martínez M.P. 2006. Repercusiones sobre la calidad de vida del deterioro cognitivo en la enfermedad de Parkinson. *Rev. Neurol.* 43 (3): 168-172.
- Matarredona E.R., Murillo C.M., Moreno L.B. y Estrada C. 2005. Role of nitric oxide in subventricular zone neurogenesis. *Brain Res Brain Res Rev.* 49(2):355-366
- Mattson M.P., Maudsley S. y Martin B. 2004. A neural signaling triumvirate that influences ageing and age-related disease: insulin/IGF-1, BDNF and serotonin. *Aging Res Rev*, 3 (4): 445-464
- Mayo J.C., Sainz R.M., Antolin I., Herrera F., Martín V. y Rodríguez C. 2002. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci.*; 59: 1706–13
- Mayo J.C., Tan D.X., Sainz R.M., López B.S. y Reiter R.J. 2003. Oxidative damage to catalase induced by peroxyl radicals: Functional protection by melatonin and other antioxidants. *Free Radic Res.*; 37: 543–53
- Mayoral F.J. 2008. Efecto de la L-Dopa y de la Melatonina en la conducta motora de ratas lesionadas con 6-OHDA: Modelo de la enfermedad de Parkinson. Tesis para obtener el grado de licenciado en Psicología. FESI-Iztacala. UNAM.
- McKay R. 1997. Stem cells in the central nervous system. *Science* 276:66-71
- Mehler M.F., Marmur R., Gross R., Mabie P.C., Zang Z., Papavasiliou A. y Kessler J.A. 1995. Cytokines regulate the cellular phenotype of developing neural lineage species. *Int J Dev Neurosci* 13:213-40
- Mercier F., Kitasako J.T. y Hatton G.I. 2002. Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *J Comp Neurol* 451:170-88
- Merello M. 2008. Trastornos no motores en la enfermedad de Parkinson. *Rev Neurol.* 47: 261-70
- Merkle F.T., Tramontin A.D., García V.J.M y Álvarez B.A. 2004. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17528-32
- Michelli E.F. 1998. Enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 343pp
- Miller R. y Beninger R.J. 1991. On the interpretation of asymmetries of posture and locomotion produced with dopamine agonist in animals with unilateral depletion of striatal dopamine. *Progress in Neurobiology*. 36, 229-256
- Ming G.L. y Song H. 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev Neurosci* 28:223-50
- Mínguez C.A., Escamilla S.F. 2005. Terapia celular y otras estrategias neurodegenerativas en la enfermedad de Parkinson (II). *Rev Neuro.* 41 (11): 684-693
- Mink J.W. 1996. The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog. Neurobiol.* 50:381-425.
- Mirzadeh Z., Merkle F.T., Soriano N.M, García V.J.M y Álvarez B.A. 2008. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3:265-78

- Missale C., Nash R.S., Robinson W.S., Jaber M. y Caron, G.M. 1998. Dopamine receptors: From structure to function. *Physiological Reviews*. 78(1): 189-225
- Molina J.A., Jiménez J.F.J. y Ortí P. 1999. Complicaciones motoras y psíquicas en el tratamiento prolongado con levodopa de la enfermedad de parkinson complicada. *Rev. Neurol.* 28(10): 982-990
- Moore D., West A., Dawson V. y Dawson T. 2005. Molecular pathophysiology of Parkinson's Disease. *Advance on January*. 25:57-87

N

- Nishiyama A., Komitova M., Suzuki R. y Zhu X. 2009. Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat Rev Neurosci* 10:9-22
- Nombela M.F., Tormo O.I. y Galán G.T. 2002. Tratamiento farmacológico de la enfermedad de Parkinson. *Revista de la Sociedad Madrileña de Medicina de Familia y comunitaria*. 1(4). 38-42
- Nordeen E.J. y Nordeen K.W. 1989. Estrogen stimulates the incorporation of new neurons into avian song nuclei during adolescence. *Brain Res Dev Brain Res*, 49(1): 27-32

O

- Obeso J.A., Rodríguez- Oroz C.M. y Zamarbide I. 2002. Enfermedad de Parkinson. Perspectivas. En *Enfermedades Neurodegenerativas*. Seri científica Farmaindustria. Madrid, España 220p
- Obeso J.A., Olanow C.W. y Nut J.G. 2000a. Basal ganglia, Parkinson's disease and levodopa therapy. *Trens neurosci*. 23 (10):1-126
- Obeso J.A., Olanow W.C. y Nutt J.G. 2000b. Levodopa motor complications in Parkinson's disease. *Trends Neurosci*. 23 (10), 2-7
- Okasawa H., Murata M., Watanabe M., Kamei M. y Kanazawa I. 1992. Dopaminergic stimulation up-regulates the in vivo expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) in the striatum. *FEBS Lett*. 313:138-142
- Olanow C.W. y Tatton W.G. 1999. Etiology and patogénesis of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci*. 22:123-144
- Otero S.S., Abascal A. M.R. y Alanís Q.M. 1996. Parkinson enfoque al futuro. Fondo de Cultura Económica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.
- Oyama Y., Okasaki E., Chikaisha L., Nagano T. y Sadakata C. 1996. Oxidative stress induced increase in intracelular Ca^{2+} and Ca^{2+} -induced increase in oxidative stress: An experimental model using dissociated rat brain neurons. *J. Pharmacol*. 72:381-385

P

- Palmer T.D., Markakis E.A., Willhoite A.R., Safar F. y Gage F.H. 1999. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *Journal Neurosci* 19:8487-97
- Palmer T.D., Willhoite A.R. y Gage F.H. 2000. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425:479-94

- Parent A. 1990. Extrinsic connections of the basal ganglia. *Tins*. 13, 7: 254-258
- Parent A. y Hazrati L.N. 1995. Functional anatomy of the basal ganglia: The corticalbasal gangliathalamocortical loops. *Brain Res. Rev.* 20:91-127
- Pastor P. y Tolosa E. 2001. La enfermedad de Parkinson: diagnóstico y avances en el conocimiento de la etiología y en el tratamiento. *Medicina Integral* 37 (3): 104-117
- Paxinos G., Watson C. 1986. *The rat brain in stereotaxic Coordinates*. 2. Edición. Editorial Academic Press. NY. EEUU.
- Peretto P., Giachino C., Panzica G.C. y Fasolo A. 2001. Sexually dimorphic neurogenesis is topographically matched with the anterior accessory olfactory bulb of the adult rat. *Cell Tissue Res.* 306 (3):385-389
- Picconi B., Centonze D., Rossi S., Bernardi G. y Calabresi P. 2004. Therapeutic doses of L-dopa reverse hypersensitivity of corticostriatal D2 dopamine receptors and glutamatergic over activity in experimental parkinsonism. *Brain.* 127 (7):1661-1669
- Pickel V. M., Jonson E., Carson M. y Chan J. 1992a. Ultraestructure of spared dopamine terminals in caudate-putamen nuclei of adult rats neonatally treated with intranigral 6-Hidroxidopamine. *Developmental Brain Res.* 70, 75-86
- Pickel V.M., Chan J. y Sesack S.R. 1992b. Cellular basis for interactions between catecholaminergic afferents and neurons containing leu-enkephalin-like immunoreactivity in rat caudate-putamen nuclei. *Journal of Neurosci Res.* 31, 212-230
- Purves, Augustine, Fitzpatrick, Hall, LeMantia, Mc Namara y Williams. 2007. *Neurociencia*. Ed. Panamericana. México.

Q

- Quin Z.H., Chen, J.F. y Weiss, B. 1994. Lesions of mouse striatum induced by 6-hydroxidopamine differentially alter the density, rate of synthesis and level of gene expression of D1 and D2 dopamine receptors. *L. Neurochem.* Raven Press, N,Y. 411-420.

R

- Radad K., Gille G. y Rausch Wolf. 2005. Short review on dopamine agonists: insight into clinical and research studies relevant to Parkinson's disease. *Pharmacological Reports.* 57:701-712
- Ramaker C., Van de Beeck J.T.W., Finken J.J.M. y Van Hilter J.J.B. 2000. The efficacy and safety of adjunct Bromocriptine therapy for levodopa-induced motor complications: A systemic review. *Movement Disorders.* 15(1):54-64
- Rao M.S., Hattiangady B., Abdel R.A, Stanley D.P. y Shetty A.K. 2005. Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. *Eur J Neurosci* 21:464–76
- Rasika S., Nottebohm F. y Alvarez B.A. 1994. Testosterone increases the recruitment and/or survival of new high vocal center neurons in adult female canaries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (17): 7854-7858

- Reiter J.R., Tan D., Mayo C.J., Sainz M.R., Leon J. y Czarnochi Z. 2003. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochimica Polonica*, 50(4):1129-1146
- Reiter R.J., Cabrera J., Sainz R.M., Mayo J.C., Manchester L.C. y Tan D.X. 2000a. Melatonin as a pharmacological agent against neuronal loss in experimental models of Huntington's disease, Alzheimer's disease and Parkinsonism. *Ann NY Acad Sci.*; 890: 471–85
- Reiter R.J., Dun X.T. y Maldonado M.D. 2005. Melatonin as an antioxidant physiology versus pharmacology. *Journal of Pineal*. 39(2):215-216
- Reiter R.J., Tan D.X., Acuna C.D., Burkhardt S. y Karbownik M. 2000b. Melatonin: Mechanisms and actions as an antioxidant. *Curr Top Biophys.*; 24: 171–83
- Reiter R.J., Tan D.X., Mayo J.C. y Sainz R.M. 2003. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanism and pathophysiological implication in human. *Acta Biochemical Polonica*. 50 (4): 1129-1146
- Reiter R.J., Tan D.X., Osuna C. y Gitto E. 2000c. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: A review. *J Biomed Sci.*; 7: 444–58
- Ringheima E.G. y Conant K. 2004. Neurodegenerative disease and the neuroimmune axis (Alzheimer's and Parkinson's disease, and viral infections). *Journal of Neuroimmunology*, 147:43-49
- Rocchitta G., Rossana M., Esposito E., Marchetti B., Desole M.S., Miele E. y Serra P.A. 2006. Endogenous melatonin protects L-DOPA autooxidation in the striatal extracellular compartment of the freely moving rat: potential implication for long-term L-DOPA therapy in Parkinson's disease. *Journal of Pineal Research* 40(3):204-213
- Rodríguez M.C. Obeso J.A. y Olanow C.W. 1998. Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: A target for neuroprotection. *Ann Neurol*. 44(1); 175-188
- Rodriguez C., Mayo J.C., Sainz R.M., Antolin I., Herrera F., Martin V. y Reiter R.J. 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research*, 36:1-9
- Rodríguez R.A.C. y Hernández C.J.I. 2006. Parkinson y estereotaxia en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manual Velasco Suárez. *Arch Neurocién (Mex)*. 11(2): 123-132
- Rodríguez V.M., Villar V.A., Valencia R.C. y Cervantes A.A. 2011. Características epidemiológicas de pacientes con enfermedad de Parkinson de un hospital de referencia en México. *Arch Neurociencia* 16(2):64-68
- Rodriguez C., Mayo J.C., Sainz R.M., Antolin I., Herrera F., Martin V. y Reiter R.J. 2004. Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. *J Pineal Res*. 36(1) 1-9
- Rufo C.C. 2002. Melatonina y epilepsia. *Rev Neurol*. 35(1):51-58

S

- Samadi P., Bédard P.J. y Rouillard C. 2006. Opioids and motor complications in Parkinson's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. 27(10):512-517

- Sandoval E.J.M. y Richard M.M.P. 2007. La salud mental en México. Cámaras de Diputados División de Política Social. LIX Legislatura. DGS-SIID-SIA Disponible en: <http://bibliotecas.salud.gob.mx/greenstone/collect/publin1/index/assoc/HASH0190.dir/doc.pdf>
- Sapolsky R.M. 1999. Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Exp Gerontol.* 34(6):721- 732
- Schanzer A., Wachs F.P., Wilhelm D., Acker T., Cooper K.C, Beck H., Winkler J., Aigner L., Plate K.H. y Kuhn H.G. 2004. Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol* 14:237-48
- Schapira A.H.V., Cooper J.M. y Dexter D. 1990. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson`s disease. *J. Neurochem.* 54: 823-827
- Segura T., Galindo M.F., Rallo G.B., Ceña V. y Jordán J. 2003. Dianas farmacológicas en las enfermedades neurodegenerativas. *Neurol.* 36(11):1047-1057
- Seithikurippu R., Pandi P., Ilya T., Venkataramanujan S.D., Warren S., George J.M., Maestroni, Nava Z. y Cardinali D.P. 2008. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progress in Neurobiology.* 85:335-353
- Seki T. y Arai Y. 1995. Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. *Neuro Report* 6:2479–82
- Seri B., García V.J.M., McEwen B.S. y Álvarez B.A. 2001. Astrocytes give rise to 270 new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21:7153-60
- Shen Q., Goderie S.K., Jin L., Karanth N., Sun Y., Abramova N., Vincent P., Pumiglia K. y Temple S. 2004. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science*, 304 (5675): 1338-1340
- Shihabuddin L.S., Horner P.J., Ray J. y Gage F.H. 2000. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 20:8727-35
- Sies H., Sthal W. y Sundquist A.R. 1992 Antioxidant function of vitamins (vitamins E and C, β -carotene and others carotenoids). *Annals of the New York academy of sciences* 669:7-20
- Simonneaux V. y Ribelayga C. 2003 Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides and other pineal transmitters. *Pharmacol rev.* 55:325-395
- Singh S., Ahmed R., Sagar R.K. y Krishana B. 2006. Neuroprotection of the nigrostriatal dopaminergic neurons by melatonin in hemiparkinsonium rat. *Indian J. Med Res* 124:419-426
- Smith A.D y Bolam P.J. 1990. The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurons. *Cell.* 13(7):259-265
- Smith A. D., Bevan M. D, Shink E. y Bolam. J.P. 1998. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neurosciencie.* 86 (2):353-387
- Sokoloff P., Guillin O., Diaz J., Carroll P. y Griffon N. 2002. Brain-derived neurotrophic factor controls dopamine D3 receptor expression: implications for neurodevelopmental psychiatric disorders. *Neurotox.* 4:671-678
- Song H., Stevens C.F. y Gage F.H. 2002. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417:39-44

- Stallcup W.B. 2002. The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects. *J Neurocytol* 31:423-35
- Stocchi F. y Olanow C.W. 2003. Neuroprotection in Parkinson's disease: Clinical trials.
- Suhonen J.O., Peterson D.A., Ray J. y Gage F.H. 1996. Differentiation of adult hippocampus derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 383:624
- Surmeir D.J., Carrillo-Reid L. y Bargas J. 2011. Dopaminergic modulation of estriatal neurons circuits and essembles. *Neuroscience*. 198:3-18

T

- Talos I.F., Rubin L. D., Halle M. Musen M. y Kikinis R. 2008. A prototype symbolic model of canonical fuctional neuroanatomy of the motor system. *Journal of Biomedical Informatics*, 41(2):251-263
- Tan D. X., Manchester L.C., Hardeland R., López B.S., Mayo J.C., Sainz R.M. y Reiter R.J. 2003. Melatonin: A hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res.*; 34: 75–8
- Tan D. X., Reiter R.J., Manchester L.C., Yan M.T., El-Sawi M., Sainz R.M., Mayo J.C., Kohen R., Allegra M. y Hardeland R. 2002. Chemical and physical properties and potential mechanisms: Melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem*. 2: 181–98
- Tanapat P., Hastings N.B., Reeves A.J. y Gould E. 1999. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat". *J Neurosci*. 19(14):5792-5801
- Tepper M.J., Wison J.C. y Tibor K. 2008. Feedforward and feedback inhibition in neostriatal GABAergic spiny neurons. *Brain Research Reviews*. 58(2):272-281
- Tirmenstein A.M., Hu X.C., Scicchitano S.M., Narayanana P.K., McFarland D.C., Thomas C.H. y Schwartz. 2005. Effects of 6-hydroxidopamine on mitochondrial function and glutathione status in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Toxicology in Vitro*. 19(4):471-479
- Torroglosa A., Murillo C.M., Romero G.C., Matarredona E.R., Campos C.A. y Estrada C. 2007. Nitricoxide decreases subventricular zone stemcell proliferation by inhibition of epidermal growth factor receptor and phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway. *Stem Cells*, 25 (1): 88-97
- Truong L., Allbutt H., Kassiou M., Henderson J.M. 2006. Developing a preclinical model of Parkinson's disease: A study of behaviour in rats with graded 6-OHDA lesions. *Behavioural Brain Research* 169:1-9

U

- Ungersted U. 1971a. Adipsia and Aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigroestriatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand. Sup*. 367, 95-121
- Ungersted U. 1971b. Striatal dopamine relase after amphetamine or nerve degeneration reveled briotational behavior. *Acta Physiol. Scand. Sup* 367, 49-93
- Ungerstedt U. 1968. 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European Journal of Pharmacology*, 5:107-110

- Ungerstedt U. y Arbuthott, G.F. 1970. Quantitative recording of rotacional behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* 24:485-493

V

- Vallieres L., Campbell I.L., Gage F.H. y Sawchenko P.E. 2002. Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J Neurosci* 22:486-92
- Vallone D., Picett, R. y Borrelli E. 2000. Structure and function of dopamine receptor. *Neuroscience and Biobehavior Reviews.* 24, 125-132
- Van Kampen J.M. y Eckman C.B. 2006. Dopamine D3 Receptor Agonist Delivery to a Model of Parkinson's Disease Restores the Nigrostriatal Pathway and Improves Locomotor Behavior. *J. Neurosci.* 26: 7272–7280
- Van Kampen J.M., Hagg T. y Robertson H.A. 2004. Induction of neurogenesis in the adult rat subventricular zone and neostriatum following dopamine D receptor stimulation. *Eur. J. Neurosci.* 19: 2377–2387
- Van Kampen R.M. y Robertson H.A. 2005. A possible role for dopamine D3 receptor stimulation in the induction of neurogenesis in the adult rat substantia nigra. *Neuroscience* 136: 381–386
- Vander Kooy D. y Weiss S. 2000. Why stem cells? *Science* 287:1439-41
- Vanecek J. 1998. Cellular Mechanisms of Melatonin Action. *Physiological Reviews.* 78(3):687-721
- Vivancos M.F. 2006. Ropinirol en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson: actualización. *Rev Neurol.* 42(9):542-548

W

- Walton N.M., Sutter B.M., Laywell E.D., Levkoff L.H., Kearns S.M., Marshall G.P., Scheffler B. y Steindler D.A. 2006. Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia* 54:815-25
- Waters C.M., Peck R., Rossor M., Reynolds G.P. y Hunt S.P. 1988. Immunocytochemical studies on the basal ganglia and substantia nigra in Parkinson's disease and Huntington's chorea. *Neurosci.* 25(2): 419-438
- Weil Z.M., Hotchkiss A.K. y Gatién M.L. 2006. Melatonin receptor (MT1) knockout mice display depression-like behaviors and deficits in sensorimotor gating. *Brain Research.* 68(6):425-429
- Weiner N.Y. Molinoff P.B. 1994. Catecholamines. En: Siegel G.J., Agranoff B., Alberts R.W. y Molinoff P. B. Eds. *Basic Neurochemistry.* 4 Ed. N. Y: Raven Press 1989p.
- Weissman I.L., Anderson D.J. y Gage F. 2001. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:387-403
- Wichmann T. y DeLong, M.R. 1993. Pathophysiology of Parkinsonian motor abnormalities. En: Narabayashi, H., Nahatsu, T., Yanagisawa, N. y Mizuno, Y. (Eds.) *Advances in Neurology*, Vol. 60. Raven Press, Ltd. New York.
- Wilson J.C. 1998. The basal ganglia, In: Gordeon M. Shepard (Ed). *The synaptic organization of the brain.* Fourth Edition. Oxford University Press. New York. Pp; 329-375
- Wolters C.H.E., Tissing G., Bergmans L.M. y Kuiper M. 1995. Dopamine agonista in Parkinson's disease. *Neurology* 3:28-34

- Wooten F.G. 1990. Biochemical basis for levodopa therapy. En: Therapy of Parkinson's disease. Koller, W.C; Paulson, G; Dekker, M. (Eds) N.Y. an Basel.161-167
- Wright E.M., Vogel K.S. y Davies A.M. 1992. Neurotrophic factors promote the maturation of developing sensory neurons before they become dependent on these factors for survival. *Neuron* 9:139-50

Y

- Yamamoto M. 1998. Dopamine agonists provide neuroprotection. *Neurology*. 51(2): 10-12
- Yoshimi K., Ren Y.R., Seki T., Yamada M., Ooizumi H., Onodera M., Saito Y., Murayama S., Okano H., Mizuno Y. y Mochizuki H. 2005. Possibility for neurogenesis in substantia nigra of parkinsonian brain. *Ann. Neurol*. 58, 31–40
- Yu S.P., Canzonier L.M. y Choi D.W. 2001. Ion homeostasis and apoptosis. *Current Opinion in cell Biology*. 13:405-411

Z

- Zhao C., Wei D. y Cage F.H. 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*. 132:645-660
- Zhao M., Momma S., Delfani K., Carlen M., Cassidy R.M., Johansson C.B., Brismar H., Shupliakov O., Frisen J. y Janson A.M. 2003. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:7925–7930
- Zhong W. y Chia W. 2008. Neurogenesis and asymmetric cell division. *Curr Opin Neurobiol* 18:4-11

APENDICE 1

PERFUSIÓN INTRACARDIACA.

La perfusión es la acción que consiste en hacer que un líquido ingrese de manera lenta pero sostenida en el organismo. Para la perfusión de una rata de 200 gr. aproximadamente se requiere preparar 200 ml de fijado: paraformaldehído al 4% y 200 ml. de solución salina isotónica al 9% (C).

Solución A y Buffer PBS

Solución B

Reactivo	Cantidad	Reactivo	Cantidad
Agua Destilada	150 ml	Agua Destilada	100 ml
Fosfato Monobásico	0.612 g	Paraformaldehído	8 g
Fosfato Dibásico	3.534 g	Hidróxido de Sodio	2 a 3 hojuelas
Cloruro de Sodio	0.208 g		

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

La solución B se prepara calentando los 100 ml de agua destilada a 60°C para facilitar la disolución del hidróxido de sodio y el paraformaldehído. Una vez que se obtiene una mezcla homogénea transparente se enfría a 24°C y se agrega el glutaraldehído. La solución resultante es B, esta se mezcla con la solución A para obtener el fijador al 0.1 M. El pH se ajusta a 7.4; puede hacerse agregando pequeñas cantidades de una solución de hidróxido de sodio si la mezcla es muy acida o ácido clorhídrico si es muy básica.

Para preparar la solución C (Salina al 0.9%) se disuelven 9 gr de cloruro de sodio por cada 100 ml de agua destilada.

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

APENDICE 2

INMUNOHISTOQUÍMICA PARA TIROSINA HIDROXILASA (TH).

Una vez realizada la perfusión intracardiaca se extrajeron los cerebros y se colocaron primero en fijador durante 24 hrs, y luego en PBS con sacarosa al 30% durante 48 hrs. Con la ayuda de un críostato se realizaron cortes coronales de 50 μm para ser sometidos a la técnica de inmunocitoquímica TH.

El proceso de inmunotinción se efectuó por flotación y consistió en los siguientes pasos: Se guardan hasta 6 cortes por pozo (varía según tamaño de tejido y del pozo). Los cortes se lavaron en buffer PBS durante 3 periodos de 10 min cada uno. Después se colocaron durante 30 min en PBS conteniendo peróxido de hidrógeno al 0.3% y metanol al 10%, para inactivar la peroxidasa endógena. Posteriormente se lavaron en PBS durante 3 periodos de 10 min cada uno, para después colocarlos durante una hora en PBS conteniendo 3% de suero normal de caballo (SNcb) y 0.3% de triton X-100. Se efectuó por 48 hrs a 4 °C la incubación con el anticuerpo primario anti-TH, policlonal hecho en conejo, diluido 1:1000 con PBS conteniendo 3% de SNcb. Pasando el tiempo establecido, los cortes se sumergieron en PBS conteniendo 1% de SNcb durante 3 periodos de 10 min cada uno, para después incubarse durante dos horas a temperatura ambiente con IgG diluido 1:200 en PBS conteniendo 1% de SNcb. Los cortes fueron sometidos a 3 periodos de lavados de 10 min cada uno, en PBS. Durante las siguientes dos horas, los cortes permanecieron incubándose, a temperatura ambiente, con el complejo Avidina-Biotina a una concentración de 0.1% en PBS. Al cumplirse el periodo de incubación, los cortes se lavaron y se colocaron en una solución de diaminobenzidina diluida 1:2000 en PBS para revelar la inmunorreacción.

Una vez revelada la inmunorreacción, los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados, se dejaron secar y se cubrieron con resina.

APENDICE 3

INMUNOHISTOQUÍMICA PARA 5-BROMO-2-DESOXIURIDINA (BrdU).

Una vez realizada la perfusión intracardiaca se extrajeron los cerebros y se colocaron primero en fijador durante 24 hrs y luego en PBS con sacarosa al 30% durante 12 hrs. Con la ayuda de un criostato se realizaron cortes coronales de 50 μm para ser sometidos a la técnica de inmunocitoquímica para BrdU.

El proceso de inmunotinción se efectuó por flotación y consistió en los siguientes pasos: Se guardan hasta 6 cortes por pozo (varía según tamaño de tejido y del pozo). Se incubaron 10 minutos en PB 0.1 M + Tritón 0.3% + H₂O₂ 3% en oscuridad. Se lavaron 3 veces cada 10 minutos con PB 0.1 M + Tritón 0.3% (lavados habituales). Después se pusieron 2 horas a 65 °C en formamida 50% en SSC 2X. Una vez transcurrido el tiempo se realizó un lavado de 5 minutos con SSC 2X. Para incubarse nuevamente 30 minutos a 37 °C en HCl 1N (Es importante que no pase de este tiempo pues el tejido se daña con facilidad). Se lavó 10 minutos en Borato de Sodio 0.1 M y 3 lavados habituales de 10 minutos cada uno. Se incubó de 12 a 16 horas en anticuerpo primario contra BrdU levantado en ratón 1:500 en solución de bloqueo para posteriormente volverá lavar el tejido de la manera habitual, se incubó 2 horas en anticuerpo secundario contra IgG de ratón 1:500 en solución de bloqueo. Después hacer 3 lavados más de 10 minutos cada uno e incubó 90 minutos en solución A + B. Realizan los últimos 3 lavados con PB 0.1 M + Tritón 0.3% y se incubó 3 minutos en DAB 0.5mg/ml + H₂O₂ + níquel amonio. Detener la reacción con PB 0.1 M.

SOLUCIONES PARA INMUNOHISTOQUÍMICA DE BRDU

Solución A (2L)

NaH₂PO₄ 48 gr.
Agua MilliQ 2 L

Solución B (2L)

NaHPO₄ 56.8 gr.
Agua MilliQ 2 L

Buffer de fosfatos (PB) 0.1 M (1L) pH 7.4

Solución A 95 ml
Solución B 405 ml
Agua MilliQ 500 ml

PB 0.1 M + Tritón 0.3% (500ml)

PB 0.1 M 498.5 ml
Tritón X-100 1.5 ml

PB 0.1 M + Tritón 0.3% + H₂O₂ 3% (15ml)

PB 0.1 M + Tritón 0.3% 13.5 ml
H₂O₂ 30% 1.5 ml

SSC 20X (100ml) pH 7 Filtrar

NaCl 17.5 gr.
Citrato de Sodio 8.8 gr.
Agua MiliQ 100 ml

SSC 2X (20ml)

Agua MiliQ 18 ml
SSC 20X 2 ml

Formamida 50% en SSC 2X (15ml)

SSC 2X 7.5 ml
Formamida 7.5 ml

HCl 2N (50ml)

Agua MiliQ 41.8 ml
HCl 37.5 % (p/p) 8.2ml

HCl 1N (15ml)

Agua miliQ 7.5 ml
HCl 2N 7.5 ml

Borato de Sodio 0.1M (100ml) pH 8.5

Borato de Sodio	3.81gr.
Agua MiliQ	100 ml

A+B (10 ml)

Reactivo A	25µl
Reactivo B	25µl
PB 0.1M+Tritón 0.3%	9.95 ml

Solución de Bloqueo I (20ml)

Suero de caballo	1 ml
PB 0.1M+Tritón 0.3%	19 ml

Solución de Bloqueo II (100ml)

Albumina	3 gr.
PB 0.1 M	90 ml

Filtrar

Azida de sodio (antimicótico)	0.025 gr.
Tritón X-100	100µl

Aforar a 100ml con PB.

Guardar a 4°C

DAB

1gota de reactivo del KIT de diaminobencidina por cada 2.5 ml de solución.