



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

Evaluación de la eficacia de la administración crónica del agonista dopaminérgico D₃ 7-OH-DPAT asociada a la transfección del gen para BDNF como alternativa de tratamiento de la enfermedad de Parkinson en el modelo experimental inducido por inhalación de Manganeseo.

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:

MARÍA TERESA IBARRA GUTIÉRREZ



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

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A mis padres Fidel Ibarra y Teresita Gutiérrez

A mi mejor amiga, mi hermana Fernanda Ibarra

A mi mejor amigo y compañero de viaje Hector Cayetano

AGRADECIMIENTOS.

A mis padres Teresa y Fidel, por su esfuerzo para darme las mejores bases, por su apoyo incondicional y alentarme siempre a luchar. Mi vida no sería nada sin su existencia. Gracias por TODO.

A mi hermana Fernanda, por su escucha y consejo. Siempre Juntas.

A mi mejor amigo y compañero de viaje Hector, porque me recuerda "Que todo se soluciona solo" mientras rockanrolea...jejeje porque me quieres siempre.

A mi asesora la Dra. Verónica Anaya, por su apoyo y guía, sobre todo por permitirme aprender de ella.

A mis sinodales la Dra. María Rosa, Dra. Laura Colín, Dr. José Luis y Mtro. Enrique, por cada valiosa aportación y consejo para este proyecto y para mi formación académica.

Al laboratorio del Dr. Jorge Aceves, Arturo, Vale, Alina, Laura, Paty, Luis Fernando por su aporte y ayuda que recibí para la realización de este proyecto.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Monse, Ari, Fernando, Abraham, Ana, Javier, Chucho, Paty por el gran equipo que hemos formado y por las risas.

A las Damitas de los Viernes, por compartir la pasión por aprender y que trascendió más allá de lo académico, se volvió una amistad.

A mis amigos de la carrera Lizbeth, Ana Karen, Nayeli, David, Daniel, Abraham por las risas, consejos, experiencias compartidas, una vida se marca por las personas que caminan a tu lado.

A mis amigos O.P por la hermandad que nos une, y me acompaña siempre.

A mis amigos Gris y Pablo que a pesar del tiempo y la distancia nos hemos mantenido juntos, compartiendo etapas y apoyandonos incondicionalmente.

A mi amiga de la vida Iliana que hemos tenido la oportunidad de crecer juntas, gracias por cada palabra.

El apoyo financiero para la realización del trabajo de investigación: Evaluación de la eficacia de la administración crónica del agonista dopaminérgico D3 7-OH-DPAT asociada a la transfección del gen para BDNF como alternativa de tratamiento de la enfermedad de Parkinson en el modelo experimental inducido por inhalación de Manganeseo, se obtuvo gracias a los proyectos PAPIIT-DGAPA - UNAM IN215114, IA202214-2 y PAPCA-Iztacala UNAM-2014-16 y PAPCA-Iztacala UNAM 2014-18.

ABREVIATURAS.

EP	Enfermedad de Parkinson	OH⁻	Radical hidroxilo
GB	Ganglios basales	ROS	Especies reactivas de oxígeno
SNC	Sustancia negra compacta	AMPC	Adenosin monofosfato ciclico
NC	Núcleo caudado	LB	Cuerpos de Lewy
GP	Globo pálido	NEM	Neuronas espinosas medianas
P	Putamen	6-OHDA	6-Hidroxidopamina
NST	Núcleo subtalámico	MPTP	Metil-fenil tetrahidropiridinium
GPe	Globo pálido externo	MPP⁺	Ión 1-metil-4fenil-2,3-dihidropiridinium
GPI	Globo pálido interno	PQ	1,1-dimetil-4,4-dipiridinio
AVT	Area ventral tegmental	Mn	Manganeso
SNC	Sistema nervioso central	Mn²⁺	Ion manganeso
NE	Núcleo estriado	Mn³⁺	Ion mangánico
DA	Dopamina	L-DOPA	Levo-dihidroxi-fenilalanina
TH	Tiroxina Hidroxilasa	BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
DMT-1	Transportador de metales divalentes 1	GDNF	Factor neurotrófico derivado de células gliales
MAO	Monoaminoxidasa	NGF	Factor de crecimiento nervioso
NO	Oxido nítrico	D3	Receptor de dopamina D3
ONOO⁻	Anion peroxinitrito	7-OH-DPAT	7-hidroxi- <i>N,N</i> -di- <i>n</i> -propil-2-minotetralina
H₂O₂	Peroxido de hidrógeno	hGDNF	GDNF humano (gen)
pADN	Acido desoxirribonucleico plásmido	NT	Neurotensina
PLL	Poli-L- lisina	MAPK	Proteina cinasa activada mitógena
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimeras con transcriptasa inversa	PI-3K	Fosfoinositol
LTP	Potenciación a largo plazo	PLCγ	Fosfolipasa C
TG	Terapia genica	CREB	cAMP response element-binding
EMG	Electromiografía	TrkB	Receptor de BDNF
PET	Tomografía por emisión de positrones	pTrkB	TrkB fosforilado

ÍNDICE

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	9
ENFERMEDAD DE PARKINSON	10
Disfunción mitocondrial.	
Factores ambientales.	
Factores genéticos.	
Estrés oxidativo.	
Disfunción mitocondrial.	
NEUROANATOMÍA DE LOS GANGLIOS BASALES EN LA EP	18
Anatomía Ganglios Basales.	
Conexión entre Ganglios Basales y Dopamina.	
Función de los Ganglios Basales.	
Neuroquímica de la EP	
MODELOS EXPERIMENTALES DE LA EP	24
MPTP.	
6-OHDA.	
ROTENONA.	
PARAQUAT.	
Mezcla de Manganeseo.	
TRATAMIENTOS	36
Quirúrgicos.	
Talamotomía.	
Palidotomía.	
Estimulación cerebral.	
Trasplante de tejido.	
Trasplante de tejido fetal.	
Factores Tróficos.	
BDNF.	
Receptor dopaminérgico D3.	
Interacción BDNF-D3.	
Transfección del gen para BDNF	
INTEGRIDAD DEL SISTEMA	50
Espinas Dendríticas.	
Importancia de la reinervación de las espinas dendríticas en la EP.	
JUSTIFICACIÓN	54
HIPOTESÍS	55
OBJETIVO GENERAL	55
Objetivos particulares.	
DISEÑO EXPERIMENTAL	56
METODOLOGÍA	58
Material y Métodos	
RESULTADOS	66
Características de las alteraciones motoras inducidas por el modelo de Mn.	
Recuperación del Sistema.	
Análisis citológico	
DISCUSIÓN	79
Características de las alteraciones motoras inducidas por la inhalación de la mezcla de MnCl ₂ -Mn(OAc) ₃ como modelo de la EP.	
Recuperación del Sistema motor y estructural por el co-tratamiento 7-OH-DPAT y BDNF.	
CONCLUSIÓN	92
PERSPECTIVAS	93
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
ANEXO	123

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo que se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta, induciendo una sintomatología motora (bradiscinesia, rigidez muscular, temblor en reposo y alteraciones de la postura) que incapacita al enfermo para realizar actividades cotidianas. A la fecha distintos tratamientos, como la levodopa, retrasan pero no curan la enfermedad; al cabo de 4 o 5 años comienzan las manifestaciones adversas del medicamento (las que pueden ser más catastróficas que la propia enfermedad), como los movimientos involuntarios (discinesias). Es por lo que investigaciones recientes han explorado la relación que existe entre las neuronas dopaminérgicas y el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF). El BDNF es sintetizado por las neuronas dopaminérgicas y es el responsable de la síntesis de los receptores D3 durante el desarrollo y mantiene su expresión en el adulto. La activación de los receptores D3 por agonistas específicos protegen a las neuronas de la degeneración inducida, por lo que se considera que hay una relación sinérgica entre los receptores D3 y el BDNF, de dicha relación suponemos se obtendría una terapia neuroprotectora. Sin embargo, los modelos animales empleados para recrear la enfermedad de Parkinson no son los ideales, aún cuando exhiben muchos de los rasgos característicos de la enfermedad. En este estudio se utilizó el modelo de inhalación de la mezcla de Cloruro de Manganeso ($MnCl_2$) y Acetato de manganeso $Mn(OAc)_3$. Los animales (ratas macho Wistar) se expusieron a la mezcla 3 veces a la semana durante una hora y se realizaron pruebas motoras (campo abierto, pasarela y rotarod) a los 3 y 6 meses de exposición para medir el desempeño motor así como el daño progresivo inducido por el modelo. Posteriormente se administró el tratamiento con el agonista D3 (7-OH-DPAT) mediante una bomba de microdifusión y la transfección del gen para BDNF en las neuronas dopaminérgicas de la SNc, evaluando su efecto mediante la recuperación en el desempeño motor, y si la recuperación está asociada a la preservación neuronal por la prueba inmunohistoquímica TH, y reinervación dopaminérgica nigroestriatal mediante la recuperación de espinas dendríticas en las neuronas espinosas medianas (NEM) estriatales.

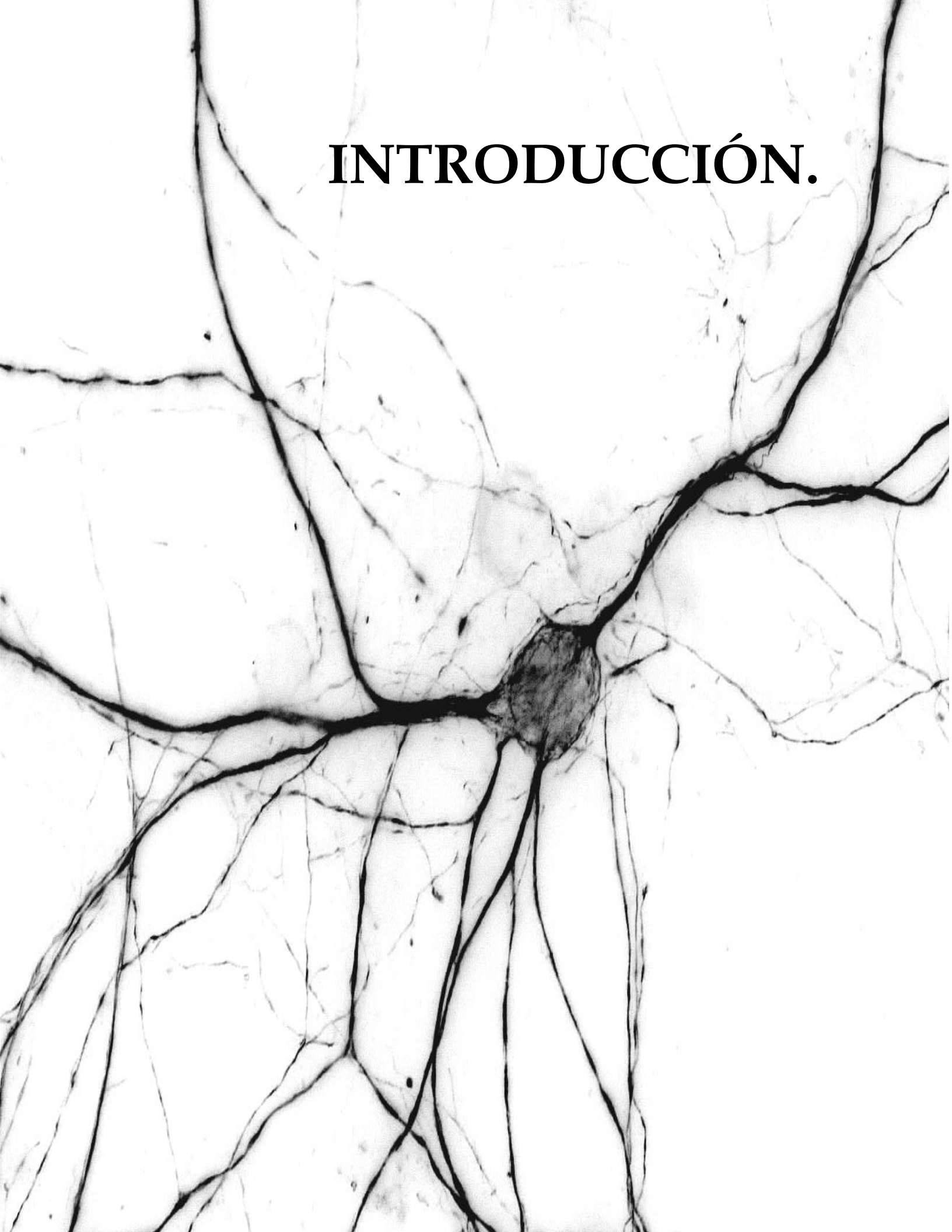
A partir de los resultados consideramos que el modelo de Mn es óptimo para reproducir la enfermedad de Parkinson debido a que es bilateral, no invasivo, crónico y progresivo; reproduce las conductas sintomáticas (hipocinesia e inestabilidad postural) y emocionales (ansiedad) e induce la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNc del 65.95% y espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del 82.2%. Por su parte el tratamiento con 7-OH-DPAT y BDNF recupera la coordinación motora evaluada con la prueba de rotarod. El empleo de 7-OH-DPAT y la transfección de BDNF preserva las neuronas dopaminérgicas de la SNc y se recuperan las espinas dendríticas de las NEM.

ABSTRACT.

Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder characterized by the loss of dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta, and the development of motor symptoms (bradykinesia, muscular rigidity, resting tremor and postural changes) that incapacitates the patient to perform daily activities. To date, various treatments, such as levodopa, don't cure the disease; after 4 or 5 years starting medication adverse events appear (which can be more catastrophic than the disease itself), such as involuntary movements (dyskinesias). Recent research has reported the relationship between dopaminergic neurons and Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF). BDNF is synthesized by dopaminergic neurons and is responsible for the synthesis of D3 receptors during development and maintains its expression in the adult brain. Activation of these receptors by specific agonists protect neurons from degeneration, thus, it is considered that there are a synergistic relationship between BDNF and D3 receptors, it assumed that relationship would be obtained neuroprotective therapy. At present animal models for Parkinson's disease are not ideal, although exhibit some of the characteristic features of the disease no one mimics the alterations observed in the disease. Manganese inhalation model (Mn), the inhalation of the mixture of manganese chloride ($MnCl_2$) and manganese acetate $Mn(OAc)_3$ was used in this report. The animals (male Wistar rats) were exposed to the mixture one hour 3 times a week, and the motor tests used (open field, rotarod and runway) were conducted to measure the performance as well as the progressive damage at 3 and 6 months of exposure. Subsequently the D3 agonist treatment (7-OH-DPAT) by a pump microdiffusion and BDNF gene transfection for dopaminergic neurons in the SNc were administered and then we evaluated its effect measuring the animals performance, and if the recovery was associated with neuronal preservation of TH⁺ neurons and dendritic spines in the neostriatal medium spiny neurons.

From the results we believe that the model is optimal to reproduce Parkinson's disease because it is bilateral, noninvasive, chronic and progressive; with symptomatic behavior (hypokinesia and postural instability) and emotional (anxiety), and induces great loss of dopaminergic neurons of the SNc (65.95%) and dendritic spines of the medium spiny neurons (82.2%). Treatment with 7-OH-DPAT and BDNF recovers motor coordination evaluated with rotarod test. 7-OHDPAT and BDNF preserve dopaminergic neurons in the SNc, and retrieve the dendritic spines of MSNS.

INTRODUCCIÓN.



ENFERMEDAD DE PARKINSON.

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo que se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta (SNc) por lo que disminuyen los niveles de dopamina (DA) en los núcleos inervados por ésta, principalmente el núcleo estriado que esta relacionado con la actividad motora (Vingerhoets, 1997).

Clínicamente, se puede considerar que los pacientes padecen EP cuando presentan las siguientes características (Otero-Siliceo et al., 1996):

- **Bradicinesia:** es la lentitud del movimiento que impide o dificulta los movimientos sucesivos o simultáneos. Al principio se manifiesta como dificultad al momento de realizar tareas motoras finas, como abrocharse los botones, escribir, entre otras.
- **Rigidez muscular:** es causada por el aumento del tono muscular que afecta a todos los grupos musculares como flexores, extensores, músculos axiales o de extremidades y generalmente ocurre en fases más avanzadas de la enfermedad.
- **Temblor en reposo:** se caracteriza por ser un temblor que ocurre en reposo con frecuencia de alrededor de 3-4 Hz, que se agrava con las emociones o el estrés. Principalmente afecta las manos, pero también es frecuente en las extremidades inferiores. Suele iniciar en una mano y con el tiempo puede afectar a la otra extremidad. Este temblor de la mano provoca la conocida postura de “cuenta de monedas”.
- **Alteración de la postura:** se presenta inclinación de la cabeza en posición erecta, tronco dirigido hacia adelante, hombros caídos, brazos flexionados, manos delante del cuerpo y rodillas flexionadas.

Las primeras descripciones hechas sobre la EP fueron realizadas por el médico y escritor Sylvius de le Boe, en el siglo XVII, quien realizó varios estudios de los diferentes temblores y distinguió dos tipos: uno que aparecía en reposo (*tremor coactus*) y otro cuando el paciente realizaba movimientos voluntarios (*motus tremulous*). François Boissier de Sauvages, un siglo después, añadió que los temblores de reposo, a los que llamó *palpitaciones*, desaparecían cuando el paciente intentaba hacer algún movimiento (García et al., 2008).

La primera descripción formal de esta enfermedad la realizó el médico londinense James Parkinson en 1817, quien la denominó Parálisis Agitante en su publicación "Essay on the shaking palsy". Su descripción fue incompleta, el mérito fue relacionar los síntomas aislados con una sola enfermedad. Jean-Martin Charcot, fue quien a finales del siglo XIX denominó a la "parálisis agitante" enfermedad de Parkinson, en honor de quien primero la describió. En 1919, Tretiakoff describió la asociación entre la enfermedad y alteraciones en la sustancia nigra, como la pérdida y despigmentación neuronal (García et al., 2008).

Carlsson y Hornikewicz, a finales de 1966, describieron que en el cerebro de los enfermos con EP había poca concentración de DA, serotonina y noradrenalina, principalmente en el cuerpo estriado y en la SNc (Yurek y Sladek, 1990; Gibb y Rieder, 1991.)

La evolución de la enfermedad causó gran expectación por lo que Charcot en 1880 afirmó que la EP era el quinto padecimiento más frecuente en pacientes mayores de 40 a 50 años. Gowers en 1888, reportó que la edad de aparición de esta enfermedad era posterior a los 40 años de edad y aseguró que los 52 años era la edad exacta del comienzo independientemente del sexo (Hoehn y Yahr, 1987). Asimismo, Purves Steward en 1898 observó que la enfermedad aparecía de los 22 a los 71 años (Alanís, 1996), por lo que la EP se clasifica como juvenil cuando el

inicio es entre los 20 y 50 años de edad (aunque se relaciona más con aspectos genéticos), la edad más común de aparición es entre los 55 y 65 años, sin embargo puede aparecer entre los 70 y 80 años de edad considerándose como tardía (Giround, 2004).

Las estadísticas oficiales sobre pacientes con EP en México tienen un severo atraso y el dato más reciente es de hace varios años. En 1997 se estimaba que había entre 500 y 600 mil personas que padecían esta enfermedad, sin embargo, en 1996 la Asociación Mexicana de Parkinson A.C. reportó que en nuestro país existen al menos dos millones de personas afectadas por este padecimiento.

ETIOLOGÍA.

La etiología de la enfermedad es desconocida, por lo que se han establecido diversas hipótesis para tratar de explicar el origen de esta enfermedad, como:

DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL.

El papel de la mitocondria durante el desarrollo de la EP es fundamental. Estudios *post mortem* de tejido nervioso de humanos se ha encontrado disminución en la actividad del complejo I (NADH -ubiquitina-reductasa) y IV (citocromo C oxidasa) de la cadena respiratoria mitocondrial en la Substancia nigra, de tal manera que disminuye la actividad energética y se produce muerte celular, hay incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS), susceptibilidad a la excitotoxicidad por glutamato, incluso se ha señalado que es probable que el defecto del complejo I produzca apoptosis (DiMauro, 1993; Olanow, 1999; Henzea et al., 2005).

FACTORES AMBIENTALES.

Las enfermedades neurodegenerativas más frecuentes se relacionan con la acción e interacción de diversos factores ambientales, que actúan como factores de susceptibilidad o precipitantes (Tabla.1). Algunos de ellos podrían actuar ya desde etapas tempranas de la vida o interaccionar con factores genéticos (Camdelacreu, 2012).

Diversos estudios epidemiológicos han relacionado varios pesticidas y herbicidas de uso agrícola o doméstico en la aparición de la EP, tanto compuestos naturales derivados de plantas (p.ej. rotenona) como sintéticos (p.ej. paraquat y organofosforados, como el paratión), que ejercerían su efecto a través del contacto directo con la piel, la ingesta de alimentos o agua contaminados, o la aspiración de aerosoles. Así como la exposición prolongada a determinados metales, como el mercurio, plomo, manganeso (manganismo) o cobre, que también podrían ser un factor de riesgo para el desarrollo de la EP (Evan y Villanueva, 2005).

	EP	EA
Aumentan riesgo, evidencia fuerte	Pesticidas	Pesticidas HTA (edad media) Colesterol (edad media) Hiperhomocisteinemia Tabaco TCE grave
Aumentan riesgo, evidencia débil	Leche (hombres) Ingesta alta de hierro Anemia crónica	Aluminio (agua potable) CEM (redes eléctricas) DM e hiperinsulinemia Obesidad (edad media) Alcohol (excesivo) Anemia crónica
Reducen riesgo, evidencia fuerte	Hiperuricemia Tabaco Café	Alcohol (moderado) Ejercicio físico THS (perimenopáusica) Reserva cognitiva
Reducen riesgo, evidencia débil	Vitamina E Alcohol Té Ejercicio físico vigoroso AINE	Dieta mediterránea Café AINE

Tabla.1. Factores de riesgo más importantes para EP y EA (Camdelacreu, 2012).

FACTORES GENÉTICOS.

El Parkinson de carácter genético se ha relacionado con mutaciones en ciertos genes responsables de la activación de proteínas responsables del mantenimiento de las neuronas DA. Estos genes son: PARK1, PARK2, PARK5, PARK6, PARK7 y PARK8.

El PARK1 (Tabla.2) codifica para la alfa-sinucleína, la mutación en este gen tiene efectos neurotóxicos en las neuronas DA de la SNc debido a que la alfa-sinucleína forma fibrillas tóxicas llamadas “cuerpos de Lewy” (Morgado et al., 2007; Elizondo-Cárdenas et al., 2011), este tipo de Parkinson se caracteriza por el inicio temprano, con progresión rápida, alta prevalencia de demencia y otras alteraciones psiquiátricas (Elizondo-Cárdenas et al., 2011). El PARK2 (Tabla.2) codifica para la proteína parkina, responsable del Parkinson temprano o juvenil con progresión lenta (Xiromerisiou et al., 2010). La parkina se localiza de forma preferencial en las sinapsis y su principal función es de ubiquitina ligasa, importante en la vía de degradación de la proteína-ubiquitina (degradación de proteínas) provocando la degeneración en las células de la SNc con ausencia de cuerpos de Lewy (Elizondo-Cárdenas et al., 2011). El PARK8 (Tabla.2) codifica para la proteína dardarina o LRRK2 (*leucine-rich repeat kinase 2*) la cual posee actividad de cinasa que permite interactuar con la proteína parkina se asocia a la incapacidad de mantener la estabilidad de las neuronas DA (Mata et al., 2005; Llaodó et al., 2006; Zabetian et al., 2006). El PARK6 codifica para la proteína cinasa PTEN 1 y el gen PARK7 que codifica para la proteína DJ-1, ambas proteínas están implicadas en procesos de neuroprotección por lo que la alteración de estas proteínas induce disfunción mitocondrial y ROS. A pesar de ello, el conocimiento sobre las implicaciones genéticas es limitado.

Locus	proteína	Función biológica
<i>PARK1</i>	α -SYN	Tráfico vesicular entre retículo endoplasmático y aparato de Golgi; y entre compartimentos sinápticos
<i>PARK2</i>	parkina	Ubiquitina ligasa (E3)
<i>PARK5</i>	UCHL1	Esterasa carboxilo-terminal de ubiquitina L1
<i>PARK6</i>	PINK1	Proteína quinasa mitocondrial, estrés oxidativo?
<i>PARK7</i>	DJ-1	Respuesta a estrés oxidativo?
<i>PARK8</i>	LRRK2	Proteína quinasa

Tabla.2. Función biológica de moléculas asociadas a EP hereditario (tomado de Jaimez, 2007).

ESTRÉS OXIDATIVO.

Los mecanismos de óxido-reducción desempeñan un papel importante en la fisiología de la célula. Los radicales libres (RL) y las ROS son normalmente generados por el metabolismo celular para la obtención de energía. Bajo condiciones patológicas, existe el estado de estrés oxidativo donde el metabolismo celular aumenta la producción de RL y ROS (Fig. 1) (Pérez y Arancibia, 2007).

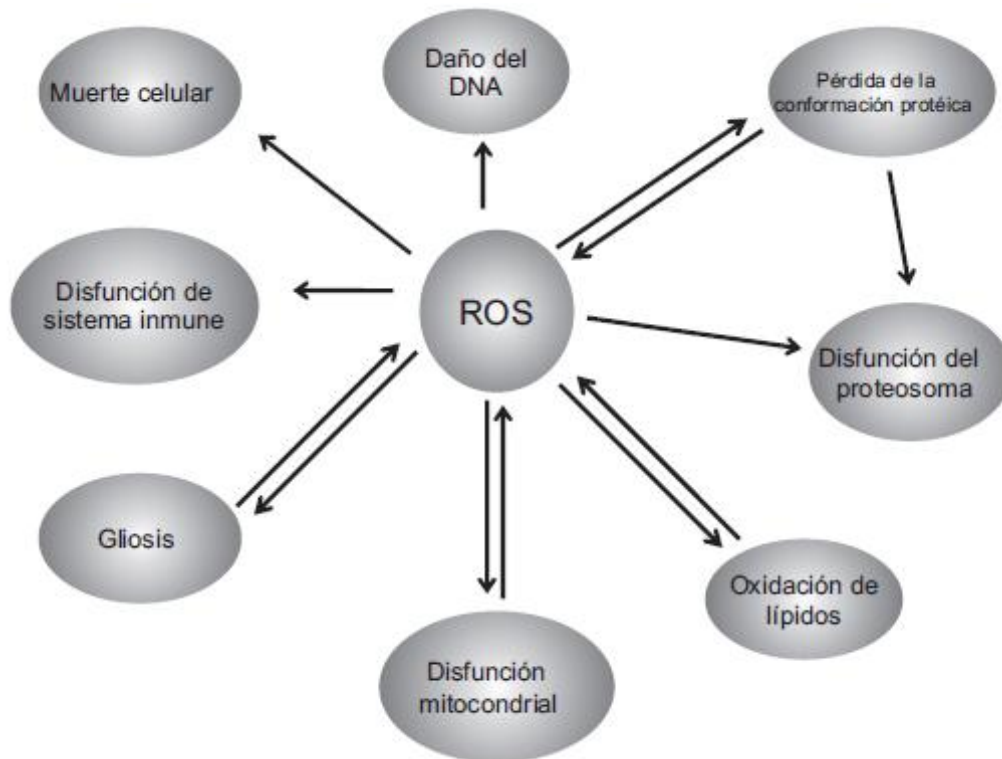


Figura.1. Efectos de las especies reactivas de oxígeno (Tomado de Pérez y Arancibia, 2007).

Existen evidencias de que el principal causante del deterioro de las neuronas dopaminérgicas en la SNc se relaciona con el alto estado oxidativo del metabolismo de la DA (Hattori et al., 2009).

Algunas de las propuestas sobre el mecanismo neurodegenerativo de la DA son:

- La DA de la SNc y el NE es catabolizada por la enzima monoamino oxidasa (MAO), que se localiza en la membrana externa de la mitocondria. Esta reacción da como resultado la producción de O_2^- , además de H_2O_2 (Graham, 1978; Gal et al., 2006). Otro derivado de la DA es el 1,2,3,4 tetrahidropapaverolina (THP), que se obtiene del catabolismo enzimático. está relacionado con la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. Los derivados del metabolismo de la DA actúan como pro-neurotoxinas en el desarrollo de la EP (Soto-Otero et al., 2006).

La DA es una molécula con un grupo catecol, el cual puede oxidarse con facilidad de manera no enzimática para formar una serie de especies electroquímicas tipo quinoides. El paso inicial en la oxidación de la DA involucra reaccionar con el oxígeno molecular para formar DA o quinona y dos moléculas de anión superóxido. La formación de los aniones superóxido durante la auto-oxidación de la DA lleva a la producción de H₂O₂ por la dismutación del superóxido (Fig.2) (Mendez-Alvarez y Soto-Otero, 2004).

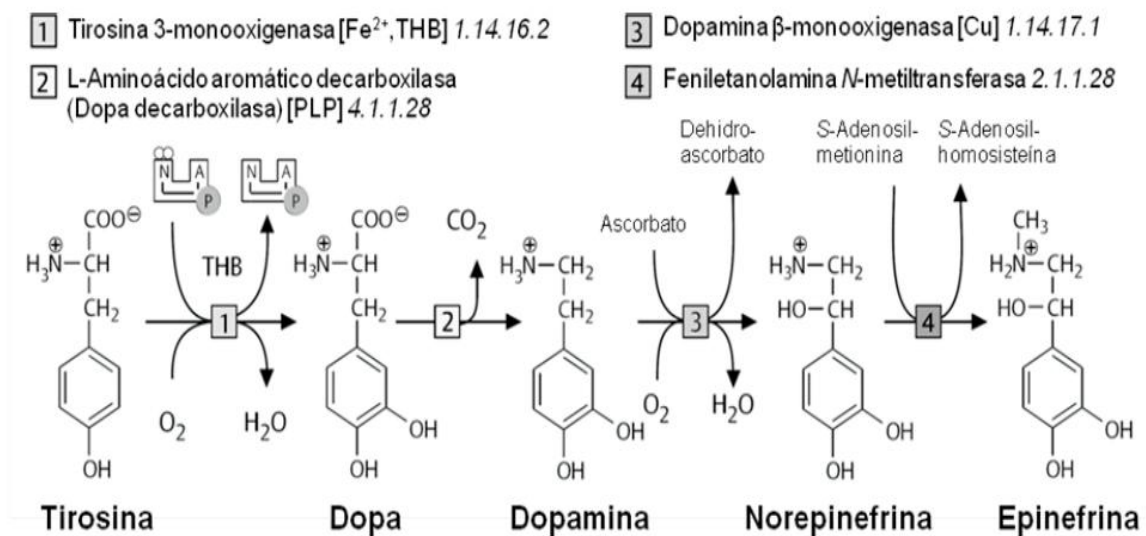


Figura.2. Biosíntesis de las catecolaminas (Modificado de Koolman y Rohem, 2005).

Como se señaló previamente la etiología de la EP es desconocida y posiblemente multifactorial, lo que sí es un hecho conocido es que la EP se manifiesta cuando se ha disminuido la concentración de DA en un grupo de núcleos interconectados entre sí y conocidos como ganglios basales.

NEUROANATOMÍA DE LOS GANGLIOS BASALES.

La corteza cerebral se encuentra interconectada con estructuras sub-corticales destacando: el Cerebelo y los ganglios basales (GB).

ANATOMÍA GANGLIOS BASALES.

Los ganglios basales constituyen una gran parte de las estructuras subcorticales, su principal función es la de conectar el córtex cerebral con los sistemas neuronales que efectuarán los movimientos (González et al., 2011). Este grupo de núcleos incluyen: el núcleo estriado (NE) dividido en núcleo caudado (NC) y putamen (P) (en primates), el globo pálido externo e interno (GPe/GPi), núcleo subtalámico (NST) y la sustancia nigra reticular (SNr) y compacta (SNc) (Fig.3) (Gilmans y Winans, 1994).

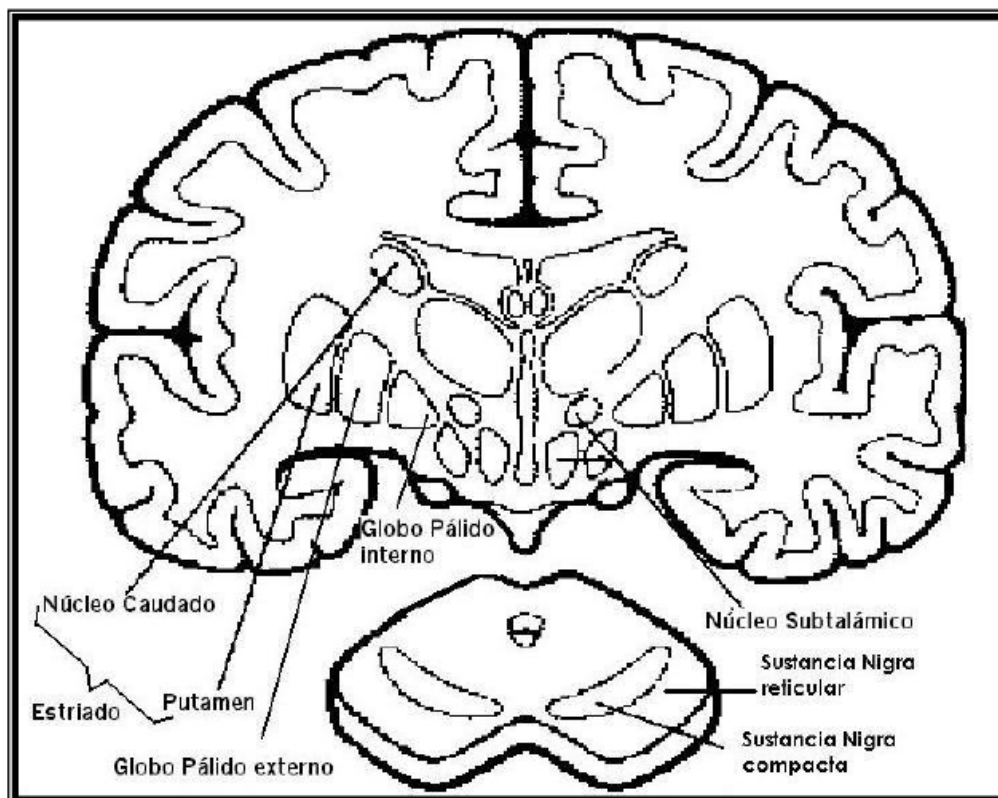


Figura.3. Esquema ganglios basales (Tomado de Bertabet et al., 2002).

Se ha descrito que la parte interna del globo pálido (GPi) o núcleo entopeduncular en roedores- y principalmente la porción reticulada de la sustancia nigra (SNr) actúan como los núcleos de “salida” de los GB. El NST y principalmente el NE como núcleos de “entrada” de los GB.

CONEXIÓN ENTRE GANGLIOS BASALES Y DOPAMINA.

La SN es un conglomerado celular localizado en la región ventral del mesencéfalo, dividido en tres regiones: SNpc (*substantia nigra pars compacta*), SNpr (*substantia nigra pars reticulada*) y SNpl (*substantia nigra pars lateralis*) (Fallon y Moore, 1978, compuesta por dos tipos de neuronas dopaminérgicas y GABAérgicas.

- Las neuronas dopaminérgicas se encuentran principalmente en la SNC, proyectan al caudado-putamen constituyendo la vía nigroestriatal con una topografía inverso-ventral encontrándose en una posición modular entre la actividad de los circuitos (Haber et al., 2000; Margolis et al., 2006).
- Las neuronas GABAérgicas se encuentran en la SNr, proveen sinapsis inhibitorias locales a la SNr y a la SNC, envían proyecciones inhibitorias al tálamo y al colículos superiores; a su vez reciben aferencias inhibitorias GABAérgicas del NE y del GPe y aferencias excitadoras glutamatérgicas del NST (Lin et al., 2010).

La SNr se encuentra ventrolateralmente, y presenta una densidad celular menor así como un abundante neuropilo. (Hopkings et al., 1976; Faull et al., 1978; Beckstead et al., 1979).

La mayor parte de las neuronas de la SNr sintetizan GABA como neurotransmisor (Nitsch y Riesenberg, 1988). Una de sus funciones es la inhibición sostenida de las neuronas del tálamo ventromedial, de las capas profundas del colículo superior y del núcleo pedunculopontino de la formación reticular (Beckstead et al., 1979; DiChiara et al., 1979; Kilpatrick et al., 1980; MacLeod et al., 1980; Beckstead y

Frankfurter, 1982). Es probable que, en condiciones normales, la actividad eléctrica de las neuronas de la SNr esté regulada por las vías aferentes.

La vía aferente más estudiada y documentada es la proyección inhibitoria estriado-nigral, que se origina de la neurona espinosa mediana de naturaleza GABAérgica que se encuentra en el NE (Kim et al., 1971; Fonnum et al., 1978; Beckstead y Frankfurter, 1982; Nitsch y Riesenberger, 1988).

La SNc, está situada dorsomedialmente y contiene los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas que inervan al NE, y a prácticamente todos los núcleos que conforman los ganglios basales, tálamo, corteza frontal y a varios núcleos del sistema límbico.

Los axones dopaminérgicos hacen sinapsis con las espinas dendríticas de las neuronas GABAérgicas del estriado (Freund et al., 1984). Cada neurona dopaminérgica hace aproximadamente 500 000 contactos sinápticos. También se ha reportado la presencia de axones dopaminérgicos en el subtálamo, sin embargo se desconoce si estos axones son colaterales de las fibras que van hacia el estriado o bien si provienen de las neuronas de la SNc (Prensa y Parent, 2001).

FUNCIÓN DE LOS GANGLIOS BASALES.

Una de las funciones principales de los GB es recibir, integrar y procesar la información que viene de corteza, enviarla al tálamo el cual estimula o inhibe la actividad de las áreas frontales motoras de la corteza cerebral, que son las responsables de regular la actividad motora, a través de las vías directa e indirecta, respectivamente (Marolt et al., 2007).

Las conexiones de los ganglios basales se pueden explicar en circuitos intrínsecos (Alexander y Crutcher, 1990; Smith et al., 1998):

- Circuito motor, que proyecta a regiones corticales motoras precentrales del tálamo: núcleos ventral lateral *pars oralis*, ventral anterior *pars parvocellularis* y ventral anterior *pars mangocellularis*.
- Circuito óculomotor, que proyecta a la corteza prefrontal dorsolateral y tálamo.
- Circuito orbitofrontal lateral, que proyecta hacia la corteza orbitofrontal lateral y al tálamo.
- Circuito límbico, que proyecta a la corteza cingulada anterior, a la corteza orbitofrontal medial y al tálamo.

NEUROQUÍMICA DE LA EP.

La dopamina es una catecolamina sintetizada en las neuronas dopaminérgicas a partir de la tirosina; es un neurotransmisor modulador, tiene funciones tanto excitatorias como inhibitorias. Originalmente se consideró que existían solo dos familias de receptores para este neurotransmisor: la familia D1 y sus subtipos D1 y D5 que estimulan la síntesis del cAMP por lo que su acción es excitatoria; y los receptores D2, D3 y D5 que pertenecen a la familia D2, inhiben la síntesis del AMPc dando como resultado un acción inhibitoria (Holligan et al., 2004).

El NE es la principal estructura de los GB que efectúa su acción a través de la vía directa e indirecta. La vía directa o excitadora está conformada por neuronas GABAérgicas (neuronas espinosas medianas de proyección) del NE que proyectan hacia la SNr/GPi. Esta vía es activada por el glutamato (Corteza) y modulada por la dopamina (SNc), esta actividad induce la inhibición de los núcleos de salida de los GB, que por ser también GABAérgica y estar inhibida, desinhibe los núcleos talámicos ventral lateral y ventral anterior. Como resultado, la vía tálamo-cortical es estimulada y los movimientos iniciados corticálmente son facilitados. La vía indirecta o inhibitoria está compuesta por neuronas estriatales (otra población de neuronas espinosas medianas de proyección), que son GABAérgicas y que

proyectan hacia el GPe. La inhibición del GPe desinhibe el NST (formado por neuronas glutamatérgicas de proyección) lo que trae como resultado la excitación de los núcleos de salida de los GB, provocando la inhibición talámica, lo que reduce la estimulación tálamo-cortical de las áreas motoras precentrales resultando en la disminución del movimiento voluntario (Hardman, 1996; Ropper, 2007).

La SNc conforma la inervación dopaminérgica hacia las neuronas espinosas medianas de proyección de ambas vías en el NE modulando su actividad. Las neuronas espinosas medianas de proyección- de la vía directa expresan al receptor D1 y las de la vía indirecta expresan al tipo D2 (Hardman, 1996). La dopamina que se libera en el cuerpo estriado incrementa la actividad de la vía directa y a reduce la de la vía indirecta (Hardman, 1996).

Cuando se presenta la EP, los axones dopaminérgicos, disminuyen como consecuencia de la muerte de las neuronas en la SNc, se produce el incremento de la actividad inhibitoria de la SNr/GPi hacia los núcleos del tálamo, y por consiguiente se reduce la excitación hacia la corteza motora (Fig.4) (Hardman, 1996; Ropper, 2007).

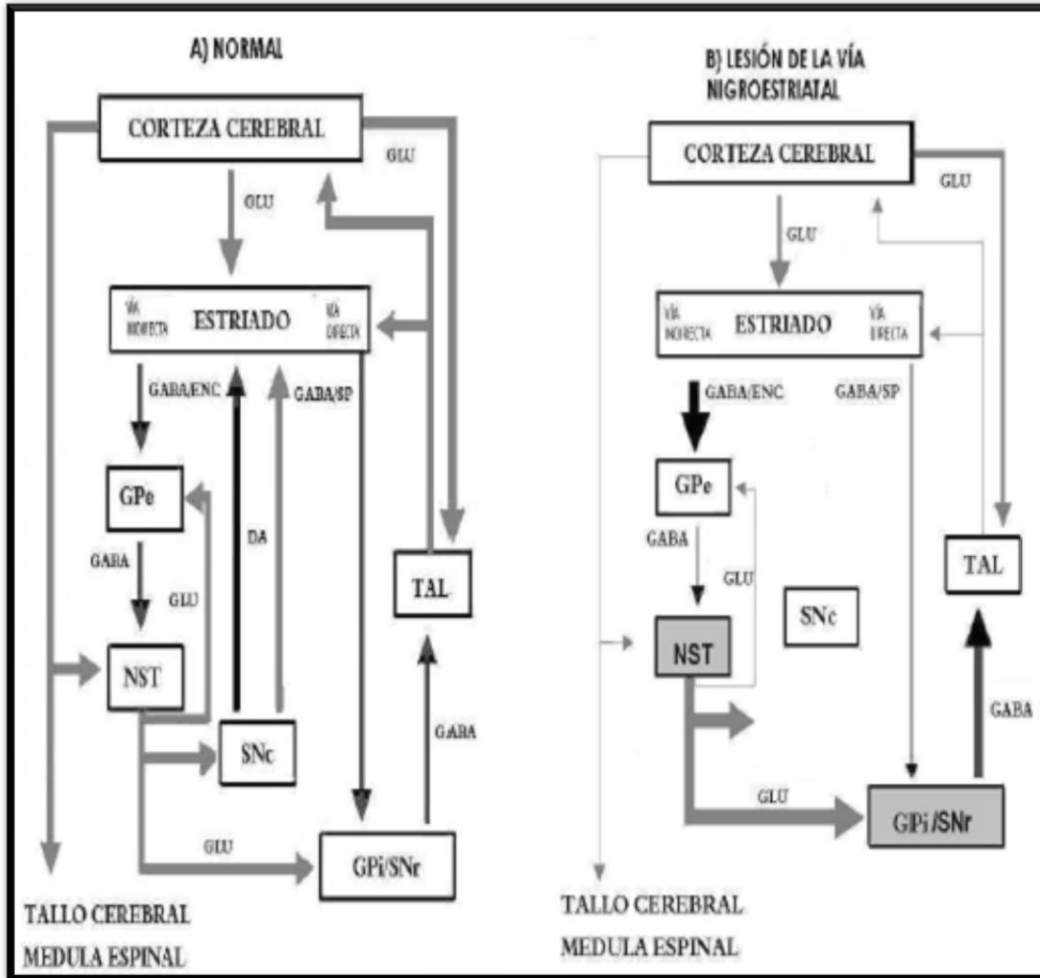


Figura.4. Modelo esquemático de la anatomía funcional del circuito motor corteza ganglios basales-tálamo-corteza, mostrando las vías paralelas directa e indirecta y su alteración durante la disminución de dopamina. (Modificado de Wichmann y DeLong, 1993).

MODELOS DE ENFERMEDAD DE PARKINSON.

Un modelo animal se caracteriza por reproducir las características funcionales, neuroquímicas que asemejen la enfermedad.

Los modelos animales más empleados utilizan roedores para estudiar la enfermedad, ya que pueden fácilmente estar disponibles, son maleables genéticamente, y su costo es relativamente bajo. Hay estudios que han utilizado perros, gatos y primates no humanos para los estudios de la EP, pero las preocupaciones éticas y los costos de este tipo de estudios han limitado su utilidad (Alarcón et al., 2010).

Los modelos animales más frecuentes que se emplean para reproducir la enfermedad, son en base a compuestos químicos tóxicos, que tienen como objetivo interrumpir la vía dopaminérgica nigroestriatal e imitar la deficiencia de DA observada en los pacientes con esta enfermedad, la mayoría de los modelos existentes exhiben muchos de los rasgos característicos de la enfermedad.

Algunos de ellos son:

- MPTP
- 6-OHDA
- ROTENONA
- PARAQUAT
- MANGANESO

En la figura 5 se observa un esquema que muestra algunas de las toxinas de uso más común para producir modelos experimentales de la EP y sus posibles vías de acción.

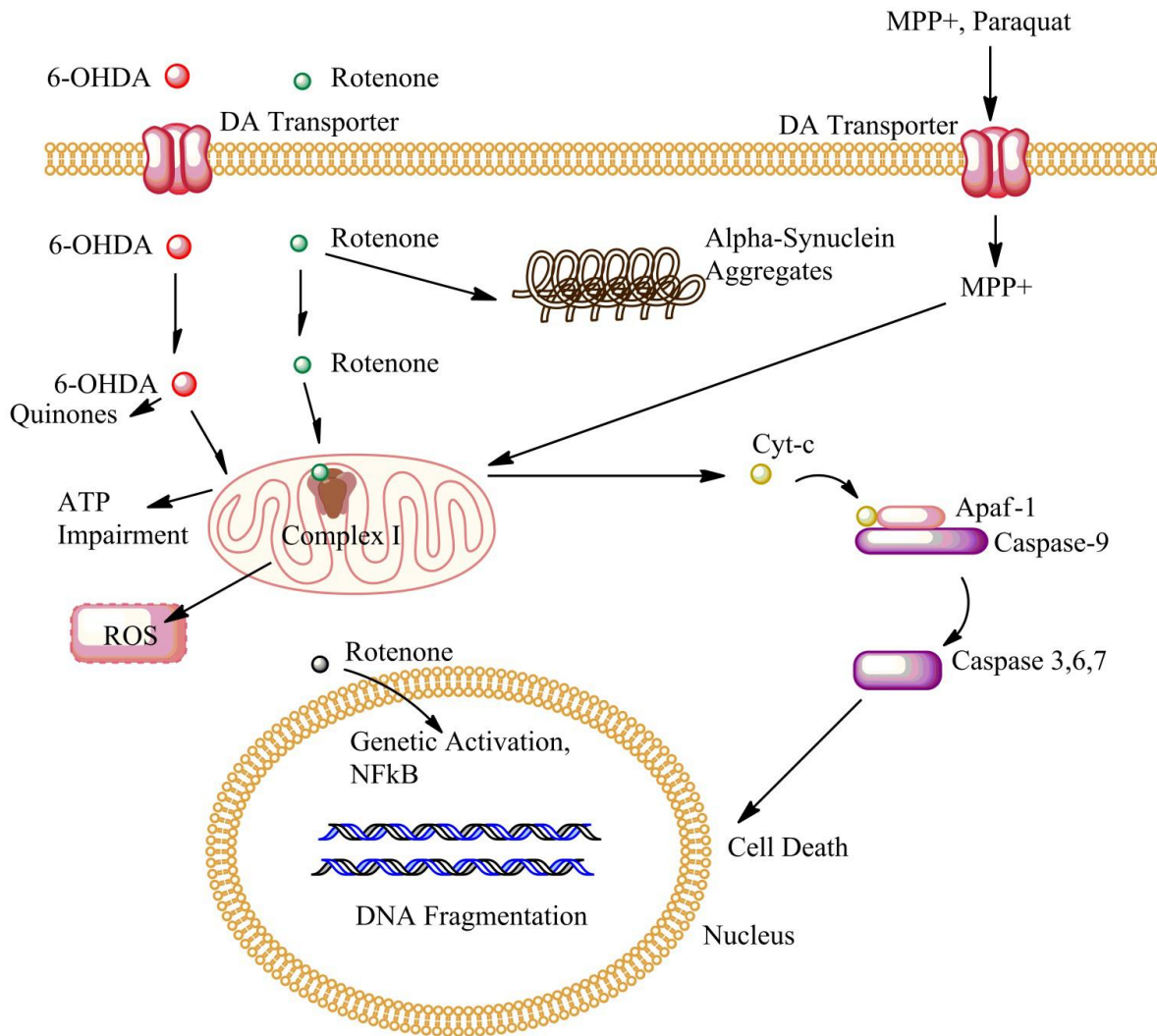


Figura. 5. Los modelos experimentales de EP. Muchas moléculas se utilizan actualmente en modelos celulares y animales de EP, incluyendo los pesticidas como paraquat o rotenona y neurotoxinas tales como 6-OHDA y MPP⁺. El paraquat, 6-hidroxidopamina (6 - OHDA) y MPP⁺ a traviesan la membrana celular fácilmente a través del transportador de dopamina (DA) induciendo de este modo la formación de agregados de α -sinucleína y disfunción mitocondrial, con la posterior producción de ROS y quinonas. (Tomado de Cabezas, 2013).

MPTP.

A principios de los años 80, algunos heroinómanos en California se vieron expuestos a MPTP, que se empleó en el procesamiento de heroína sintética y desarrollaron en pocas semanas un síndrome clínicamente idéntico a la EP (Langston et al., 1983).

El 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)(Fig.6) es un compuesto químico que puede atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica debido a que la enzima monoamino oxidasa (MAO-B) convierte al MPTP en 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinio (MPDP⁺), que a su vez se transforma en 1-methyl-4-phenilpyridinium (MPP⁺) por oxidación espontánea en los astrocitos. El MPP⁺ sale de los astrocitos siendo selectivamente incorporado por las neuronas dopaminérgicas a través del transportador de dopamina (DAT), donde ejerce su acción neurotóxica a través de la inhibición del complejo I mitocondrial (Przedborski et al., 1991).

El MPP⁺ es una potente toxina que produce la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNc cuando se administra directamente en el NE (Schildknecht et al., 2009), por la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que ocasiona la generación de ROS, y disminución del potencial redox y por lo tanto de la síntesis de ATP (Przedborski et al., 1991).

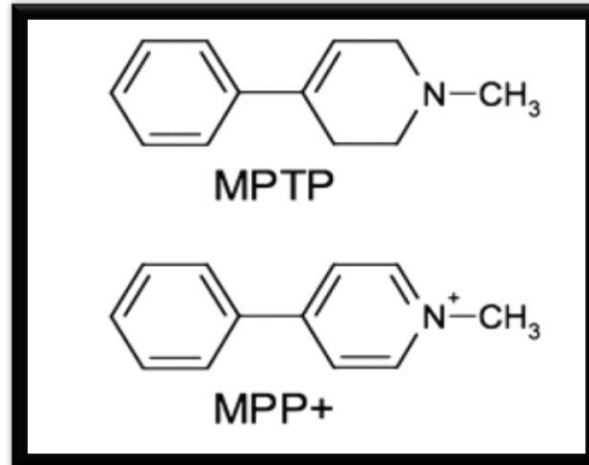


Figura.6. Estructura química del MPTP (Tomado de Alarcón et al., 2010).

Las limitaciones de este modelo es que no se forman LB, que son inclusiones de proteínas características de la EP (Alarcón et al., 2010), y la respuesta diferenciada entre especies animales; como en la rata, que son resistentes a la administración sistémica de MPTP debido a que ha recuperación neuronal al poco tiempo de la administración (Schildknecht et al., 2009).

Se ha reportado que el modelo con MPTP induce alteraciones conductuales como rigidez muscular, bradicinesia, temblor en reposo y disminución de la actividad espontánea. Los síntomas parkinsonianos son inicialmente transitorios, pero se hacen permanentes con la administración repetida de MPTP. Los mecanismos implicados en la recuperación espontánea que experimentan estos animales no se conocen, pero pueden estar relacionados con una modificación transitoria de otros sistemas de neurotransmisión. Por lo tanto, es posible que la vulnerabilidad diferencial que se presenta en los diferentes organismos sea dependiente de factores relacionados con la distribución y su metabolismo (Pothakos et al., 2009).

6 - OHDA.

En pacientes con la enfermedad de Parkinson se detectó la presencia de 6-Hidroxidopamina (6-OHDA) endógena en muestras de orina, por lo que se sugirió como componente involucrado en la enfermedad. Esta neurotoxina es una de las más utilizadas en el desarrollo de modelos experimentales.

En 1968 Ungerstedt publica el primer reporte donde se muestra que la inyección intracerebral de 6-OHDA en la SNc de roedores es capaz de matar a las neuronas dopaminérgicas y producir un desbalance dopaminérgico con manifestaciones motoras, produciéndose un modelo experimental de la EP (Ungerstedt, 1968).

La 6-OHDA (Fig. 7) es incorporada a la neurona por el sistema de recaptura de DA de alta afinidad, actúa inhibiendo el complejo I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial, de este modo reduce la generación de ATP (Glinka et al., 1998; Lotharius et al., 1999), además causa la producción de ROS, $O^{\cdot-}$, OH y H_2O_2 , induciendo subsecuentemente la degeneración de las terminales axónicas de los cuerpos celulares. Se estima que la vida media de la 6-OHDA en condiciones fisiológicas es de 38 minutos (Otero- Siliceo, 1996; Tirmenstein et al., 2005).

Debido a que la neurotoxina no puede cruzar la barrera hematoencefálica, se administra a través de una inyección intracerebral ocasionando la pérdida selectiva de neuronas catecolaminérgicas, esta especificidad se debe a su alta afinidad por el sistema de transporte de catecolaminas, la pérdida de neuronas oscila entre el 60% - 70%. Generalmente la lesión es unilateral y la inyección se puede hacer en el haz medial del cerebro anterior, SN o en el NE (Emborg et al., 2004).

Los animales con lesión unilateral por 6-OHDA presentan después de la cirugía actividad rotatoria ipsilateral a la lesión que se mantiene durante las 24 horas siguientes (Bertabet et al., 2002). Esta actividad rotatoria es debida al desequilibrio

que existe en el contenido de DA en el NE ipsilateral (del mismo lado de la lesión) con respecto al lado contralateral a la lesión, de tal forma que el animal tiende a girar hacia el lado contralateral a la lesión (Alarcón et al., 2010).

Para que la conducta de giro se presente en los animales, posterior a la lesión, se les administran fármacos como apomorfina y anfetamina.

La apomorfina es un agonista DA que induce rotación contralateral, debido a que se une a los receptores DA que se encuentran incrementados en el lado ipsilateral como consecuencia de la denervación DA. La anfetamina incrementa la liberación de DA en las terminales presinápticas únicamente en el lado contralateral a la lesión, lo que ocasiona un desequilibrio funcional; este desequilibrio induce la rotación ipsilateral en los animales (Ungerstedt, 1970; 1971).

Este modelo se ha aplicado en diferentes especies animales como ratas, ratones, gatos, perros y primates no humanos. La especie más utilizada es *Rattus norvegicus* mejor conocida como rata debido a la capacidad de réplica y a la estabilidad del modelo (Emborg, 2004). La desventaja de este modelo es que no se ha detectado LB, es un modelo agudo y su aplicación generalmente es de forma unilateral, debido a que bilateralmente se ha reportado la muerte de los organismos.

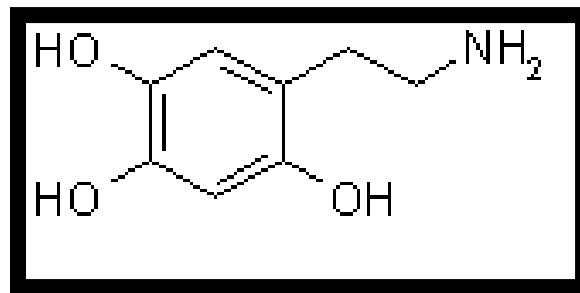


Figura. 7. Estructura química de la 6-OHDA (Tomado de Alarcón et al., 2010).

ROTENONA.

La rotenona (Fig. 8) es un isoflavonoide de origen vegetal que se utiliza como insecticida; debido a su extrema capacidad lipofílica, la rotenona atraviesa fácilmente la membrana celular, no depende de transportadores y se acumula en los orgánulos de la célula, como la mitocondria, donde interfiere en la fosforilación oxidativa al inhibir el complejo I de la cadena transportadora de electrones (Schuler y Casida, 2001).

Se ha desarrollado un modelo murino en donde la exposición a rotenona reproduce algunas de las características neuroquímicas, histopatológicas y conductuales de la EP, con degeneración de la vía Nigro-estriatal, inclusión de-LB (Betarbet et al., 2000) y deficiencias motoras como hipocinesia, rigidez con postura encorvada y temblores en uno o más miembros. Este modelo también ha sido reproducido en otras especies animales como en *Drosophila melanogaster* (Alarcón et al., 2010).

En experimentos *in vitro* produce acumulación y agregación de la alfa-sinucleína, daño oxidativo progresivo y muerte celular dependiente de caspasas (Sherer et al., 2002), no se ha observado la presencia de LB, aunque sí de inclusiones protéicas en algunas neuronas dopaminérgicas remanentes (Betarbet et al., 2000; Hoglinger et al., 2003; Sherer et al., 2003).

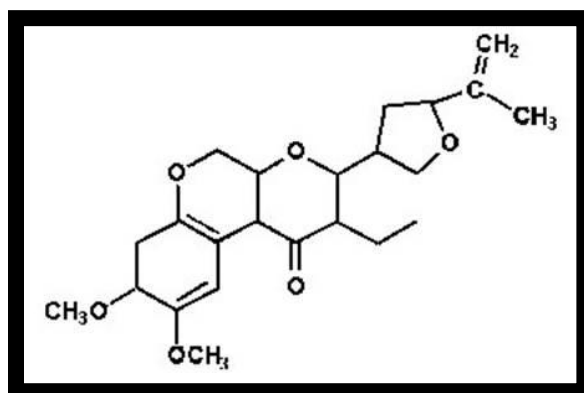


Fig. 8. Estructura química del rotenona (Tomado de Alarcón et al., 2010).

PARAQUAT.

El paraquat (1,1-dimetil-4,4-dipiridinio o PQ) (Fig. 9) se produjo por primera vez con fines comerciales en 1961, es un compuesto utilizado frecuentemente como herbicida. Se ha relacionado a la EP debido a que agricultores en contacto con él tienen mayor riesgo de contraer la enfermedad.

Diversos estudios han demostrado que el PQ induce algunos síntomas de la EP en animales experimentales. Su administración, mediante inyecciones directas en el cerebro, daña principalmente neuronas DA en la SNc. La estructura química del PQ es similar al MPP⁺, por lo que también induce daño mitocondrial, aumentando la producción de ROS genera estrés oxidativo (Alarcón et al., 2010).

Por otro lado, se ha reportado que las ROS inducidas por el PQ activa a la cinasa ASK1 y consecuentemente a las MAP cinasas JNK y p38 (Hattori et al., 2009b). Por lo que recientemente se ha propuesto que el mecanismo de acción del PQ, es a través de la inducción de ASK1 vía el sistema de xantina/xantina oxidasa. De modo que se ha considerado la posibilidad de usar a ASK1 como blanco terapéutico para prevenir la neurodegeneración en la EP (Niso-Santano et al., 2010).

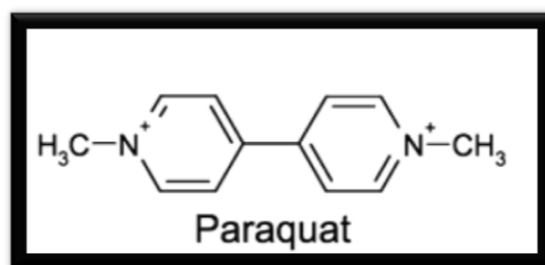


Figura. 9. Estructura química del PARAQUAT (Tomado de Alarcón et al., 2010).

En la Tabla 3 se reúne la información ya mencionada mostrando las ventajas y desventajas de los modelos experimentales de la EP.

Modelo	Características	Desventajas
6-OHDA	Primer modelo establecido, degeneración neuronal en 24 horas. Ingresa vía el transportador de dopamina (DAT) e inhibe la cadena respiratoria mitocondrial.	Inyección unilateral, modelo agudo.
MPTP	En humanos y monos produce los mismos síntomas/histopatología y respuesta a L-DOPA.	Menor susceptibilidad en roedores, la administración es aguda o subaguda. En roedores hay recuperación.
ROTENONA	Daño en la SNc e inclusiones citoplasmáticas parecidas a cuerpos de Lewy. Inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial.	Selectividad neuronal, no todos los animales se afectan.

Tabla. 3. Modelos experimentales de la EP (Tomado de Avila-Costa et al., 2013).

Existen diferentes modelos animales para el estudio de la EP, todos ellos con ventajas y desventajas, sin embargo, hasta el momento no existe un modelo que reproduzca los rasgos característicos de la enfermedad.

MANGANESO.

El manganeso (Mn) es un elemento esencial que se encuentra en todos los tejidos y juega un papel importante en diversos procesos biológicos (síntesis de aminoácidos, lípidos, proteínas y carbohidratos) (Erickson et al., 2007). Existen enzimas dependientes de Mn como oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. También actúa como cofactor de enzimas, tales como la superóxido dismutasa mitocondrial, la arginasa, la piruvato carboxilasa, y la glutamina sintetasa (Hearn et al., 2003; Takeda, 2003; Zwingmann et al., 2004; Shishova et al., 2009).

La exposición a altas dosis de Mn puede ocasionar daños neurológicos, esta intoxicación causada por Mn se le conoce como “manganismo”.

El manganismo es un síndrome extrapiramidal, sus semejanzas con la EP son: la bradicinesia y rigidez muscular. Las diferencias son que en el manganismo hay: (a) temblor en reposo menos frecuente, (b) distonía frecuente, (c) propensión particular a caer hacia atrás, (d) la dificultad de respuesta terapéutica a la levodopa, y (e) el fracaso para detectar la reducción en la captación de fluorodopa por tomografía de emisión de positrones (PET) (Pal et al., 1999).

El Manganismo está asociado con niveles elevados de manganeso en el cerebro, principalmente en las áreas que contienen altas concentraciones de hierro, como el NC, el GP, SN y NST. Inicialmente se caracteriza por ser un trastorno psiquiátrico (locura manganica) que se asemeja a la esquizofrenia. Los síntomas incluyen comportamiento compulsivo y violento, la inestabilidad emocional y alucinaciones (Pal et al., 1999).

La exposición continua y progresiva a Mn puede desarrollar en los pacientes contracciones musculares prolongadas (distonía), movimiento muscular disminuido (hipocinesia), rigidez y temblores musculares. Estos signos están asociados con el daño a las neuronas dopaminérgicas de la SNc. En algunas investigaciones se ha reportado que este metal tiende a acumularse en regiones ricas en DA. Chin-Chang y cols. (2003) evaluaron la función del DAT en la vía dopaminérgica nigroestriatal en pacientes expuestos crónicamente a Mn encontrando aumento en la actividad de este transportador, adicionalmente, se trató a ratas con reserpina, y se observó que la disminución de DA inducida por este fármaco al depletar sus vesículas, produce que la concentración de Mn en los ganglios basales sea menor, por lo que se ha propuesto que la concentración de Mn en la SNc es dependiente de la concentración de DA (Aposhian et al., 1999; Erickson et al., 2005). Esto sugiere que la recaptura y/o el metabolismo de la DA contribuyen con el transporte de Mn. Esta observación lleva a la hipótesis de que el Mn puede unirse a la DA y transportarse como un complejo al interior de las

neuronas vía el DAT y/o el Mn puede competir con el Na^{+2} para su co-transporte con la DA a través del DAT (Aposhian et al., 1999).

El transporte del Mn al cerebro se puede explicar: El Mn en vertebrados existe en su forma divalente (Mn^{2+}) y trivalente (Mn^{3+}), y su afinidad por ciertos ligandos en el plasma, alrededor del 80% del Mn^{2+} se une a la gamma-globulina y albumina, mientras que el Mn^{3+} está unido a transferrina (Critchfield y Keen, 1992; Aschner et al., 2005; 2007).

Se sabe que posterior a la inyección intravenosa de Mn, el Mn es rápidamente retirado de la circulación sanguínea, a pesar de ello una porción es transportada al cerebro en un periodo corto, lo cual supone que este mecanismo de captura es independiente de la unión a la transferrina (Murphy et al., 1991; Takeda et al., 2003). Este sistema parece que transporta Mn al interior del cerebro más rápidamente que el Mn unido a transferrina. Existe la posibilidad de que el Mn^{2+} y Mn^{3+} no unidos a proteínas sean capturados por los plexos coroideos, y que aproximadamente el 30% de este Mn inyectado sea transportado rápidamente al cerebro como ion libre (Sotogaku et al., 2000; Takeda, 2003; Zheng et al., 2003). De esta manera, se ha reportado que varios sistemas de transporte participan en la captura de Mn, por ejemplo los canales de Ca^{2+} , intercambiador de $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$, canal uniporte de Ca^{2+} y el antiporte de Na/Mg (Narita et al., 1990; Gavin et al., 1990; 2004; Frame y Milanick, 1991; Takeda, 2003; Gunter et al., 2004).

Se ha demostrado que el transportador de metales divalentes 1 (DMT-1) es expresado en las células endoteliales de los capilares cerebrales y en las células epiteliales coroideas (Murphy et al., 1991; Rabin et al., 1993). Este transportador podría estar relacionado con el transporte de Mn por lo que se ha sugerido que la entrada del Mn al cerebro es a través de los capilares, mientras que a altas concentraciones, el transporte podría ser a través de los plexos coroides. A la fecha el estudio de los transportes de Mn a través de las barreras cerebrales se ha

enfocado a la transferrina y a los DMT-1 (Gunshin et al., 1997; Roth et al., 2000; Aschner et al., 2005).

Se ha reportado que ión Mn^{2+} es transportado por el DMT-1 y el ión Mn^{3+} se une a la transferrina lo que permite que los iones atraviesen la barrera hematoencefálica. El ión Mn^{2+} tiene actividad pro-oxidante que depende de pequeñas cantidades de Mn^{3+} . El Mn^{3+} desacopla a la cadena de transporte de electrones, generando radicales libres como el anión superóxido, el cual oxida al Mn^{2+} y lo convierte en Mn^{3+} dañando a las mitocondrias y posteriormente a las neuronas (Sava et al., 2004; HaMai y Bondi, 2004). Por lo que esta relación sinérgica entre el Mn^{2+} y el Mn^{3+} se tomó como antecedente para crear un modelo de la EP a través de la inhalación de la mezcla de las dos especies de Mn (Mn^{2+} y el Mn^{3+}) (Ordoñez-Librado et al., 2008; 2010; Sánchez-Betancourt et al., 2012).

Ordoñez-Librado y cols. en el 2008 proponen un modelo para inducir la EP, se exponen ratones a la inhalación de la mezcla de Mn^{2+}/Mn^{3+} , durante 5 meses, obteniendo como resultado que la DA estriatal disminuyó 71%, acompañado de la reducción significativa en el número de neuronas DA en la SNc del 67.58%; así como alteraciones en la actividad motora: acinesia, inestabilidad postural y temblor, las alteraciones motoras mejoraron con el tratamiento con L-DOPA, demostrando con esto que las alteraciones eran de origen dopaminérgico (Ordoñez-Librado et al., 2010).

Posteriormente Sánchez-Betancourt y cols. en 2012 con el fin de estandarizar el modelo de Mn en roedores reproducen el estudio en ratas macho Wistar, al ponerlas a inhalar la mezcla de Mn^{2+}/Mn^{3+} durante 6 meses. Obteniendo pérdida significativa del 75.95% de neuronas dopaminérgicas en la SNc, y ninguna alteración celular en el GP o NE, demostrando que el modelo es específico. En ambos estudios Ordoñez-Librado y Sánchez-Betancourt realizaron pruebas conductuales: reaching task y la viga de equilibrio encontrando alteraciones en el desempeño motor de los animales.

TRATAMIENTOS.

Los tratamientos farmacológicos empleados para la EP tienen como objetivo principal disminuir las alteraciones motoras. La L-DOPA, es uno de los tratamientos más utilizados para reducir los síntomas de la EP. La L-DOPA suple a la DA faltante al ser convertida a dopamina por la enzima dopa-descarboxilasa (DDC). Sin embargo, a pesar de que el efecto benéfico es notorio, eventualmente los síntomas de la enfermedad retornan e incluso empeoran junto con la aparición de los efectos colaterales como el aumento en la muerte de neuronas DA por estrés oxidativo (Garduño y Rangel-Barajas, 2005).

Por lo que se continúa en la búsqueda de tratamientos alternativos. Dichos tratamientos pueden ser:

QUIRÚRGICOS.

La neurocirugía a mediados del siglo XX, era el método que con más frecuencia se utilizaba para tratar el temblor y la rigidez, de los pacientes con Parkinson, el principal problema es que no siempre se tenía éxito en las intervenciones (Gallardo et al., 2012).

TALAMOTOMÍA.

La talamotomía es un procedimiento quirúrgico que consiste en la termocoagulación de una determinada área del tálamo, el núcleo *ventralis intermedius* (VIM), pero que suele extenderse hacia áreas más anteriores, como el núcleo *ventral oralis posterior* y el *ventral oralis anterior*; que se sabe solo mejora el temblor en reposo, en pacientes con EP. Sin embargo la talamotomía bilateral mejora el síntoma del temblor en las extremidades, pero se asocia a la aparición de disartria e hipofonía invalidante en un gran número de pacientes (Valledeoriola, 2007).

PALIDOTOMÍA.

La palidotomía es una cirugía selectiva del Gpi (DeVitto y Anderson, 1982; Laitinen et al., 1992; Kopyov et al., 1997; Obeso et al., 1998; Baron et al., 2000; Takeuchi et al., 2000; Garonzki et al., 2002), esta cirugía restablece la actividad inhibitoria del Gpi sobre el tálamo y el sistema descendente córtico-motor. Por lo que los síntomas temblor, rigidez y bradicinesia se disminuyen (Laitinen et al., 1992; Obeso, 1997; Lai et al., 2000; De bie et al., 2002; Hughes et al., 2002; Slawek et al., 2003; Gershanik et al., 2003).

ESTIMULACIÓN CEREBRAL

La terapia de estimulación cerebral profunda es un tratamiento quirúrgico que puede reducir algunos de los síntomas asociados a la EP. La estimulación en zonas profundas del cerebro regula las señales eléctricas anormales que causan los síntomas motores incapacitantes de la EP, regresándolas a su estado normal. Como resultado, muchas personas logran tener un mayor control sobre los movimientos de su cuerpo. El sistema DBS consta de tres componentes implantados: electrodo extensión y neuroestimulador (Ford, 2012).

TRASPLANTE DE TEJIDO.

El trasplante intracerebral se define como el implante de tejido vivo neuronal en el SNC. El primer trasplante de tejido nervioso fue reportado por W. Gilman Thompson en 1890 y posteriormente en 1960, se describieron los efectos funcionales del trasplante en un modelo de la EP. Estudios recientes han demostrado que el tejido nervioso trasplantado sobrevive, se integra en el cerebro del paciente e induce recuperación funcional en modelos animales (Arias-Carrión, 2008).

El trasplante se ha considerado como una buena estrategia terapéutica, porque:

1. Se asocia con la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc.
2. La terapia de reemplazo dopaminérgico provee beneficios clínicos considerables.
3. Hay un área bien definida para realizar el trasplante.
4. Los implantes de células dopaminérgicas mejoran parcialmente la conducta observada en los modelos animales de la EP.

TRASPLANTE DE TEJIDO FETAL.

La microcirugía abierta y la cirugía estereotáxica son técnicas utilizadas para el trasplante de tejido fetal (Madrazo et al., 1990; Lindvall et al., 1990). Diversos estudios han mostrado que las células fetales implantadas en el cerebro de pacientes con EP sobreviven 8 años después de la cirugía, disminuyendo el temblor de la enfermedad (Arias-Carrión, 2008).

La dificultad de esta técnica es la obtención del tejido:

- La cantidad de fetos que se necesitan (6-12 fetos por paciente) ya que en la mayoría de los países esta actividad no es permitida (Arias-Carrión, 2008)
- El implante de tejido es poco exitoso, ya que es invasivo y no hay forma de controlar la liberación de DA.

FACTORES TRÓFICOS (GDNF, BDNF, EGF, NEURTURINA).

Los factores tróficos, son familias de polipéptidos que participan en los procesos de migración, crecimiento, diferenciación y sobrevivencia de distintos tipos celulares. Los factores que regulan estos procesos en las células nerviosas se denominan factores neurotróficos (Castillo-Padilla et al., 2011).

Los factores neurotróficos logran el mantenimiento integral del tejido nervioso, potencian sus recursos celulares y sostienen la conectividad adecuada. Por lo que son considerados como tratamientos neuroprotectores y neurorestauradores de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington y EP (Garbayo et al., 2006).

Comprenden 3 familias : Neurotrofinas (Factor de crecimiento de nervioso, (NGF) Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), Neurotrofina 3 (NT-3); Neurotrofina 4 y 5 (NT-4-5), Neurotrofina 6 (NT-6), Neurotrofina 7 (NT-7)). Factores neurotróficos derivados de la glia (GDNF): neurturina, artemina, persefina, y un tercer grupo constituido por citocinas neuropoyéticas (Factor neurotrófico ciliar CNTF y Factor inhibitorio de leucemia LIF) (Hohfeld et al., 2000; Tabakman et al., 2004; Meinel et al., 2006; Allen y Dawbarn, 2006).

El GDNF fue el primer factor neurotrófico propuesto como tratamiento en la EP; sin embargo, aplicado en la clínica sus resultados no han sido del todo favorables (Deieborg et al., 2008).

Las neurotrofinas son heterodímeros de polipéptidos con residuos altamente básicos sintetizados como precursores y procesados dentro del compartimento celular (vía convertasas) o extracelularmente (vía metaloproteasas 3, 7 y plasmina) a neurotrofinas maduras, adquiriendo así actividad biológica (Allen y Dawbarn, 2006).

La primera neurotrofina descrita fue NGF. En este dímero, cada unidad está formada por cadenas anti-paralelas, β - plegadas unidas en uno de sus extremos, dándole un aspecto de hélice, en tanto su estructura terciaria le otorga aspecto asimétrico (Mc Donald y Chao, 1995; Lewis et al., 2006).

La administración exógena de NGF durante el desarrollo embrionario previene la muerte de las neuronas de los ganglios sensoriales o sensitivos (Harper y Thoenen, 1981), mientras que en el adulto su principal blanco en el SNC son las neuronas

colinérgicas, regulando la expresión de acetilcolina (Mobley et al., 1986; Li et al., 1995). El BDNF *in vitro*, es capaz de mantener la supervivencia de neuronas corticales embrionarias (Nawa et al., 1993), así como de células ganglionares de la retina (Johnson et al., 1996), células colinérgicas, dopaminérgicas y neuronas granulares del cerebelo (Hyman et al., 1991; Segal et al., 1992; Lindholm et al., 1993). La NT-3 tiene actividad trófica tanto en el SNC como en el SNP, promoviendo la diferenciación de las células de Purkinje y granulares del cerebelo. Además, mantiene la supervivencia y diferenciación de neuronas tanto GABAérgicas como dopaminérgicas (Hyman et al., 1994).

La función biológica de cada neurotrofina es llevada a cabo mediante la interacción con dos tipos de receptores: receptores de alta afinidad (específica para cada molécula), con actividad tirosina- cinasa conocidas como TrkA (NGF), TrkB (BDNF, NT-3 y NT-4/5) y TrkC (NT-3); y un receptor común de baja afinidad conocido como p75 (Hohfeld, 2000; Tabakman, 2004; Allen y Dawbarn, 2006).

BDNF

El BDNF es la segunda neurotrofina, después del NGF, que se aisló y se secuenció por Ives Barde y cols. (1982). Recientemente se ha establecido que el BDNF y su receptor TrkB son esenciales en el mantenimiento de procesos fisiológicos del cerebro adulto como la supervivencia celular neuronal, crecimiento de neuritas, migración celular, regulación de la actividad del glutamato dependiente de la espina dendrítica y crecimiento dendrítico, formación de sinapsis (Deogracias, 2007). Así como la modulación de las ramificaciones dendríticas, la morfología de las espinas dendríticas (Tanaka et al., 2008; Horch et al., 2002) la plasticidad sináptica y la potenciación a largo plazo (LTP) (Figurov et al., 1996; Kang y Schuman, 1995) influyendo en el aprendizaje y la memoria (Egan, 2003; Cathomas et al., 2010).

Además, la infusión de BDNF mejora las alteraciones motoras en primates no humanos con EP inducido por MPTP, debido a que protege las neuronas DA y mejora la reinervación estriatal (Tsukahara et al., 1995).

La regulación funcional y morfológica de las neuronas, se debe a que la unión esencial del BDNF y su receptor p-TrkB, activan las vías de señalización MAPK (proteína cinasa activada mitogénica), PI-3K (Fosfoinositol 3 Cinasa), PLC γ (fosfolipasa C γ) y CREB (cAMP response element-binding) (Fig. 10) (Beattie et al., 2000; Howe et al., 2001).

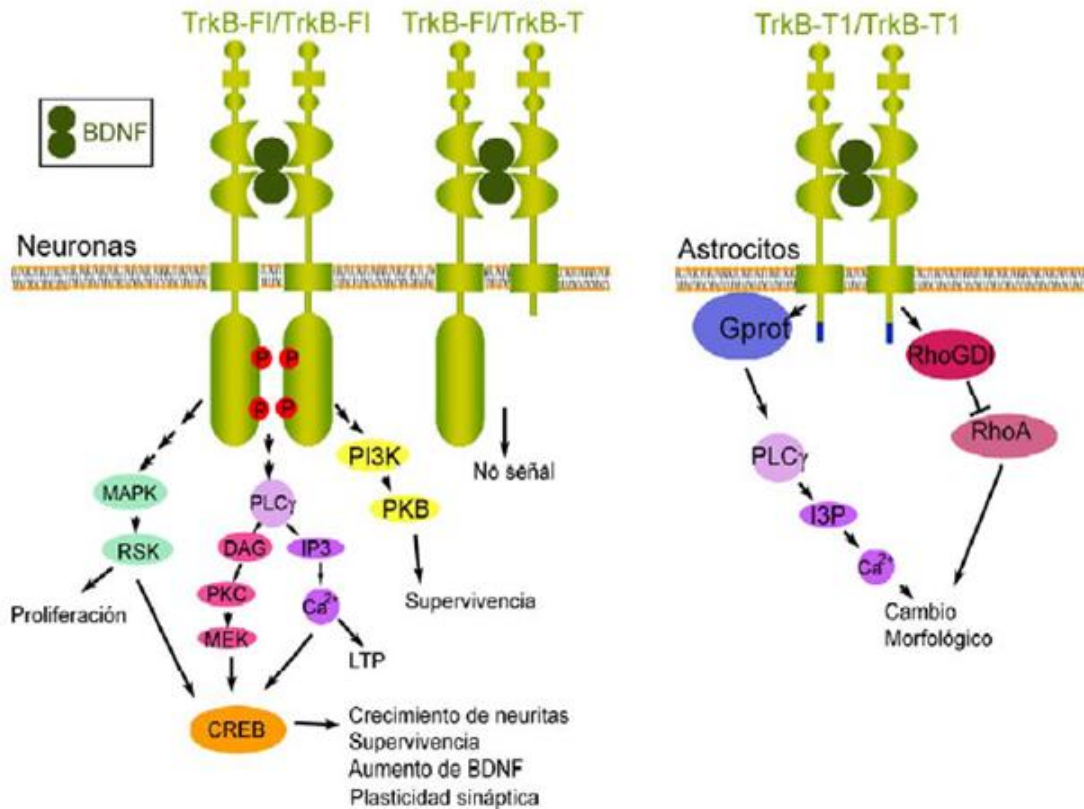


Figura.10. Rutas de señalización del receptor de neurotrofinas TrkB. Los astrocitos únicamente expresan el receptor TrkB-T1, el cuál es capaz de dimerizar en presencia de la neurotrofina correspondiente, lo que origina el aumento de los niveles intracelulares de Ca $^{2+}$ y la inhibición de la proteína RhoA. MAPK, *mitogen activated protein kinase*; RSK, *ribosomal S6 kinase*; PLC γ , *phospholipase C gamma*; DAG, *diacylglycerol*; PKC, *protein kinase C*; MEK, *MAPK/ERK kinase*; CREB, *cAMP/Ca $^{2+}$ response element-binding protein*; IP $_3$, *inositol-1, 4, 5-triphosphate*; Ca $^{2+}$, calcio; LTP, *long term potentiation*; PI3K, *phosphatidylinositol-3-kinase*; Gprot, *G protein*; RhoGDI, *Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor 1*. (Tomado de Deogracias Rubén, 2007).

El receptor TrkB se encuentra sobre la superficie de la membrana, el BDNF se une al receptor el cual se autofosforila y dimeriza (Jang et al., 2009); la célula por medio de su proceso endocítico comienza a formar un vesícula cubierta (endosoma) de la proteína clatrina esencial para el transporte membranal, esta vesícula se llama endosoma. Este endosoma es internalizado a la célula y una vez dentro es liberado el pTrkB (TrkB fosforilado) que permite la activación de las vías de señalización antes mencionadas (Fig.11) (Nagappan y Bai, 2005).

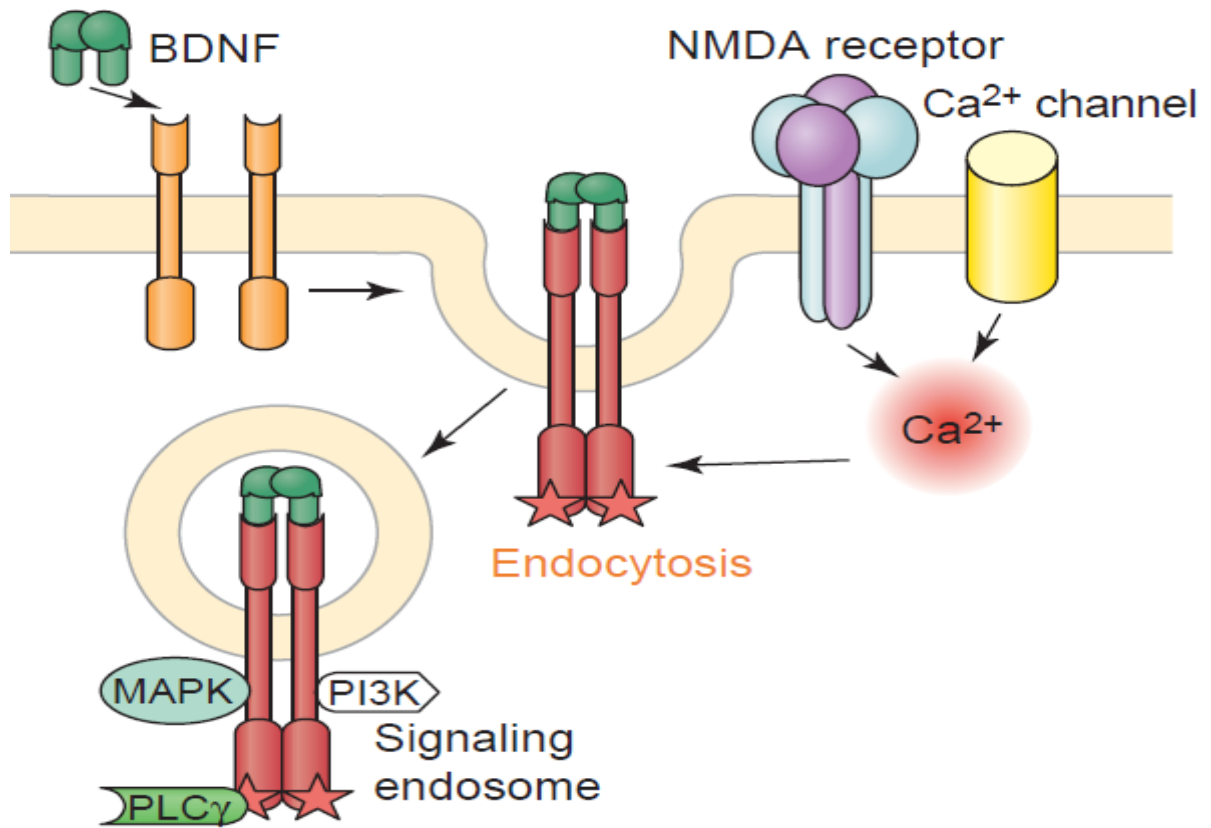


Figura.11. Teoría endosomal. Actividad dependiente del complejo BDNF-TrkB por endocitosis (Tomado de Nagappan y Bai, 2005).

RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D3.

El receptor D3 fue clonado por Sokoloff y cols. en 1990. En el ser humano el receptor consta de 400 aminoácidos mientras que en rata comprende 446; a pesar de esa diferencia estructural su distribución parece ser similar (Herroelen et al., 1994). La posible estructura de este receptor consta de 7 dominios transmembranales y receptores acoplados a proteínas G (Fig. 12) (Sokoloff et al., 1990; Livingstone et al., 1992; Jackson et al., 1994).

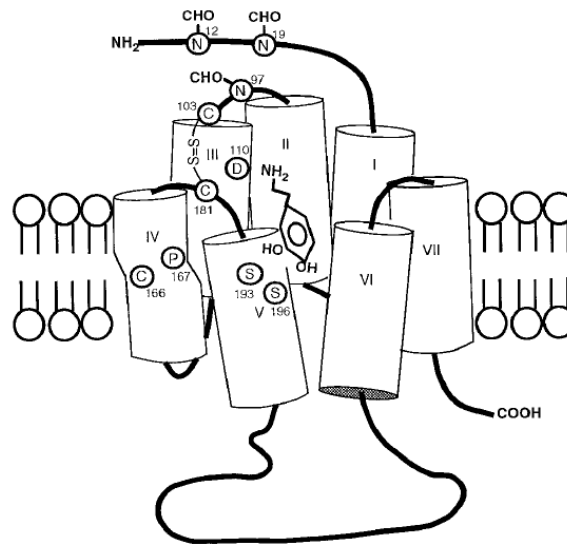


Figura. 12. Propuesta topográfica del receptor de dopamina D3. Residuos de aminoácidos presentes en cada dominio: Dominio transmembrana V compuesto de Ser (193) y Ser (196), que se cree que forman enlaces de H (hidrógeno) con los grupos hidroxilo de los catecoles. El dominio transmembrana III compuesto de Asp (110) que se vincula con el grupo amina de monoaminas y el dominio transmembrana IV compuesto de Cys (166)-Pro (167). Son los únicos dominios de los que se conoce su estructura (Tomado de Levant, 1997).

Se pueden emplear una variedad de enfoques para estudiar la localización de los receptores D3, incluyendo métodos moleculares, farmacológicos e inmunológicos. También se han identificado en base a la localización de RNAm del receptor. Existen otros enfoques como los de visualización selectiva del D3; estos métodos debido a la afinidad de este receptor por la dopamina y sus agonistas incluyen el uso de un ligando D3 selectivos como [3H] 7-OH-DPAT (Lévesque et al., 1992), [3H] PD 128907 (Akunne et al., 1995), o [125I]-trans 7-OH-PIPAT (Kung et al., 1994), en estudios de unión de radioligandos y autorradiografía.

Aunque la distribución de los receptores D3 en el cerebro de rata no se ha mapeado en detalle, su localización parece paralela a la de su RNAm. Los receptores D3 parecen estar expresados en alta densidad en las regiones del cerebro tales como las islas de Calleja, bulbo olfatorio, y el lóbulo intermedio de la pituitaria. La unión moderada del receptor D3 se observa en el núcleo accumbens, la capa molecular del núcleo vestibulocerebral, y la SNc. La unión del D3 es relativamente baja en el CP (Levant et al., 1992; Gehlert et al., 1992; Lévesque et al., 1992; Landwehrmeyer et al., 1993; Parsons et al., 1993; Booze y Wallace, 1995; Ricci et al., 1995).

Reportes recientes indican que el RD3 está presente en la terminales dopaminérgicas donde regula la síntesis y liberación de la dopamina (Mestikawy y Hamon, 1986) así como su participación en el desarrollo neuronal debido a que se encuentra en las zonas de mitosis del neuroepitelio en las primeras etapas gestacionales (Díaz et al., 1997). También se ha descrito la expresión del receptor D3 en la zona subventricular (SVZ) ventral durante la etapa prenatal y postnatal y persiste en esta región en la edad adulta, esto lo han reportado Van Kampen y cols. en el 2004 y 2005 quienes estudiaron la estimulación de los receptores D3 y observaron neurogénesis en la zona subventricular, neoestriado y en la SNc de rata adulta. Lo que demuestra que el receptor D3 se expresa continuamente en áreas del cerebro adulto capaces de proliferar.

Por lo que estos hallazgos sugieren que el tratamiento con agonistas de los receptores D3 podría producir un efecto modificador en la EP por la restauración parcial de la vía nigroestriatal.

INTERACCIÓN BDNF-D3.

Diversos estudios han reportado la relación que existe entre las neuronas dopaminérgicas y el BDNF (Venero et al., 1994; Howells et al., 2001; Sokoloff et al., 2006; Guillin et al., 2011). El BDNF ejerce varias funciones en las neuronas dopaminérgicas, una de ellas es la de proteger a las neuronas de toxinas (6-OHDA, MPTP), RL o “estrés oxidativo” (Spina et al., 1992); otra es la de mantener la supervivencia de las neuronas, como lo indica el hecho de que el bloqueo de la expresión del BDNF con oligonucleótidos antisentido trae consigo pérdida de neuronas dopaminérgicas de la *SNc* (Porrit et al., 2005). El BDNF aumenta la reinervación funcional de los trasplantes de neuronas dopaminérgicas fetales en el estriado (Yurek et al., 1996) y estimula la liberación de dopamina (Blöchl y Sirrenberg, 1996).

El BDNF sintetizado por las neuronas dopaminérgicas es responsable de la expresión de los receptores D3 durante el desarrollo y de mantener su expresión en el adulto (Guillin et al., 2011); la activación de estos receptores por agonistas específicos protege a las neuronas de la degeneración inducida, por lo que se considera que hay interacción entre los receptores D3 y el BDNF (Du, 2005) y que dicha interacción probablemente tiene efecto protector y neurogénico.

TRANSFECCIÓN DEL GEN PARA BDNF.

La terapia génica (TG) consiste en la administración de material génico con el fin de curar una enfermedad; esta transfección de genes se puede hacer *in vivo* o *ex vivo*.

La terapia génica para la EP tiene por objetivo detener y revertir la neurodegeneración ocasionada por la enfermedad. Esta terapia consiste en insertar un gen neurotrófico (transgén) dentro de las células de una región del cerebro, en donde la proteína transgénica liberada pueda frenar la muerte celular progresiva de las neuronas dopaminérgicas y restaurar su conectividad funcional con los

núcleos blanco (Bjorklund y Kirik, 2009); la mayoría de los protocolos utilizan vectores virales para la transfección de transgenes neurotróficos (Ulusoy, 2008); sin embargo existen limitaciones como la falta de especificidad y poco efecto (Álvarez-Maya et al., 2001).

El grupo de Martinez-Fong y cols. (2001; 2006; 2012) desarrollaron el NT-poliplex (primer vector no viral) con la siguiente secuencia: La neurotensina (NT) es una molécula de direccionamiento adecuado para la entrega de genes a las neuronas del SNC, ya que su ruta de internalización evade los lisosomas que son los encargados de degradar a las moléculas exógenas, esta internalización se logra a través de su receptor de alta afinidad NTS1 (Fig. 13) (Fig. 14) (Faure et., al 1995; Nouel,1997); la neurotensina con poli-L-lisina (PLL) se une electrostáticamente a un ADN plásmido (pADN) formando el complejo NT-poliplex (Álvarez-Maya et al., 2001; González-Barrios et al., 2006; Arango-Rodríguez et al., 2006; Hernández-Baltazar et al., 2012).

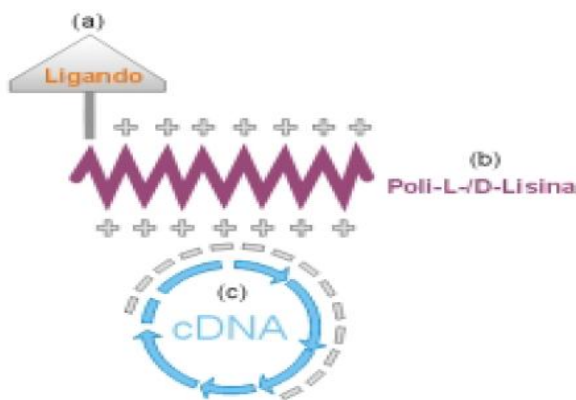


Figura.13. Representación diagramática de la estructura básica de un vector de transferencia génica mediada por receptor.

El ligando (a) activaría la endocitosis al unirse a su receptor específico. La poli-L-lisina (b) tiene la función de unir al ligando y al cDNA o DNA plasmídico (c) que contiene el gen de interés (Diagrama tomado de Arguelles, 2002).

Álvarez-Maya y cols. en el 2001 basados en la hipótesis de que la neuronas dopaminérgicas nigrales son capaces de internalizar la NT, probaron la hipótesis con el NT-poliplex en neuronas dopaminérgicas de la SN *in vivo* transfectando genes indicadores; sin embargo la transfección no fue eficaz a pesar de que la NT evade el comportamiento lisosomal; esto se debe a que el exceso de H⁺ en el interior del endosoma induce la precipitación del poliplex y reduce de esta manera

la eficiencia de polifeción. Por lo que diversas investigaciones han concluido que las instrucciones de escape oportuno del endosoma y el direccionamiento del gen viral al núcleo se encuentran en la codificación de pequeños péptidos.

Por lo que González-Barrios y cols. 2004 modificaron al NT-poliplex agregando el péptido fusogénico del extremo amino terminal de la hemaglutinina HA2 del virus de la influenza conjugándolo con la poli-L-lisina del vector y un potente péptido cariofílico del virus SV40 acoplado electrostáticamente al DNA plasmídico; esperando que el vector fusogénico y cariofílico fuera capaz de activar específicamente la endocitosis mediada por el receptor para NT, y así poder escapar oportunamente del compartimiento endosomal y dirigir certeramente el DNA plasmídico al núcleo celular (Fig.15).

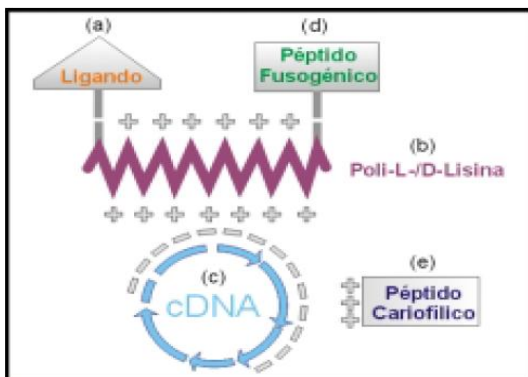


Figura.14. Representación de la nueva generación de vectores de transferencia génica mediada por el receptor que resulta de la adición del péptido fusogénico (d) y el péptido cariofílico (e) al vector original cDNA = DNA plasmídico que contiene el gen de interés. (Diagrama tomado de Arguelles, 2002).

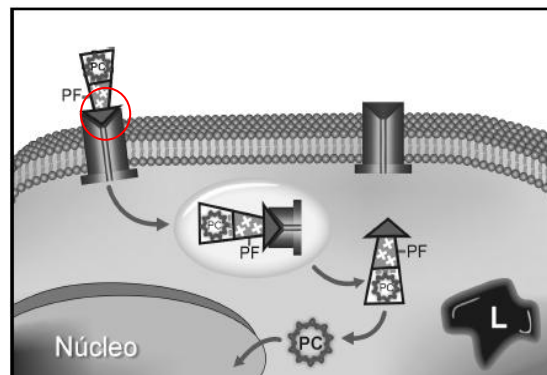


Figura.15. Representación diagramática de un corte de la célula que ilustra la función de cada componente del poliplex fusogénico-cariofílico. La punta de la flecha corresponde al ligando (a), el cual activa la endocitosis; PF = péptido fusogénico (d) tiene la misión de rescatar oportunamente al cDNA antes de que aumente la acidez del endosoma; PC = péptido cariofílico (e), encargado de direccionar al cDNA al núcleo; la poli-L-lisina (b) está representada por los signos positivos en el cuerpo de la flecha y su función es unir el ligando y el péptido fusogénico con el DNA plasmídico (c), representado por el círculo de doble hebra; la vesícula representa el endosoma inducido por la activación del receptor; L = lisosoma. (Diagrama tomado de Arguelles, 2002).

Con estas modificaciones transfectaron el gen que codifica GDNF (hGDNF) como tratamiento para el Parkinson experimental, corroborando con sus resultados de RT-PCR la expresión de ARNm exógeno de hGDNF, con Western- Blot confirmaron la verificación de la expresión del transgen, y por técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica demostraron que fueron transfectadas las neuronas dopaminérgicas la SNc.

Arango-Rodríguez y cols. 2006 transfectaron pDAT-BDNFflag en el cuerpo estriado y por transporte retrogrado se encontró el marcaje en la neuronas dopaminérgicas de la SNc comprobando la especificidad del pDAT-BDNFflag así como también estudiaron las características biofísicas del NT-poliplex. Hernández- Baltazar y cols. 2012 demostraron la especificidad del NT-poliplex en cultivos neuronales de neuronas dopaminérgicas (*in vitro*) con los plásmidos cortos que no requieren altas relaciones molares de plásmido a portador.

Es por esta especificidad de la transfección de genes que en este proyecto se utiliza el NT-poliplex para la transfección del gen para BDNF en las neuronas dopaminérgicas de la SNc.

INTEGRIDAD DEL SISTEMA

ESPINAS DENDRÍTICAS.

Camilo Golgi en 1873 desarrolló la reacción de nitrato de plata y dicromato de potasio conocida como “la reacción negra” con la que obtuvo una imagen completa de una sola célula nerviosa. Sin embargo el método tuvo poca repercusión en la comunidad científica. La presencia de espinas dendríticas en el trabajo de Camilo Golgi causó controversia debido a que algunos científicos apoyaban la idea de que era precipitado de plata; Golgi reconoció la presencia de espinas dendríticas sin embargo no les atribuyó ninguna importancia fisiológica (García et al., 2007). 15 años después Santiago Ramón y Cajal utilizó y mejoró la técnica para la visualización y descripción del SN, desmintió la idea “del precipitado de plata” y determinó que eran “espinas dendríticas” y propuso que se conectan con axones y dendritas (García et al., 2007).

Las espinas dendríticas son protuberancias protoplasmáticas que revisten toda la superficie de muchas neuronas y representan el sitio de contacto sináptico. La densidad de las espinas dendríticas oscila entre 1 a 10 por μm a lo largo de la longitud de la dendrita (Sorra y Harris, 2000) y se caracteriza por: *a*) La base de la espina está en el cruce con el eje dendrítico, *b*) el cuello, y *c*) la cabeza que puede hacer contacto con el axón. Su forma y tamaño es variable. Su longitud va de 0,2 a 2 μm , con un volumen de 0,001 a $1\mu\text{m}^3$. En base a la morfología- se clasifican en: espinas delgadas, espinas cortas sin cuello y espinas con cabeza ancha denominadas espinas hongo (Figura 16) (Bourne y Harris, 2008). Las espinas están presentes en diferentes poblaciones de neuronas en el cerebro, las mejor caracterizadas son las neuronas piramidales del hipocampo, neocórtex, células de Purkinje del cerebelo; las espinas dendríticas son dinámicas cambian su estructura continuamente lo que demuestra su plasticidad (Bourne y Harris, 2008).

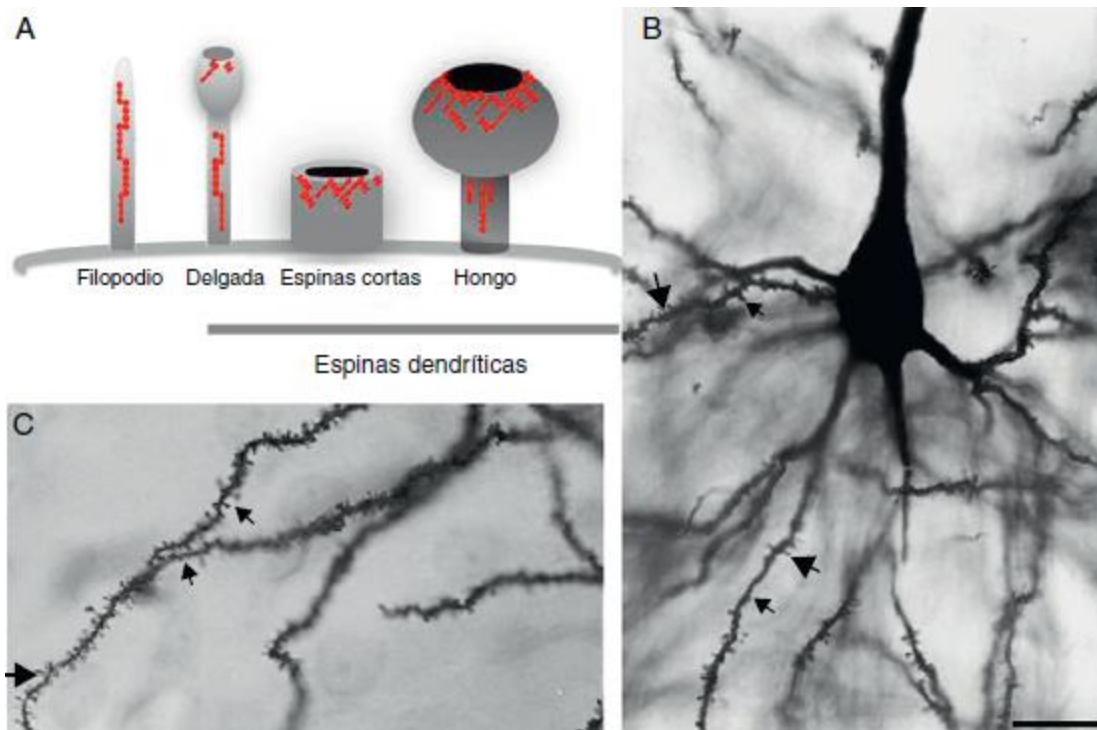


Figura.16. A) Representación esquemática de los filopodios y las espinas dendríticas: delgada, corta sin cuello y hongo. (Modificado de Sekino et al., 2007). B y C) Fotomicrografía de una neurona piramidal de tercera capa de la corteza cerebral frontal de la rata. En la cual se muestra las diferentes formas de espinas dendríticas a lo largo de la dendrita basal. (➡) delgada, (➤) corta (➔) y hongo. Técnica de Golgi modificada. Barra de 25 μm (Tomado de Fregozo, 2012).

La espinogénesis de las espinas dendríticas se explica por tres modelos: a) Los filopodios como precursores de las espinas dendríticas (Vaughn, 1989; Ziv y Smith, 1996; Marrs et al., 2001), b) Formación de la espina del eje dendrítico (Miller y Peters, 1981; Harris, 1999), c) Formación de la espina sin contacto sináptico (Sotelo, 1990). Por lo tanto, las espinas dendríticas pueden emerger a través de diferentes mecanismos en diferentes tipos de neuronas (Carlin et al., 1980; Mundel et al., 1997; Rao et al., 1998; Wyszynski et al., 1998; Sekerkova et al., 2003). Recientemente se ha demostrado que en cultivos de NEM la activación de los receptores dopaminérgicos de ambas familias facilita la presencia de espinas dendríticas capaces de formar sinapsis.

IMPORTANCÍA DE LA REINERVAÇÃO DE LAS ESPINAS DENDRÍTICAS EN LA EP.

Como ya se ha mencionado, la EP se caracteriza por la pérdida de la inervación de dopamina estriatal, que se origina en la SNc (Fahn, 2003; Savitt et al., 2006). Estudios *postmortem* de personas con la EP han revelado marcada disminución de la densidad y longitud de las espinas dendríticas en las NEM, (McNeill et al., 1988; Stephens et al., 2005; Zaja-Milatovic et al., 2005). En modelos animales de la EP también se han observado cambios morfológicos similares en las NEMs (Ingham et al., 1989; Arbuthnott et al., 2000; Day et al., 2006). La pérdida de las espinas dendríticas después del agotamiento de la DA estriatal, se ha sugerido, que depende del aumento de la actividad sináptica cortical glutamatérgica que llega a las NEM (Bouyer et al., 1984; Freund et al., 1984; Deutch, 2006); aunque en cultivos celulares de NEM se ha mostrado que la falta de DA o el bloqueo de los receptores DA disminuye la densidad de espinas dendríticas. Estos cambios en la estructura dendrítica son duraderos y no parecen ser revertidos por tratamientos para la EP como la levodopa (Stephens et al., 2005; Zaja-Milatovic et al., 2005).

La familia de las neurotrofinas regulan la formación de sinapsis y de las espinas dendríticas (Huang y Reichardt, 2001; Waterhouse y Xu, 2009). En particular, se requiere el BDNF para iniciar la señalización, y formación de las espinas dendríticas en varias regiones del cerebro, incluyendo la corteza (Chakravarthy et al., 2006; English et al., 2012; Kaneko et al., 2012; Vigers et al., 2012), el hipocampo (Tyler y Pozzo-Miller, 2003; Luikart et al., 2005; Von Bohlen und Halbach et al., 2008) y el cuerpo estriado (Baquet et al., 2004; Rauskolb et al., 2010).

El BDNF transportado anterógradamente de las neuronas DA de la SNc al NE (Altar et al., 1992) es el responsable de regular la entrada glutamatérgica y los niveles intracelulares de Ca^{2+} responsables de la ramificación dendrítica y la morfología de la espina dendrítica (Horch et al., 2002; Tanaka et al., 2008) de las

NEM (Surmeier y Kitai, 1997; Meshul et al., 1999; Cepeda et al., 2001; Day et al., 2006).

Por otra parte, la activación de los receptores D3 (D3R) también tiene efectos tróficos favoreciendo la arborización de dendritas de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Collo et al., 2008). Van Kampen y cols. en el 2006 demostraron que la activación selectiva de los D3R regenera la ruta nigroestriatal, lo que mejora algunos aspectos del desempeño motor (Van Kampen et al., 2006).

Debido a que el BDNF también se expresa en el sistema glutamatérgico, actúa en tándem con este neurotransmisor en las sinapsis excitatorias (Lessmann et al., 2003) y tiene interacción recíproca con el receptor D3, inferimos que el tratamiento con esta neurotrofina BDNF y el agonista 7-OH-DPAT regulará la entrada glutamatérgica excitatoria evitando la pérdida de espinas dendríticas, o bien la recuperación de las que se perdieron por la depleción de DA.

JUSTIFICACIÓN.

Los modelos animales empleados para reproducir la EP deben imitar, lo más cercano posible, los síntomas fisiológicos y conductuales. En nuestro laboratorio se propuso y desarrolló un modelo de la EP por inhalación de la mezcla de Cloruro (MnCl_2) y acetato ($\text{Mn}(\text{OAc})_3$) de Manganeso debido a la relación sinérgica entre los dos compuestos, responsables de la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNc y la aparición de los síntomas motores (acinesia, inestabilidad postural y temblor). Sin embargo, este modelo solo ha sido evaluado con las pruebas motoras de reaching task y la viga de equilibrio; por lo que es importante se le apliquen otro tipo de pruebas para reafirmar la efectividad del modelo. En este estudio se aplicó una batería de pruebas que incluye: pasarela, rotarod y campo abierto.

Por otra parte los tratamientos para la EP hasta ahora no han logrado detener su progreso. En este contexto ha surgido la idea de que recuperar el sistema dopaminérgico (neuronas y conexiones estriatales) como alternativa para el tratamiento de la EP. Recientemente se ha reportado, que la interacción que existe entre los receptores D3 y el factor trófico BDNF tiene un efecto neuroprotector y neurogénico en las neuronas de la SNc. Basados en estos antecedentes el presente estudio evaluó si el co-tratamiento (Trasnsfección del gen BDNF/agonista D3 -7-OH-DPAT-) recupera la destreza motora normal, incrementa el número de neuronas remanentes en la SNc y las espinas dendríticas de las NEMs estriatales.

HIPÓTESIS.

El modelo de la EP por inhalación de la mezcla de Cloruro ($MnCl_2$) y acetato ($Mn(OAc)_3$) de Manganeso producirá deterioro de la conducta motora (bradiscinesia, hipocinesia) y emocional (ansiedad) de manera progresiva.

La activación crónica del receptor D3 (agonista 7-OH-DPAT) y la inducción de la síntesis de BDNF (transfección del gen para BDNF) tendrá efecto neuroprotector en las neuronas de la SNc y disminuirá las alteraciones motoras.

OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar las alteraciones motoras y emocionales inducidas por el modelo experimental de EP por inhalación de la mezcla de compuestos de Manganeso a los 3 y 6 meses de exposición y determinar si el co-tratamiento (Transfección del gen BDNF/agonista D3 (7-OH-DPAT), induce la preservación celular en la SNc y disminuye los síntomas ocasionada por el modelo de EP.

OBJETIVOS PARTICULARES.

Fase 1

- Evaluar mediante una batería de pruebas motoras (campo abierto, rotarod y pasarela) el deterioro motor y conductual inducido por la inhalación de la mezcla de ($MnCl_2$) y ($Mn(OAc)_3$) a los 3 y 6 meses de exposición.

Fase 2

- Evaluar la acción del co-tratamiento agonista dopaminérgico D3 (7-OH-DPAT) y el gen para BDNF en el desempeño motor con las pruebas motoras (campo abierto, rotarod y pasarela).

Determinar la preservación de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, mediante el conteo de neuronas dopaminérgicas procesadas con la técnica inmunohistoquímica anti-TH.

- Evaluar la reinervación dopaminérgica nigroestriatal juzgada por la conservación de las espinas dendríticas de las NEM estriatales.

DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se utilizaron 18 ratas macho de la cepa Wistar mantenidas en condiciones de laboratorio con foto-periodo invertido de 12/12h (luz-obscuridad) con libre acceso al alimento y al agua.

Se dividieron en 2 grupos: el primero estuvo conformado por 12 ratas que inhalaron la mezcla de $MnCl_2$, 0.04M y $Mn(OAc)_3$, 0.02M tres veces por semana durante 6 meses para inducir el modelo de la EP, y las otras 6 fueron expuestas a agua desionizada bajo las mismas condiciones (grupo control) este grupo se utilizó exclusivamente para la comparación citológica.

Antes de iniciar las inhalaciones se evaluó el desempeño de la actividad motora en un rotarod (coordinación de las patas), en el campo abierto (distancia recorrida, conducta emocional), y en la pasarela (alteración de la marcha), las pruebas se repitieron a los 3 y 6 meses mientras los animales fueron expuestos a la mezcla de Mn.

Posterior a los 6 meses de exposición a la mezcla de manganeso, el grupo experimental (n=12) se dividió en dos subgrupos de seis animales cada uno.

Un grupo (n=6) recibió la administración continua del agonista D3 (7-OH-DPAT), más la transfección del gen para BDNF; al otro grupo (n=6) se utilizó como control positivo ya que se le realizó el mismo procedimiento solo que este grupo únicamente recibió solución salina. El grupo control, no se le realizó ningún procedimiento, se mantuvieron para la comparación histológica.

El agonista D3 se administró a través de una bomba de microdifusión que se implantó por métodos quirúrgicos de manera subcutánea, la bomba estuvo activada durante 3 meses (1mg/día), a la semana post-implantación se hizo la transfección del BDNF (inyectado única bilateral e intracerebralmente en la SNc), a los 3 meses post-implantación se repitieron las evaluaciones motoras para

determinar los efectos del tratamiento. Las pruebas motoras se repitieron 2 meses después de que la bomba había sido retirada para determinar si los efectos eran permanentes.

Una vez finalizado el tiempo de tratamiento se sacrificaron a los organismos por perfusión intracardiaca, se obtuvo el tejido cerebral de la SNc y NE del cual se obtuvieron cortes de 50 μm y se procesó con la técnica de inmunocitoquímica para TH (para el conteo de las neuronas dopaminérgicas) y técnica de Golgi (para el conteo de espinas dendríticas en las NEM) (Fig. 17).

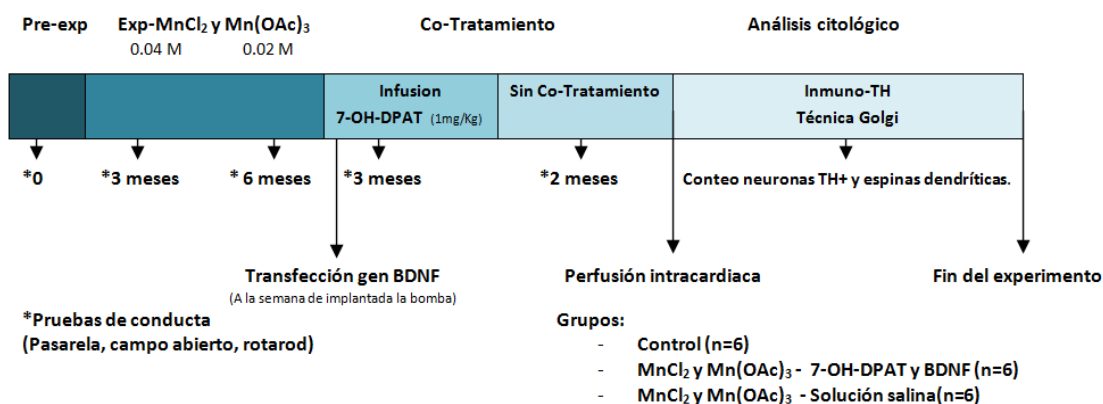


Figura.17. Diseño experimental. El asterisco (*) representa la batería de pruebas de conducta en los tiempos determinados y se muestran los tres grupos

METODOLOGÍA.

MODELO DE LA EP.

a. Inhalación de manganeso.

Se colocó a los animales 1 h tres veces a la semana durante seis meses (72 inhalaciones) en una cámara de acrílico cerrada (40 cm de ancho x 70 cm de largo y 25 cm de alto) conectado a un ultranebulizador (Shinmed, Taiwán), con 10 l/min de flujo continuo que expulsa la mezcla de 0.04 M de $MnCl_2$ y 0.02 M de $Mn(OAc)_3$ (en forma de vapor). El ultra nebulizador está diseñado para producir gotitas en un rango de 0.5-5 mm. Una trampa para el vapor se encuentra en el lado opuesto con una solución de bicarbonato de sodio para precipitar el metal restante. Durante la exposición, los animales fueron monitoreados visualmente de manera continua observando la tasa de respiración, la profundidad y la regularidad. Así como el monitoreo del nivel de oxígeno y la concentración de Mn (Avila-Costa et al., 2004; Sánchez-Betancourt et al., 2012).

Pruebas conductuales:

Rotarod.

El rotarod es un equipo automatizado el cual controla electrónicamente la velocidad de giro de un tambor. El equipo registra el tiempo de permanencia en el tambor y la velocidad a la que gira al momento en que el animal se cae. Se utilizó el protocolo de velocidad constantes a 5, 10, 15, 20, 25, revoluciones por minuto (rpm) durante un periodo máximo de 2 min. por velocidad. Las ratas fueron entrenadas para aprender a permanecer en el rotarod durante los 2 minutos a las 2 velocidades más bajas (5 y 10 rpm), los animales que no aprendían fueron eliminados de la prueba. El desempeño motor de cada rata se graficó y se eliminaron las que no obtuvieron una disminución mínima del 50% en su desempeño motor después de haber estado inhalando Mn durante los 6

meses previos. El área bajo la curva de velocidad vs permanencia de caída mide el desempeño motor de la rata (Rozas y Labandeira, 1997) (Fig.18).

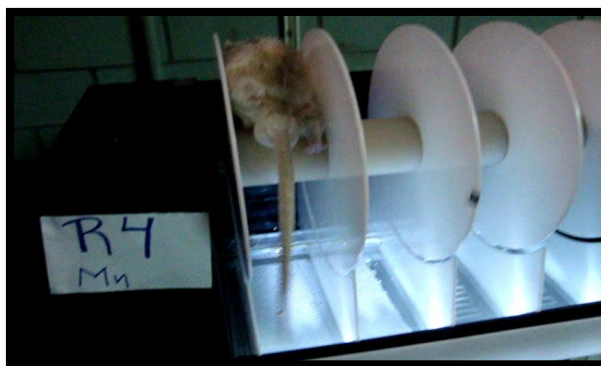


Figura. 18. Prueba de Rotarod.

Actividad de Campo abierto.

Las ratas se colocan en un compartimiento cuadrado de 83 cm por lado. Una videocámara graba durante 20 minutos la actividad. Los videos obtenidos se analizan fuera de línea para determinar 1) el desplazamiento durante los 20 min. de registro, 2) la distancia total recorrida durante el periodo de grabación y 3) el tiempo de permanencia en alguna zona del campo. Con estos parámetros se calcula la relación entre movimiento e inmovilidad durante el periodo de registro y la velocidad de desplazamiento (Gómez y Fusté, 1994; Irigoyen et al., 1999; Prut y Beltzung, 2003). El programa realizado para este propósito fue realizado por el laboratorio del Dr. Ismael Jiménez Estrada del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV-Zacatenco (Fig.19).



Figura.19. Prueba Campo abierto.

Tigmotaxía (ansiedad).

La tigmotaxía es un síntoma que se presenta en los roedores cuando existen factores que les ocasionan estrés o ansiedad como la fotofobia (miedo a la luz) o como respuesta farmacológica, es decir tienden a desplazarse con su cuerpo en contacto físico con paredes y objetos. La respuesta tigmotáxica sólo se inhibe cuando el animal se encuentra en un medio libre sin factores que le ocasionen estrés y se aventura a desplazarse hacia el centro del recinto lo que refleja una reacción de miedo y ansiedad (Prut y Beltzung, 2003).

Se hizo el conteo de las veces que la rata pasó por el centro del recinto (líneas centrales) (Fig. 20) de campo abierto y se multiplicaron por la distancia (115 cm).

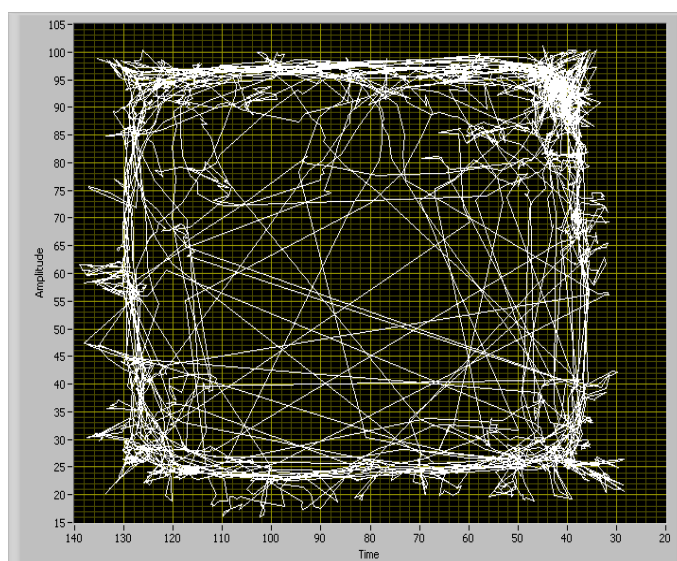


Figura. 20. Prueba Campo abierto. Trazo de la rata en el centro del recinto.

Pasarela.

La cinemática es una herramienta que se utiliza para analizar las relaciones de los movimientos de la cadera, muslo, pierna y el pie cuando se camina, especialmente las variaciones de los ángulos que forman entre sí estas distintas partes de la extremidades inferiores (patas traseras). Las alteraciones en los distintos ángulos permiten evaluar enfermedades del sistema nervioso que afectan la marcha, como la EP. Para estudiar las alteraciones en la cinemática de la marcha, a las ratas se les hizo caminar a través de un pasillo iluminado, el cual está provisto de espejos para poder observar ambos lados del animal, y se video grabó para su análisis posterior. Las ratas son marcadas con puntos negros en la articulación de la cadera, de la pierna y del tobillo de cada lado, este marcaje permite analizar los movimientos de las extremidades y determinar los ángulos de las distintas articulaciones durante la marcha. Esto permite cuantificar la cinemática de la marcha (Fig.21) (García, 2006).



Figura. 21. Prueba de la pasarela.

TRATAMIENTO.

Transfección del BDNF.

El gen para el BDNF (2 μ l) es transfectado bilateralmente a las neuronas dopaminérgicas de la SNc (las coordenadas estereotáxicas empleadas fueron AP=5 L=1.9 izq y -1.9 der V= 7.1 a partir de bregma (de acuerdo con Paxinos y Watson 1986) una semana después de haberse iniciado la administración del agonista de los receptores D₃. Este método de transfección no viral ha demostrado ser eficiente para la transfección del gen que codifica para el factor trófico BDNF humano a neuronas dopaminérgicas de la SNc (González Barrios et al., 2006). El laboratorio del Dr. Martínez-Fong nos proporcionó el poliplex de neurotensina que lleva unido el gen para el BDNF (Fig.22).

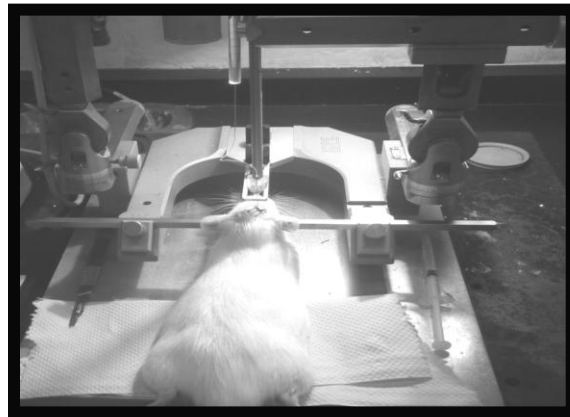


Figura. 22. Cirugía estereotáxica: Transfección del gen.

INMUNOCITOQUÍMICA.

- Perfusión intracardiaca vía aórtica e inmunocitoquímica anti-TH.

Los animales se anestesiaron con una dosis letal de pentobarbital sódico y se perfundieron vía intracardiaca con solución salina al 9% y posteriormente paraformaldehido (4% en buffer fosfatos salina -PBS- 0.1M, pH 7.4) posteriormente, se extrajeron los cerebros y se colocaron en el mismo fijador durante 2 horas y después se conservan en PBS con sacarosa al 30% durante 2 días. Se realizaron cortes coronales de mesencéfalo que contenía la SNc de 50 μ m de

espesor en un vibrotomo y posteriormente se procesaron.

- Inmunocitoquímica anti-TH (revelado con Diaminobenzidina).

Esta técnica se realiza para identificar la presencia de la enzima tiroxina hidroxilasa (TH) que es la enzima limitante en la síntesis de DA en las neuronas dopaminérgicas de la SNc.

Se lavaron los cortes durante 3 periodos de 10 min cada uno, posteriormente se colocaron durante 30 min. en PBS conteniendo peróxido de hidrógeno al 0.3% y metanol al 10%, para desactivar la peroxidasa endógena y se repitieron los lavados durante 3 períodos de 10 min. cada uno con agitación. Los cortes se sumergieron en borohidrido de sodio al 3% con suero normal de cabra y 0.3% de tritón durante una hora y se incubó el tejido en una alícuota 1:1000 de anticuerpo primario policlonal anti-TH (Sigma) en PBS y 1% de suero normal de cabra por 3 días a 4°C. Se lavó nuevamente 3 veces el tejido solo que esta vez con PBS y suero normal de cabra al 1%, de 10 min cada uno con agitación. Posteriormente se incubó el tejido por 2 hrs. a temperatura ambiente en anti IGg de conejo 1:200 en PBS más 1% de suero normal de cabra (con agitación).

Después se incubó el tejido en abidina-biotina al 0.1% en PBS por 2 hrs. a temperatura ambiente y se lavó en PBS (3 lavados de 10 min. cada uno en agitación). El tejido se incubó en 3-DIAMINOBENZIDINA al 0.05% y 0.03% de peróxido de hidrógeno.

Posterior a la incubación se realizaron 3 lavados en PBS de 10 min. cada uno (en agitación). Los cortes se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados y se dejaron secar durante una semana aproximadamente y en una batería de vasos de Coplin con alcohol a diferentes concentraciones que van del, 70 al 100% y xilol. Se sumergieron los portaobjetos con el tejido durante un minuto en cada vaso y se aplicó la resina para colocarse el cubreobjetos.

Las neuronas positivas a TH se examinaron mediante microscopía de luz (microscopio Leica) utilizando un objetivo 40x y una cámara digital DC300 Leica Imaging System Ltd.; Cambridge, UK.

Las imágenes de la SNc localizada en base al atlas de Paxinos y Watson (1986) y de acuerdo a la identificación hecha por González-Hernández y Rodríguez (2000) se proyectaron en un monitor de computadora, y mediante el programa Pro Qwin (Leica Imaging System Ltd.; Cambridge, UK) se realizó el conteo de 15 cortes por rata aproximadamente (debido a que varió entre 14 y 16 cortes en algunas ratas) del área completa de la SNc.

- Tinción de Golgi.

Para el conteo de espinas dendríticas de las NEM se disecciona un segmento del NE dorsal de aprox. 4mm que se sumerge en la mezcla de tetraóxido de osmio-dicromato de potasio (OsO₄ 0.3% K₂Cr₂O₇ 2.7% en H₂O bidestilada) durante 7 días a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de 7 días las muestras se lavan en agua desionizada, y se sumergen en nitrato de plata al 0.75%, se dejan 24 horas a temperatura ambiente (en oscuridad), posteriormente los fragmentos de tejido se encastran en un bloque de parafina para obtener cortes de 120 µm de grosor, la cuchilla con que se realizan los cortes se debe mantener lubricada con alcohol constantemente. Los cortes se deshidratan en 2 baños de alcohol absoluto 10 min. cada uno, posteriormente se aclaran en esencia de clavo durante 10 min., y después un cambio de xilol, finalmente se montan en un portaobjetos con resina sintética y se cubren.

Las NEM que morfológicamente presentaban 4 dendritas secundarias fueron consideradas para el conteo de las espinas dendríticas; posteriormente se contaron las espinas dendríticas en segmentos de 10 µm posteriores a las 10 primeras µm de la dendrita secundaria a partir de la primera bifurcación mediante microscopía de luz (Fig.23).

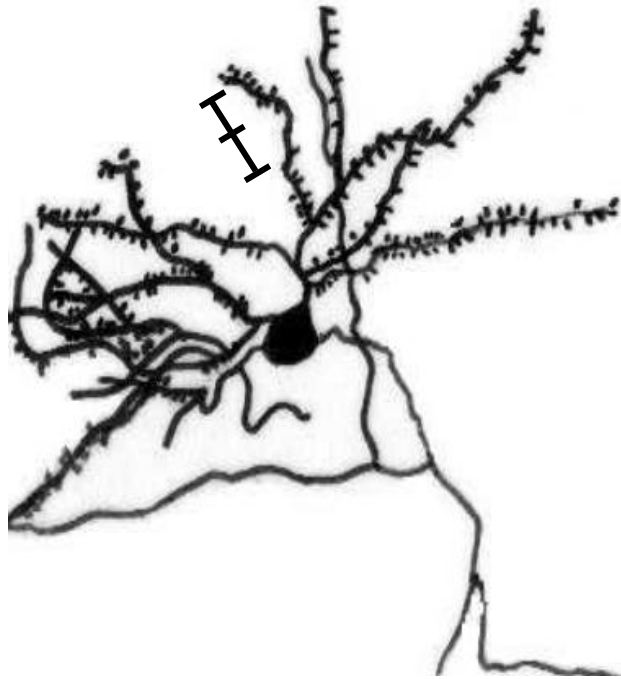


Figura. 23. Zona de conteo en una Neurona espinosa mediana (NEM) con espinas dendríticas (Tomado de Gutiérrez, 2007).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para evaluar el efecto del modelo de Mn y el co-tratamiento (D3 y BDNF) se promedió y se calculó el error estándar (promedio \pm SEM) de los resultados obtenidos, utilizando la prueba estadística ANOVA de una vía con el test *post hoc* de Dunns para las pruebas de tigmotaxia, campo abierto, inmuno TH+ y espinas dendríticas, y ANOVA de dos vías con un post test Bonferrioni para la prueba de rotarod estableciendo un nivel de significancia aceptada ($\alpha = 0.05$)

RESULTADOS.

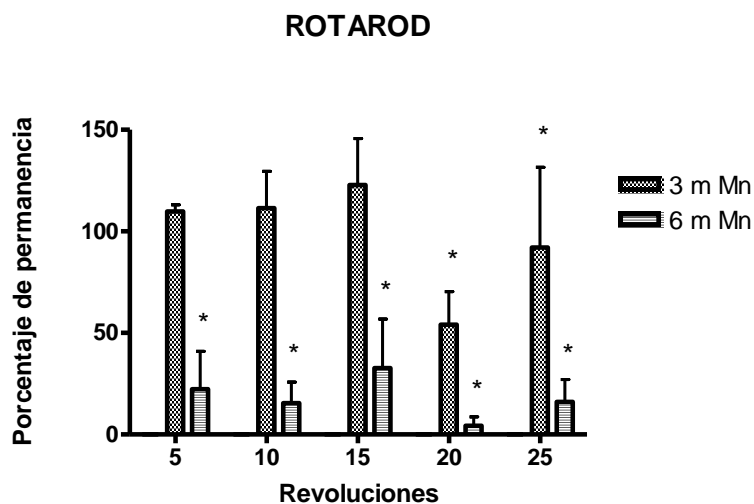
FASE 1

Características de las alteraciones motoras inducidas por el modelo de Mn.

Análisis del déficit motor por la inhalación de la mezcla $MnCl_2$ - $Mn(OAc)_3$ en la prueba de ROTAROD.

El grupo expuesto a la mezcla de Mn, en la prueba de rotarod se dividió en 3 etapas: pre-exposición, 3 y 6 meses de inhalación para determinar el daño progresivo.

Los resultados muestran que hubo disminución progresiva de la permanencia en el rodillo directamente proporcional a los meses de exposición. Entre la etapa de pre-exposición vs 3 meses se observa disminución evidente en los tiempos de permanencia en las revoluciones 20 y 25, disminuyendo un 46% y 8% respectivamente. Sin embargo a los 6 meses de exposición la disminución en los tiempos de permanencia fue contundente en las cinco revoluciones evaluadas (5, 10, 15, 20 y 25 rpm) debido a que hubo pérdida significativa de la permanencia en el rodillo entre el 70 al 90%. En la gráfica 1 se muestra el desempeño en la prueba, el grupo pre- no se muestra debido a que se consideró como el 100%.

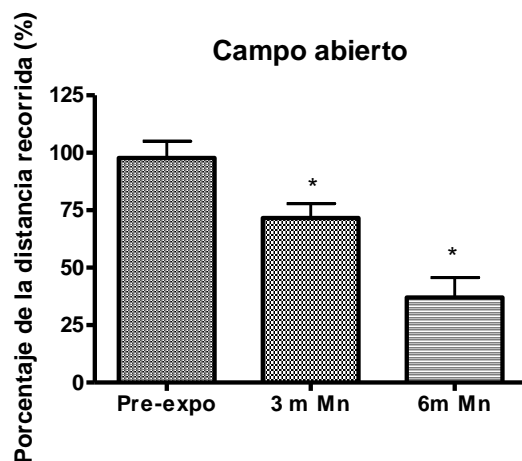


Gráfica. 1. Tiempo de permanencia en el rotarod (5, 10, 15, 20, 25 rpm) del grupo expuesto a Mn en las evaluaciones de 3 y 6 meses de exposición. Se observa que a mayor exposición a Mn el desempeño en esta prueba fue más deficiente. El desempeño en la prueba pre-exposición se consideró el 100%. Las barras representan el promedio de las mediciones individuales \pm el error estándar. * VS Pre-Mn: $p < 0.05$.

Análisis del déficit motor por la inhalación de la mezcla $MnCl_2$ - $Mn(OAc)_3$ en Campo abierto.

Se determinó el deterioro progresivo en la actividad motora del grupo expuesto a Mn durante su fase activa; dato que se obtuvo del registro de la distancia recorrida.

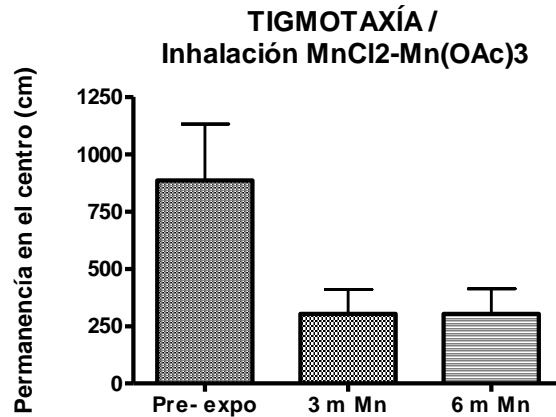
Los animales expuestos a la mezcla de Mn disminuyeron su actividad exploratoria de manera directamente proporcional a los meses de exposición (3 y 6) en comparación con la etapa de pre-exposición. Los animales antes de ser expuestos recorrieron la distancia máxima promedio de 5875 cm en 20 min (este valor se tomó como 100%), a los 3 meses de exposición se observó disminución significativa, en promedio cada animal recorrió una distancia de 3250 cm que equivale a una disminución del 45%; sin embargo a los 6 meses la disminución fue significativa correspondiendo al 66% recorriendo una distancia de 1985.83 cm en 20 min (Gráfica 2).



Gráfica.2. Distancia recorrida en la prueba de campo abierto en cada una de las evaluaciones del grupo expuestos a Mn (pre-expo, 3 y 6 meses). Las barras representan el promedio de las mediciones individuales \pm el error estándar. * VS Pre-expo: $p < 0.05$

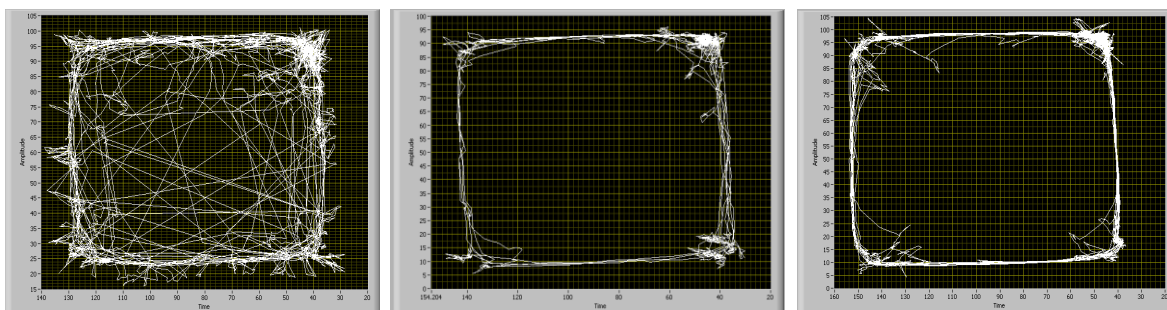
Análisis del síntoma no motor “ansiedad” a través de la medición de la conducta tigmotáxica en campo abierto por la inhalación de la mezcla de $MnCl_2$ - $Mn(OAc)_3$

La prueba de campo abierto nos arrojó datos sobre la ansiedad a través de la actividad ambulatoria. La tigmotaxia es la tendencia o preferencia que evidencian algunos animales para permanecer en contacto con superficies de objetos inanimados. En la gráfica 3 se observa que hay una tendencia a que los animales disminuyan su actividad exploratoria en el centro del recinto al disminuir el número de veces que lo atraviesan posterior a las inhalaciones de Mn, sin embargo estos datos no son significativos.



Gráfica.3. Medición de la ansiedad (tigmotaxia) como respuesta a la exposición a la mezcla de MnCl₂-Mn(OAc)₃. Se evalúa la distancia recorrida por los animales en áreas centrales del campo abierto. Las barras representan el promedio de las mediciones individuales ± el error estándar.

En las figura 24, en los incisos a, b y c, observamos que los animales en etapa de pre-exposición (inciso a) atraviesan el campo, y por ello tienen mayor número de trazos en el centro que los animales que fueron expuestos a las inhalaciones de MnCl₂-Mn(OAc)₃ (inciso b y c), estos permanecen mayormente en las orillas del campo, a pesar de que la estadística no es significativa, la conducta tigmotóxica es evidente como resultado de las inhalaciones.



a. Pre-exposición Mn.

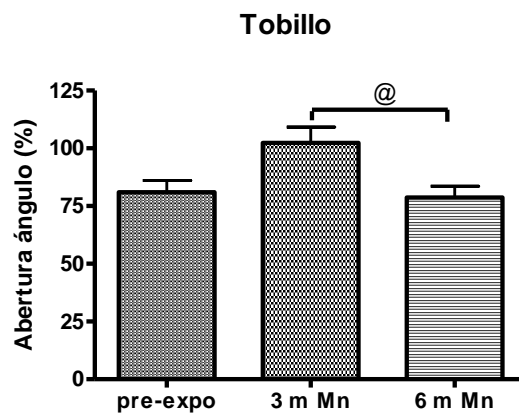
b. 3 m Mn.

c. 6 m Mn.

Figura.24. Imágenes que muestran el recorrido de una rata en la prueba de campo abierto en las etapas pre-exposición, 3m y 6 m de exposición a Mn. Es evidente que después de la inhalación de la mezcla de Mn, y presumiblemente por la pérdida de inervación dopaminérgica, los animales cuando deambulaban lo hacían pegados a las paredes.

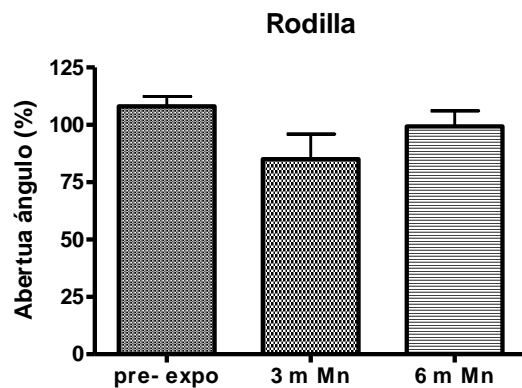
Análisis del déficit motor por la inhalación de la mezcla de Mn en la prueba de Pasarela.

En la prueba de pasarela se analizaron los movimientos de las extremidades y los ángulos de las distintas articulaciones tobillo y rodilla, así como la longitud de la zancada; para cuantificar el deterioro de la marcha causado por el modelo de inhalación de Mn. En los resultados obtenidos se observó cierta discordancia, ya que en el análisis del tobillo la abertura del ángulo a los 3 meses de exposición aumentó significativamente (aproximadamente 20%) en comparación con los 6 meses de exposición donde se observan promedio similar al obtenido en la pre-exposición. No se encontraron diferencias significativas entre la etapa de pre-exposición y 6 m Mn (Gráfica 4).



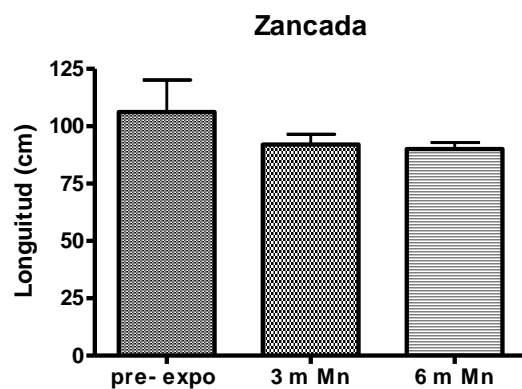
Gráfica.4. Porcentaje de abertura del ángulo del Tobillo. Deterioro motor en las etapas pre-exposición, 3m Mn y 6m Mn. Las barras representan el promedio de las mediciones individuales \pm el error estándar. @ =3 m Mn vs 6 m Mn. $P < 0.05$.

En el análisis de la rodilla la abertura del ángulo disminuyó a los 3 m de exposición al Mn y aumentó a los 6m de exposición al Mn estabilizando casi de manera similar a la etapa pre-exposición; sin embargo este dato no fue significativo (Gráfica 5).



Gráfica. 5. Porcentaje de Abertura del ángulo de la Rodilla. Deterioro motor en las etapas 3 y 6 meses de exposición a la inhalación de Mn. Las barras representan el promedio de las mediciones individuales \pm el error estándar.

El análisis de la longitud de la zancada presentó tendencia a disminuir a los 3m y 6m de exposición a Mn a pesar de ello no existió diferencia significativa entre las etapas, para considerarlo un daño progresivo (Gráfica 6).



Gráfica.6. Longitud de la zancada. Deterioro motor en las etapas 3 y 6 meses de exposición a la inhalación de Mn. Las barras representan el promedio de las mediciones individuales \pm el error estándar.

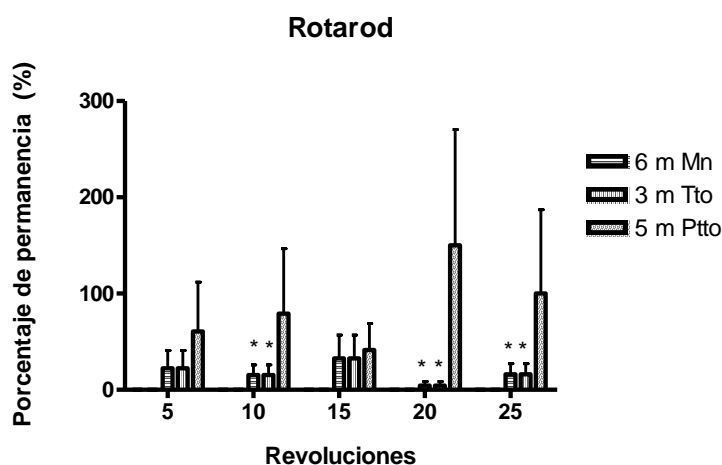
FASE 2

Recuperación del Sistema.

Recuperación de la actividad motora por el co-tratamiento 7-OH-DPAT y BDNF en la prueba de Rotarod.

Se analizaron los animales a los 3 meses (recién terminada la vida útil de las bombas de infusión del agonista D3) y 2 meses (sin bomba) después, en total 5 meses para determinar si la recuperación es progresiva y permanente y compararla con los animales que no recibieron tratamiento.

Observamos que a los 3 meses de tratamiento los animales aún no recuperaban completamente la habilidad motora para permanecer en el Rotarod, actividad que se determinó por el tiempo de permanencia en el rodillo; pero a los 2 meses después (5 meses total) ya sin tratamiento los animales recuperaron su actividad, siendo significativa la recuperación en todas las revoluciones evaluadas, esto fue comparable con su actividad en la etapa de pre-exposición (Gráfica 7)

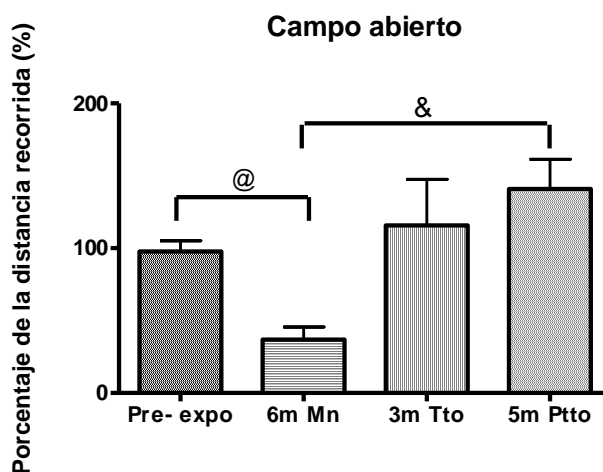


Gráfica.7. Tiempo de permanencia en el rodillo del grupo expuesto a Mn con el co-tratamiento 7-OH-DPAT y BDNF a 5, 10, 15, 20, 25 rpm. El porcentaje de permanencia es en relación al grupo expuesto a la inhalación de Mn pero que no recibió tratamiento. El desempeño en la prueba pre-exposición se consideró el 100%. Las barras representan el promedio de las mediciones individuales \pm el error estándar. * Vs pre-Mn. = $p < 0.05$.

Algunas de las observaciones en la prueba de rotarod fueron que los animales expuestos a la mezcla de Mn previo al tratamiento presentaban tendencia a permanecer estáticos antes de iniciar la prueba, al encender el rotarod perdían fácilmente el equilibrio y posterior a eso caían, se les complicaba coordinar el paso con el movimiento del rodillo al aumentar las revoluciones y se distraían con facilidad olfateando los círculos de acrílico, eso hacía que se quisieran escapar o se volviera más torpe su andar.

Recuperación de la actividad motora por el co-tratamiento 7-OH-DPAT y BDNF en la prueba de Campo abierto.

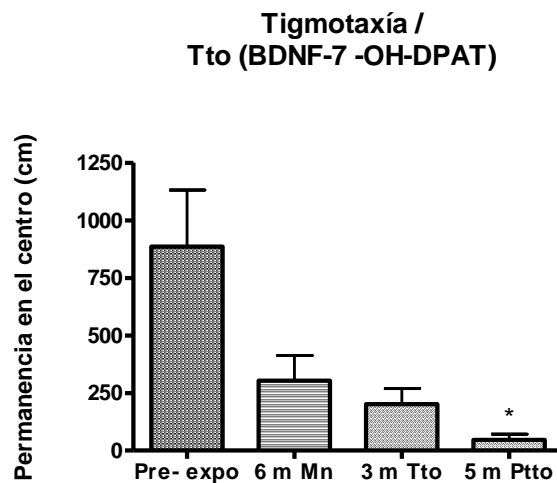
Se determinó que la recuperación de la actividad motora es trófica porque persiste aún cuando los animales ya no se les administraban el co-tratamiento. A los 3 meses recién finalizado el co-tratamiento se observó la tendencia de los animales a la recuperación, sin embargo no fue significativa con respecto a los 6 m Mn, pero 2 meses (sin bomba) después los animales recuperaron su actividad exploratoria significativamente (Gráfica 8).



Gráfica. 8. Porcentaje de la distancia recorrida en la prueba de campo abierto (20 min.) durante las evaluaciones en las 4 etapas del estudio (pre-expo, 6 m Mn, 3 Tto y 5 Ptto). Las barras representan el porcentaje promedio de las mediciones individuales \pm el error estándar @ =Pre-expo vs 6m Mn. $p < 0.05$, & =6m Mn vs 5 m Ptto. $p < 0.05$.

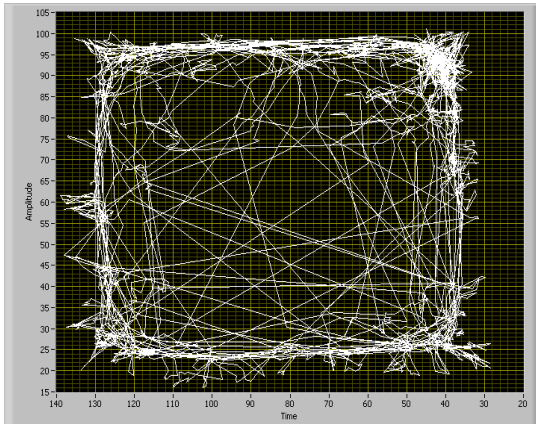
Análisis de la ansiedad a través de la medición de la conducta tigmotáctica en campo abierto por el co-tratamiento del receptor D3 (agonista 7-OH-DPAT-BDNF).

Se observó que el co-tratamiento no tiene efecto sobre los niveles de ansiedad en la prueba de campo abierto, a los 5 meses post-tratamiento los animales presentaron altos niveles de ansiedad (no desaparece la conducta tigmotáctica), ya que la permanencia de los animales en las orillas del campo permanece.

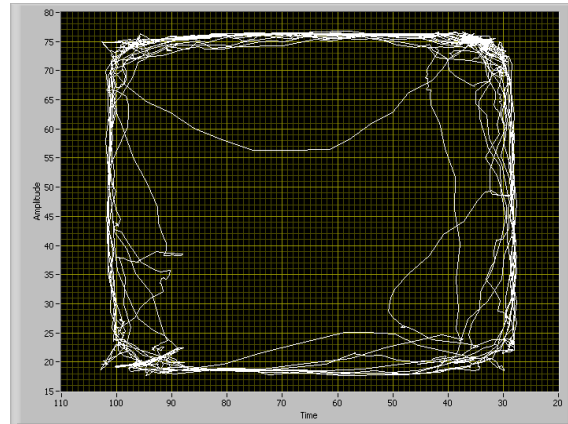


Gráfica.9 Medición de la ansiedad (tigmotaxia) como respuesta farmacológica al co-tratamiento con el agonista del receptor D3 (7-OH-DPAT) y BDNF. Las barras representan el promedio de las mediciones individuales \pm el error estándar. * Vs Pre-Mn $P < 0.05$.

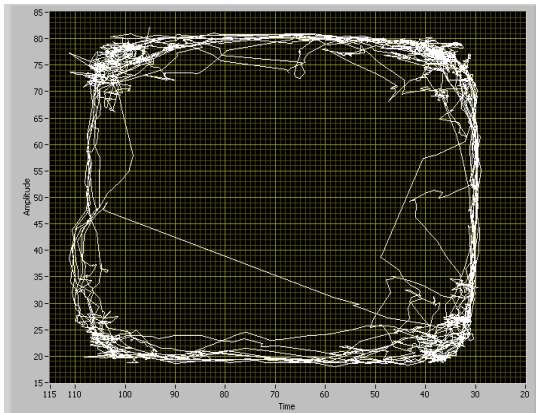
En las figura 25 en los incisos a, b, c y d observamos el desempeño de una rata en las 4 etapas (pre-exposición, 6m Mn, 3m Tto y 5 m Ptto); los animales en etapa de pre-exposición tienen mayor número de trazos en el centro que los animales que fueron expuestos a las inhalaciones de Mn, éstos permanecen mayormente en las orillas del campo, y a los 5 meses totales (3m Tto y 2 m Ptto) se ve que los animales no recuperan la actividad ambulatoria por el centro del campo; aún cuando sí incrementan la distancia recorrida (Gráfica 8).



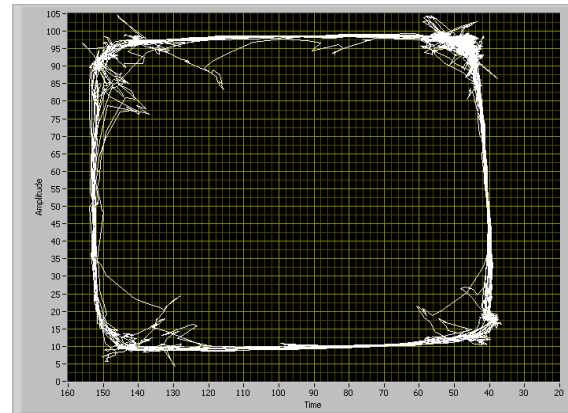
a) Pre-inhalación



b) 6m Mn



c) 3m Tto



d) 5m Ptto.

Figura.25. Imágenes que muestran el desempeño de una rata en la prueba de campo abierto en las etapas a) pre-exposición, b) 6 m Mn (6 meses de exposición a Mn) , c) 3 m Tto (3 meses de tratamiento con el agonista D3 y BDNF) y d) 5 m Ptto (2 meses después de terminado el tratamiento farmacológico).

Análisis Citológico

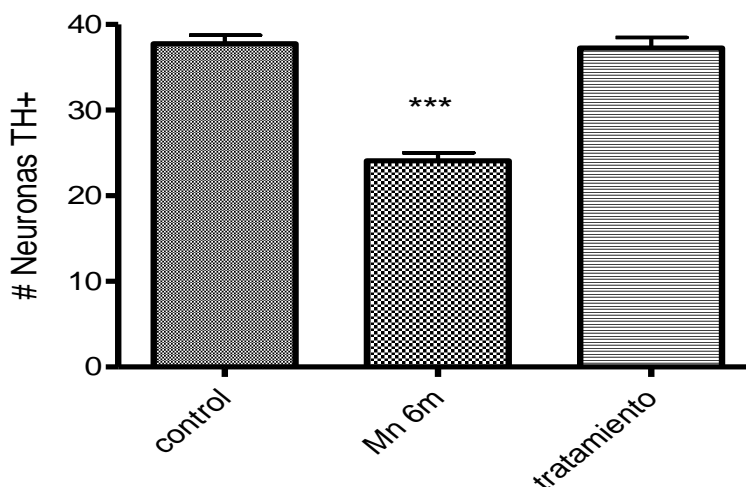
Recuperación en el número de neuronas TH+ por el co-tratamiento 7-OH-DPAT y BDNF.

Se realizó el conteo bilateral de las neuronas TH+, en toda la SNc para determinar si el co-tratamiento recupera o mantiene el número de neuronas. Estos datos se compararon con el grupo control; también se realizó el conteo de neuronas TH+ a los 6 meses de exposición a la mezcla de Mn para determinar la pérdida de neuronas en esta etapa.

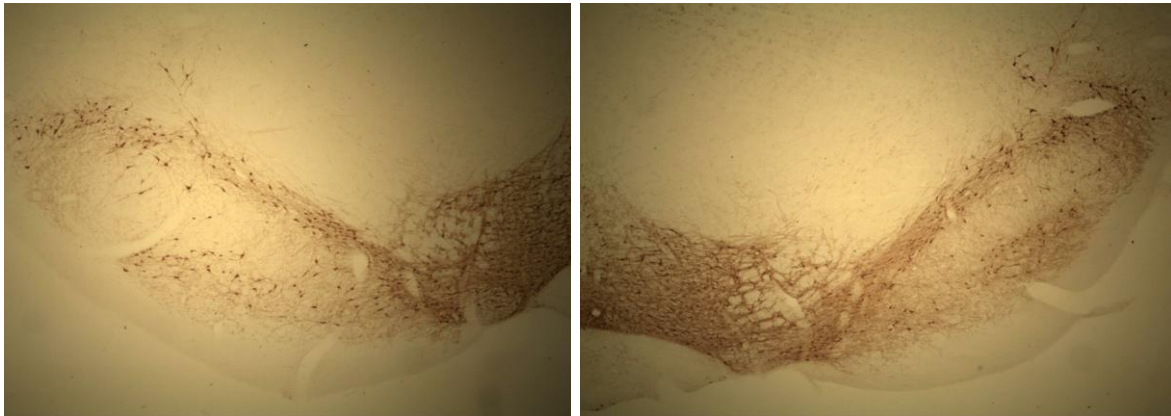
En la etapa de exposición a Mn hubo disminución significativa de neuronas del 66.65%. Al hacer el conteo de neuronas remanentes en el tejido de animales con el co-tratamiento de 7-OH-DPAT y BDNF (5 meses Ppto) se obtuvo una recuperación del 100% en comparación con el control, determinando que no hay diferencias significativas entre ambos grupos.

Esto se observa en la gráfica 10 y figura 25) El tratamiento es 3 meses con bomba y 2 meses sin bomba es decir 5 meses en total.

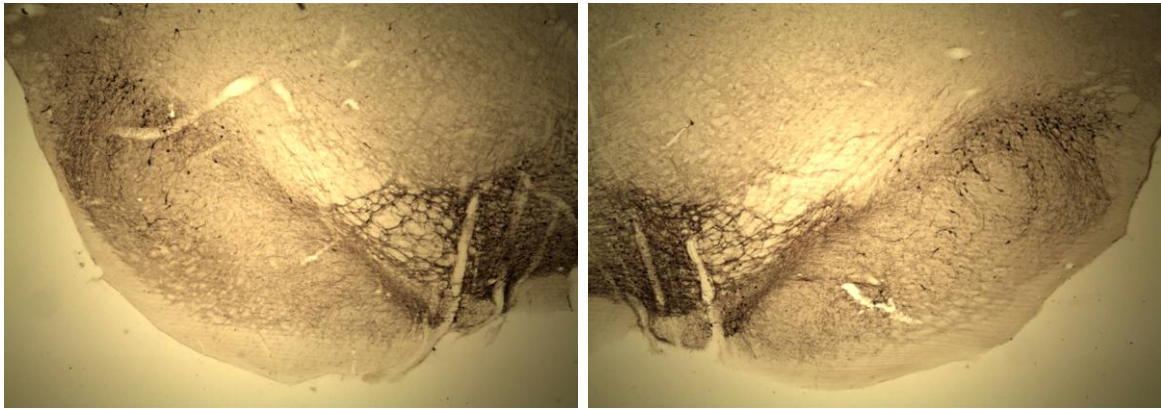
Neuronas inmunoreactivas a TH de la SNc.



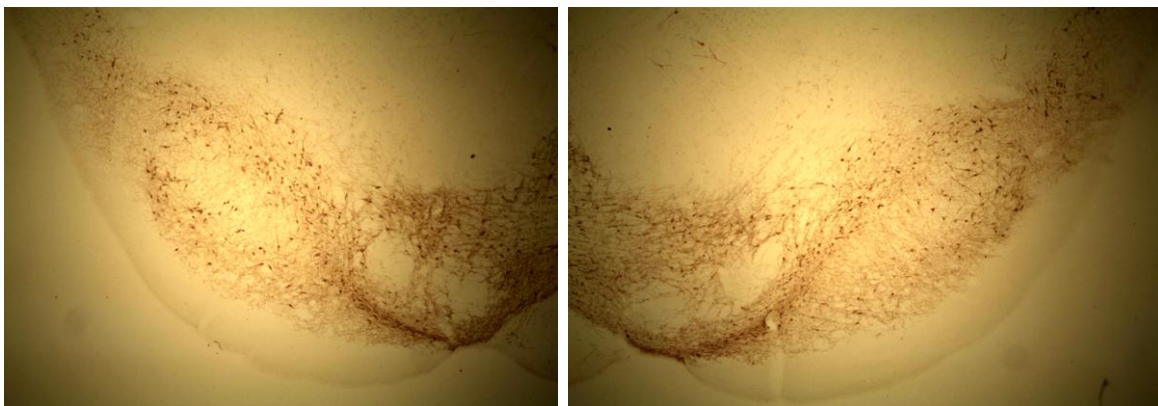
Gráfica.10. Conteo bilateral de neuronas TH+ en la sustancia nigra compacta (SNc). En los animales sometidos al doble tratamiento se encontró mayor número de neuronas dopaminérgicas remanentes en la SNc. Las barras representan el promedio de neuronas en cada corte \pm el error estándar. (***)VS control y tratamiento); $p < 0.05$.



a) Control



b) 6 m Mn



c) 5m Tto (7-OHDPAT y BDNF)

0.5 mm

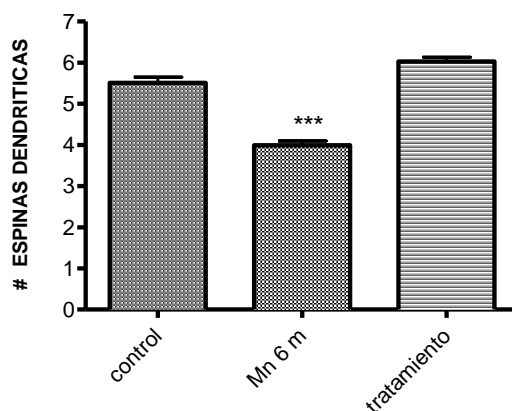
Figura .26. Imágenes representativas de cortes de la SNc con inmunohistoquímica para TH+, se observan los cuerpos neuronales dopaminérgicos remanentes en los animales de cada grupo experimental.

Recuperación de espinas dendríticas por el co-tratamiento de 7-OH-DPAT y BDNF.

Se realizó el conteo de espinas dendríticas en las NEM del NE para determinar si el co-tratamiento recuperó el número de espinas dendríticas. Estos datos se compararon con el grupo control; también se realizó un conteo de espinas dendríticas a los 6 meses de exposición a la mezcla de Mn para determinar la pérdida de espinas en esta etapa.

Encontramos que en la etapa de exposición a Mn hubo pérdida significativa de espinas dendríticas en las NEM del 82.2% con respecto al grupo control; el grupo control vs co-tratamiento 7-OH-DPAT y BDNF no obtuvo diferencias significativas recuperándose un 100%. Esto se observa en la gráfica 11 y figura 27.

Inhalación Mn y tratamiento ag- D3/BDNF



Gráfica. 11. Conteo de espinas dendríticas en 10 micras de dendritas secundarias de las neuronas espinosas medianas del Núcleo estriado (NE) Las barras representan el promedio de las mediciones individuales \pm el error estándar. *** VS control y tratamiento: $p < 0.05$.

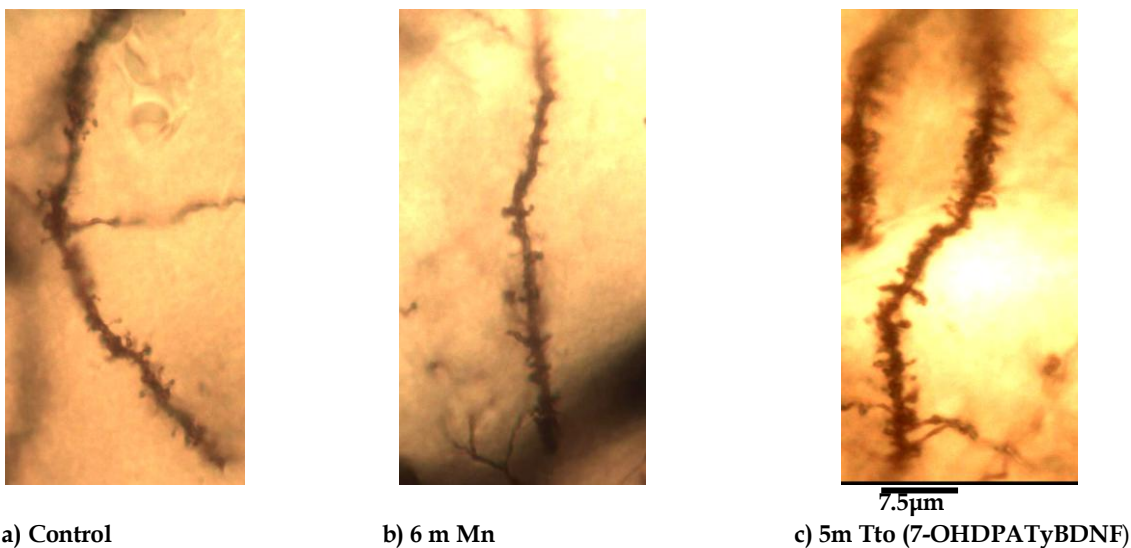


Figura. 27. Imágenes de dendritas de neuronas estriatales mostrando la recuperación de espinas dendríticas de las NEM en las etapas Control, 6m Mn, 5m Tto. 60x

DISCUSIÓN.

Características de las alteraciones motoras inducidas por la inhalación de la mezcla de $MnCl_2$ - $Mn(OAc)_3$ como modelo de la EP.

Un modelo adecuado para reproducir la EP debe imitar los síntomas fisiológicos y conductuales como bradiscinesia, ascinesias, temblor y rigidez muscular de forma gradual dando la oportunidad de intervenir en etapas iniciales y avanzadas de la enfermedad (Dauer y Przedborski, 2003; Meissner et al., 2004.)

Actualmente existen varios modelos experimentales que reproducen la EP; estos modelos fueron diseñados para producir la depleción dopaminérgica nigroestriatal, generalmente se emplean neurotoxinas selectivas como son la 6-OHDA, MPTP, paraquat, o rotenona (Bové et al., 2005; Terzioglu et al., 2008). La mayoría de estos modelos induce la muerte neuronal porque inhibe la función mitocondrial y producen ROS pero ninguno de ellos reproduce completamente la sintomatología ni la patología que se observa en la EP en seres humanos, en parte debido a que la actividad de las neurotoxinas es aguda, rápida y no progresiva, y la respuesta a estas neurotoxinas es diferente entre especies animales.

El modelo de la EP inducido por inhalación de la mezcla de $MnCl_2$ - $Mn(OAc)_3$ reportado, en nuestro laboratorio, es un modelo adecuado para el estudio de la EP, debido a que simula varias de las alteraciones conductuales, morfológicas y neuroquímicas de manera progresiva y bilateral.

Para evaluar conductualmente el grado de lesión dopaminérgica (máximo o parcial) en modelos bilaterales se utiliza la prueba de rotarod (Rozas y Labandeira, 1997); esta prueba también evalúa los síntomas de ascinesia e inestabilidad postural.

El mecanismo exacto que subyace a esta prueba es la insuficiencia de las ratas lesionadas a permanecer en el rodillo, estos déficit se vuelven cada vez más evidentes a medida que aumenta la velocidad de rotación y las ratas se ven obligadas a moverse a una velocidad más rápida; también se evidencia la pérdida en la capacidad para aplicar la fuerza con las extremidades afectadas, por lo tanto hay fatiga (Dunnet y Iverson, 1982) y tienden a caer (latencia de caída), se ha demostrado recientemente que pacientes con EP presentan inestabilidad e inexactitud de movimiento y se hace más prominente cuando se les pide que se muevan más rápido (Freed, 1991; Delwaide y Gonce, 1993) como muestran nuestros resultados, la permanencia en el rodillo comenzó a disminuir desde los 3 meses de exposición pero fue más evidente a las 20 y 25 rpm, a los seis meses de exposición a la mezcla de Mn la disminución en la coordinación motora fue significativa en las cinco revoluciones evaluadas y con una pérdida del 66.5% de neuronas dopaminérgicas. Los animales expuestos a la mezcla de Mn presentaban tendencia a permanecer estáticos antes de iniciar la prueba, por lo que al encender el rotarod era fácil que perdieran el equilibrio y cayeran, o que no coordinaran el paso con el movimiento del rodillo al aumentar las revoluciones y/o si los animales estaban distraídos nuevamente caían, esto sugiere incapacidad para ejecutar tareas de equilibrio. Resultados similares también han sido reportados por Rozas y cols. (1998) al utilizar la prueba de rotarod en ratones que recibieron inyecciones de MPTP, los animales mostraron reducción en el tiempo de

permanencia en el rodillo, relacionando la pérdida de neuronas dopaminérgicas y disminución de fibras TH⁺ en el NE; posteriormente Reyna (2012), reporta la relación entre el grado de déficit en la coordinación motora y el equilibrio producidos por la lesión unilateral con 6-OHDA en el haz medial, donde hay pérdida del 59.4% de neuronas dopaminérgicas en la SNc ipsilateral.

La prueba de la pasarela es un estudio sistemático de la locomoción. Esta prueba mide la variación del ángulo ya que sigue el movimiento de las extremidades inferiores (cadera, rodilla y tobillo) por lo que se considera una prueba pertinente para el estudio de alteraciones motoras.

En nuestros resultados se observó incremento en el ángulo de la articulación del tobillo a los 3 meses de exposición al Mn significativo; sin embargo a los 6 meses de exposición se recuperó la abertura del ángulo; el ángulo de la rodilla y la longitud de la zancada no tuvieron diferencias significativas, por lo que no fue posible concluir si existió alteración de la marcha, así como si existió la efectividad del tratamiento.

Estas incongruencias de datos con respecto a las otras pruebas (rotarod y campo abierto) pueden deberse a la pérdida de individuos durante el proceso, lo que no permitió tener un análisis contundente de los datos; más aún, esta prueba no ha sido empleada en modelos bilaterales, por lo que no tenemos antecedentes que den indicios de si el animal con lesión bilateral puede compensar las alteraciones en la marcha.

Otro punto importante que cabe mencionar es que el programa para análisis de la marcha está diseñado para evaluar modelos unilaterales, por lo que se reprogramo para el modelo bilateral; el análisis de la marcha se hace mediante un programa diseñado exprofeso, desafortunadamente para la reprogramación del mismo no se conto con el diseñador original del programa; por eso no descartamos que

podieran existir algunos errores al momento del análisis de datos, lo que podría suponer estas incongruencias.

La prueba de campo abierto es una prueba confiable en roedores para evaluar la actividad motora como exploración (comportamiento motor espontáneo) que es un análogo en pacientes con la enfermedad cuando presentan hipocinesia (disminución de la deambulaci3n) y bradicinesia (disminuci3n de la velocidad del movimiento), en animales tambi3n pueden existir alteraciones emocionales (deambulaci3n en 3reas descubiertas) que se interpreta como ansiedad.

Previo a la exposici3n de la mezcla de Mn los animales mantuvieron la actividad espont3nea de exploraci3n, sin embargo los animales al ser expuestos a disminuyeron significativamente la actividad espont3nea progresivamente con respecto al tiempo, a los 3 meses la baja fue del 45%, pero a los 6 meses fue del 66%, esta respuesta indica que el modelo reproduce los s3ntomas de hipocinesia (disminuci3n de la deambulaci3n) lo que ocasiona que recorran menos distancia; y como ya se mencion3 en la prueba de campo abierto son observables las alteraciones emocionales a trav3s de la deambulaci3n en zonas descubiertas en los animales experimentales. La rata es un animal nocturno; esta etolog3a hace que presente una fuerte ftofobia y una marcada tendencia tigmot3xica, es decir, a desplazarse con su cuerpo en contacto f3sico con paredes y objetos. La respuesta tigmot3xica s3lo se inhibe cuando el animal se encuentra en un medio libre, sin factores que le ocasionen estr3s y se aventura a desplazarse hacia el centro del recinto lo que refleja una reacci3n de miedo y ansiedad (Prut y Beltzung, 2003).

En este estudio la respuesta tigmot3xica fue evidente posterior a las 72 inhalaciones de Mn donde disminuy3 la actividad deambulatoria permaneciendo principalmente en las orillas del campo, sin embargo no fue significativo, esto se le atribuye al dise1o experimental, debido que el n3mero de animales es peque1o (n=12) para este tipo de pruebas, si se observan las gr3ficas es evidente la conducta tigmot3xica antes mencionada presentando solo la tendencia. Esta conducta se

relaciona con el síntoma de hipocinesia (disminución de la deambulaci3n) y con los trastornos de Ansiedad que aparecen con relativa frecuencia al inicio y durante la EP (Macías, 2006) y aunque suelen ser inespecíficos, se suelen manifestar de diversas formas como agitaci3n, ansiedad cr3nica, trastornos f3bicos y ataques de pánico.

En humanos el miedo a las caídas, a atragantarse o a ser incapaz de controlar el comportamiento motor, induce reacciones de ansiedad y cambios de conducta. La manifestaci3n de los sntomas de la EP no es continua, se presenta de manera intermitente a lo largo del día; por ello, es que la incertidumbre de no saber cuáles van a ser las manifestaciones de la enfermedad en un momento determinado, hace que el enfermo con la EP, esté a la expectativa de manera permanente y por lo tanto, la ansiedad puede aumentar la manifestaci3n de los sntomas de la enfermedad (Macías, 2006). Por lo que la disminuci3n de la deambulaci3n específica en roedores y el grado de depleci3n dopaminérgica se ha reportado tiene relaci3n directa (Camp et al., 1994).

La etiología de la ansiedad en la EP se considera multifactorial (Erro et al., 2012), una diversidad de estudios proponen diversas hipótesis como la disminuci3n de la DA y su afecci3n extranigral que afecta a otras áreas como el sistema límbico (Braak y Braak, 2000).

Recientemente Erro y cols. en el 2012 realizaron un estudio a través de una tomografía computarizada de emisi3n monofotónica a 34 pacientes recién diagnosticados con EP sin tratar de los cuales midieron el transportador de dopamina (DAT) en el NE, reportando que hay asociaci3n entre el déficit de disponibilidad del DAT nigrostriatal y los sntomas de ansiedad.

El dato no sintomático (ansiedad) representado por la conducta tigmotáxica en roedores es obtenido en este estudio se le puede atribuir al modelo de la mezcla de Mn ya que se reportó en el estudio previo de Ordoñez-Librado que en ratones que

hay una disminución de la DA en NE del 73%, GP del 68% y SNc del 87%; de DOPAC el 52% NE, 61%GP y 85% SNc y del HVA 58% en el NE, 46% GP y 56% SNc (Ordoñez-Librado et al., 2011) y esto es contundente al relacionarlo con un estudio por Tadaiesky y cols. (2008) que describen ansiedad en ratas lesionadas bilateralmente con 6-OHDA bilateral, debido a la disminución de la dopamina estriatal y sus metabolitos: el ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) y el ácido homovanílico (HVA), así como 5-HT y aumento en los niveles de noradrenalina. También se ha señalado que la ansiedad puede manifestarse ante alteraciones en los niveles de DA en el núcleo reticular talámico, que normalmente recibe DA de la SNc (Picazo et al., 2009) Estos datos son relevantes, pues debido a que en otros modelos bilaterales se han confirmado estos síntomas emocionales (Zhou y Palmiter, 1995; Benítez, 2013; Briones, 2013), a diferencia de modelos unilaterales. Por lo que estudios recientes han puesto mayor atención en otras características de la EP que van más allá de las alteraciones motoras y se centran en las alteraciones emocionales o síntomas no motores ya que pueden llegar a ser incapacitantes porque alteran la calidad de vida de los enfermos y se ven afectadas sus relaciones familiares y sociales.

El deterioro motor tiene relación directa con las inhalaciones de la mezcla de $\text{MnCl}_2\text{-Mn(OAc)}_3$, ya que en este modelo a los 6 meses de inhalación hay una pérdida de neuronas dopaminérgicas del 75.95% de SNc y poca o ninguna alteración neuronal en VTA, GPNE (Sánchez-Betancourt et al., 2012). Ordoñez-Librado y cols. en el 2011 reportaron cambios ultraestructurales como alteraciones del neuropilo del NE, que consistieron en la disminución de los contactos sinápticos axoespinosos, aumento de las sinapsis perforadas en el NE; alteraciones nucleares, necrosis y apoptosis en la SNc y, en menor medida, en el NE. Estos datos nos muestran que el modelo de inhalaciones de $\text{MnCl}_2\text{-Mn(OAc)}_3$ es un modelo óptimo para reproducir la EP debido a que es bilateral y no invasivo, cumple con las características de ser crónico y progresivo así como presentar las

conductas sintomáticas como hipocinesia observada en las prueba de campo abierto donde los animales disminuyeron su actividad exploratoria; inestabilidad postural en el rotarod al disminuir su permanencia en el rodillo o presentar continuas caídas y acinesia al tardar en responder para iniciar la actividad, y no sintomáticas como la ansiedad determinada en el campo abierto donde los animales pasan mayor tiempo pegados en las paredes del campo; en congruencia con los daños estructurales selectivos como la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNc del 66.65% que está entre el rango de pérdida neuronal que va entre el 60% y 70% (Kolb y Wishaw, 1990; Gerlach y Reiddere, 1999) en la EP.

Recuperación del Sistema motor y estructural por el co-tratamiento 7-OH-DPAT y BDNF.

Hasta la fecha los tratamientos más frecuentemente empleados para la EP como la levodopa, estimulación profunda o los trasplantes no han logrado detener el avance o inducir neuroregeneración de las neuronas dopaminérgicas; en el caso de la levodopa después de un tiempo de administrarla resulta ser toxica ya que acelera la progresión y aparecen síntomas como las discinesias, que llegan a ser más incapacitantes que la misma enfermedad. Un enfoque reciente ha reportado que la estimulación de los nichos neurogénicos podría remplazar al menos la parte de la pérdida de las neuronas de la SNc originales y re-inervar el circuito motor, restableciendo el balance entre las vías directa e indirecta (VanKampem et al., 2006; Razgado, 2014 no publicado).

La administración continua y crónica del agonista D3 asociada a la transfección del gen para BDNF, mostró recuperación contundente de la actividad motora en las pruebas de rotarod y campo abierto, así como la regeneración o neuroprotección de neuronas dopaminérgicas de la SNc y espinas dendríticas del NE de animales

lesionados unilateralmente inyectando la neurotoxina 6-OHDA directamente en el NE (Razgado, 2014 no publicado).

Nuestros resultados mostraron que en la prueba de rotarod los animales que inhalan la mezcla de Mn y que recibieron el tratamiento recuperaron parcialmente su desempeño en la actividad motora, permaneciendo mayor tiempo en la velocidad de 20 rpm a los 2 meses después de haberse aplicado el tratamiento; estos datos son consistentes con los reportados por Reyna (2012) donde los animales a las 12 semanas de administración del co-tratamiento D3 (7-OH-DPAT) y BDNF, presentan mejora en el desempeño motor en la prueba de rotarod al usar las revoluciones de 10, 15 y 20 rpm en comparación con la fase de lesión con 6-OHDA en el haz medial. Y con los reportes de Razgado, 2014 (datos sin publicar) cuyos animales experimentales (lesionados con 6-OHDA intraestriatalmente) recibieron el co-tratamiento D3 (7-OH-DPAT) y BDNF (gen), presentaron recuperación en el tiempo de permanencia total en el rotarod a los 6.5 meses del co-tratamiento, tomando en cuenta que fueron 4.5 meses con tratamiento y 2 meses post-tratamiento. Estos datos son congruentes con la medición de la densidad óptica (OP) de las fibras dopaminérgicas en el NE donde se observa recuperación del 87.9% de la reinervación dopaminérgica (Razgado 2014, datos sin publicar). En nuestro trabajo la prueba de campo abierto, la recuperación es relativa al tiempo de la administración del co-tratamiento, a los 5 meses los animales recuperan su actividad exploratoria al 100%, aumentan la velocidad de desplazamiento por el recinto, explorándolo en mayor cantidad y presentando pocos periodos de inmovilidad, por lo que se presume que el síntoma de bradiscinesia se elimina. Este dato es consistente con el estudio de Benítez (2013) donde ratas con lesión bilateral de 6-OHDA y que recibieron el co-tratamiento D3 (7-OH-DPAT) y BDNF obtienen resultados similares. El que el tratamiento sea óptimo 5 meses después tomando en cuenta que solo a los 3 meses está presente el co-tratamiento y los 2 meses posteriores se retiran, quiere decir que el tratamiento tiene una función trófica debido a que permanece su efecto sin que esté siendo

administrado el tratamiento. Una vez que se observó que con el co-tratamiento las alteraciones motoras disminuyeron, con el análisis citológico se analizó si esta recuperación motora estaba relacionada con el restablecimiento del sistema dopaminérgico. La TH es la enzima limitante para la síntesis de DA, su cuantificación es importante porque se utiliza como marcador de neuronas DA con ello se puede determinar el grado de neuronas remanentes y recuperación de la innervación estriatal. Después de los 6 meses de inhalación de la mezcla de MnCl₂-Mn (OAc)₃ hubo pérdida del 66.65% de neuronas dopaminérgicas de la SNc; y a los 5 meses de la administración del co-tratamiento la recuperación neuronal fue del 100% con respecto al control; esto es similar con los datos mostrados por Raza y cols (datos sin publicar) en ratas con lesión en el estriado con 6-OHDA y el co-tratamiento D3 (7-OH-DPAT) y BDNF, que obtuvieron una recuperación del 95%.

Es importante que las neuronas de nueva generación sean neuronas funcionales, como sabemos las neuronas dopaminérgicas de la SNc inervan al NE que es el principal responsable de la actividad motora, es por ello que la recuperación de la vía nigroestriatal sería indispensable; la recuperación de las espinas dendríticas en las NEM del NE es un dato colateral de recuperación del sistema (Fasano et al., 2013) y sería una condición necesaria debido que es el lugar donde se lleva a cabo el contacto sináptico dopaminérgico (Day et al., 2006); con el conteo de las espinas dendríticas se obtuvo que después de las inhalaciones, la pérdida de las espinas es del 27.1% y posterior al co-tratamiento se recuperan un 100%, presentando valores muy similares al grupo control.

La neuroregeneración y funcionalidad de las neuronas dopaminérgicas de la SNc se le adjudica a la relación sinérgica entre el receptor D3 y el BDNF.

El efecto del tratamiento en las neuronas de la SNc se puede explicar con la hipótesis "endosoma de señalización" donde los receptores TrkB se encuentran sobre la membrana de la neurona y cuando el BDNF se une al receptor TrkB

forman un endosoma que se internaliza permitiendo la activación de cascadas de señalización como MAPK, PI3K y PLC γ responsables de la supervivencia celular, diferenciación celular y la plasticidad sináptica (Howe et al., 2001; Zheng et al., 2008), también se ha demostrado que la administración crónica del BDNF sobre la SN aumenta la locomoción espontánea, actividad rotacional (giro inducido con apomorfina o anfetamina) y la DA en el NE en la rata adulta (Altar et al., 1992; Martin-Iverson et al., 1994), así como el incremento de la frecuencia de disparo de las neuronas dopaminérgicas en la SN (Shen et al., 1994), sugiriendo que el BDNF aumenta la función del sistema dopaminérgico nigroestriatal. Así como el BDNF es responsable de la expresión de los receptores D3 durante el desarrollo embrionario y de mantener su expresión en el adulto (Guillin et al., 2001; 2003); el receptor D3 es sintetizado por las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Howells et al., 2000) siendo éste el responsable de la actividad neurogénica en ellas, se ha reportado que cuando se estimula selectivamente el receptor D3 se presenta restauración del circuito nigroestriatal (Van Kampen et al., 2004; 2005) influyéndolo que se ve reflejado en el desempeño motor (Ouagazzal y Creese, 2000; Van Kampen et al., 2006).

La formación de espinas dendríticas depende de la entrada glutamatérgica de la corteza y dopaminérgica de la SNc. La entrada dopaminérgica regula la acción excitatoria del glutamato que induce la liberación de Ca²⁺ que a su vez promueve la formación de la espina; esta DA nigral es acompañada del transporte anterogrado del BDNF a las espinas de las NEM; la función del BDNF en las espinas es restablecer el contacto sináptico. El agotamiento de la DA estriatal provoca una desregulación glutamatérgica (por la presencia de receptores D2 en la terminal glutamatérgica) que genera la pérdida de las espinas dendríticas de las NEM (Bouyer et al., 1984; Freund et al., 1984; Deutch, 2006), al recuperar la dopamina pérdida se restablecería el funcionamiento de la entrada glutamatérgica excitatoria y se recuperaría el contenido de BDNF en la espina. El BDNF también modula la ramificación de las dendritas, la morfología de la espina dendrítica

(Tanaka et al., 2008; Horch et al., 2002) así como la plasticidad sináptica y la potenciación a largo plazo (LTP) (Kang y Schuman, 1995; Figurov et al., 1996). El receptor D3 participa favoreciendo la arborización de dendritas de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Collo et al., 2008), esta hipótesis podría explicar la posible acción del tratamiento en el aumento significativo en el número de espinas del estriado de ambos lados, infiriendo la recuperación de las sinapsis. Nuestra hipótesis de lo que posiblemente sucedió con el tratamiento se apoya de los estudios de Baydyuk y cols. (2010; 2011; 2013), que comprueban la especificidad del BDNF-TrkB en las NEM; y de Benítez en el 2013, que reporta la eficacia y especificidad del co-tratamiento con el agonista D3 (7-OH-DPAT) y BDNF en un modelo de lesión bilateral, con microscopía confocal mostró la co-localización de células inmunorreactivas a TH y BDNF-flag en neuronas de la SNc, mostrando el porcentaje de expresión del BDNF-flag en la SNc estaba entre el 94% y 93%. (Gráfica 12 y figura 28).

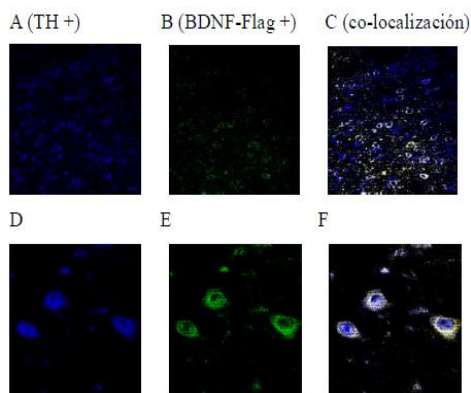
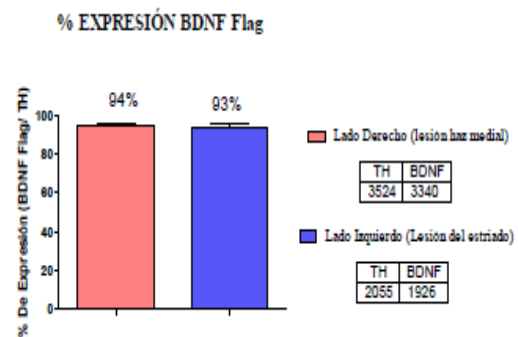


Figura .28. Imágenes de microscopía confocal para evaluar el porcentaje de expresión de las neuronas positivas a TH y BDNF flag en la SNc de ambos lados. En los paneles A, B y C, se muestra una imagen panorámica de la SNc; A se observa una imagen panorámica de la sustancia nigra correspondiente a la inmunoreactividad Anti TH, en B la inmunoreactividad a Anti-BDNF-flag y en C la combinación de ambos, donde se aprecia la colocalización de los dos marcadores asegurando la expresión del BDNF-flag en las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra, son acercamiento a 20X. En los paneles D, E y F son acercamientos a 63X de algunas neuronas presentes en la SNc, en D se muestra la inmunoreactividad Anti-TH, en E podemos observar la imagen con la inmunoreactividad Anti-BDNF-flag en verde y en F la combinación de ambos anticuerpos.



Gráfica. 12. Porcentaje de expresión de las neuronas positivas a TH y BDNF-flag en la SNc de ambos lados. Del lado derecho de la SNc hubo un porcentaje de expresión del 94% y del lado izquierdo obtuvimos un porcentaje del 93% asegurando la expresión del BDNF en las neuronas dopaminérgicas remanentes. La tabla muestra los valores obtenidos en la cuenta de las neuronas tanto positivas solo a TH como al BDNF-flag. Las barras representan el promedio de las mediciones individuales \pm el error estándar para cada lado (Lesionada + 7-OH-DPAT + BDNF).

En un ambiente dañado para las neuronas dopaminérgicas de la SNc como el de los enfermos de Parkinson en el que el BDNF se encuentra disminuido al igual que

el receptor D3 (Howells et al., 2000; Guillin et al., 2001 y 2003), un tratamiento que recupere los contenidos de estos factores tendría como consecuencia una acción neuroprotectora de la neuronas DA y esto, posiblemente, permitiría una disminución o eliminación de la sintomatología conductual, que podría ser aconsejable para las personas con este padecimiento.

La prueba de campo abierto permite analizar la conducta emocional, y se ha observado que posterior al co-tratamiento los animales aumentaron su nivel de ansiedad. Esto también fue reportado por Reyna en 2012, que observó aumento en el nivel de ansiedad, lo que explica como una respuesta positiva al tratamiento, debido a que la recuperación de la inervación dopaminérgica produce un estado de mayor alerta. Sin embargo también se sabe que la inervación dopaminérgica nigral puede ser nigroestriatal y exoestriatal; el sistema nigro-extraestriatal inerva sincrónicamente a distintos núcleos, ya que una neurona de la SNc inerva con sus ramificaciones colaterales al núcleo reticular talámico (NRT), GP y/o NE (Anaya, 2006), y se ha establecido que los componentes emocionales como la ansiedad están más relacionados con núcleos extraestriatales por ejemplo el tálamo; Picazo en el 2009 reporta la relación que existe entre la pérdida dopaminérgica de la SNc y el NRT en la aparición del síntoma de la ansiedad. Es por esto, que otra explicación de por qué el tratamiento no elimina el síntoma de la ansiedad y al contrario la aumenta, podría ser que el tratamiento a los 5 meses aún no recupera la inervación de las colaterales al tálamo y como sabemos el tálamo es una estructura importante del sistema límbico ya que es el responsable de controlar la respuesta emocional a una situación determinada.

Por otra parte en este estudio existió una variable negativa que fue la pérdida de gran parte de los individuos posterior a las cirugías de transfección y colocación de la bomba de microdifusión, suponiendo que fue producto de un proceso invasivo, sin embargo animales con el mismo tratamiento con diferente modelo sobrevivieron. Se ha establecido que la ingesta mínima de Mn es responsable de

regular la función de sistema inmune, por lo que el exceso (toxicidad) de su contenido en el organismo podría debilitarlo provocando cierta vulnerabilidad a infecciones, así como también es responsable de la respuesta inflamatoria de los pulmones ocasionando síntomas como tos, bronquitis y neumonía. Y otros síntomas como la pérdida de apetito, apatía e insomnio. Síntomas como problemas respiratorios sí fueron observados en nuestros animales, así como pérdida de apetito, por lo que suponemos que las inhalaciones de Mn debilitaron el sistema inmune, lo que produjo mayor sensibilidad posterior a las intervenciones.

CONCLUSIÓN.

Modelo del Mn (MnCl₂-Mn (OAc)₃)

- ✓ Es un modelo óptimo para reproducir la enfermedad de Parkinson debido a que es bilateral, no invasivo, crónico y progresivo.
- ✓ Reproduce las conductas sintomáticas (hipocinesia e inestabilidad postural) y emocionales (ansiedad).
- ✓ Indujo una pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNc del 65.95% y de espinas dendríticas de las NEMs del 82.2%.

Co-tratamiento agonista D3 (7-OH-DPAT) y BDNF.

- ✓ El co-tratamiento con 7-OH-DPAT y BDNF recupera la coordinación motora evaluada con la prueba de rotarod.
- ✓ El co-tratamiento con 7-OH-DPAT y BDNF al menos preserva las neuronas dopaminérgicas de la SNc.
- ✓ El co-tratamiento con 7-OH-DPAT y BDNF recupera o preserva las espinas dendríticas de las NEM, confirmando la recuperación de la vía nigro-estriatal.
- ✓ El co-tratamiento con 7-OH-DPAT y BDNF no elimina los síntomas emocionales como la ansiedad.
- ✓ El co-tratamiento con 7-OH-DPAT y BDNF reitera la importancia de un ambiente enriquecido con estos componentes (BDNF y D3R) para la neuroprotección de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, ponderándolo como un tratamiento viable para la EP.

PERSPECTIVAS.

El modelo de Mn es un modelo que reproduce las alteraciones motoras de la EP, sin embargo es importante que un modelo sea lo más parecido a la enfermedad, y en este estudio se muestran los primeros indicios de síntomas no motores como la ansiedad, lo que deja a recomendación próximas pruebas específicas para determinar la presencia de estos síntomas no motores.

El modelo de Mn presentó dos variables importantes en el conteo de neuronas positivas a TH de la SNC:

*Posible recuperación a los 10 meses (6m exp-Mn y 5m sin exp/sin tto) (Anexo).

*Posible lateralización del modelo, esto se refiere a que la pérdida neuronal inicia primero de un lado del cerebro (izq-der), a pesar de que el modelo es bilateral y se pensaría que el daño fuera asimétrico.

*Comprobar si este modelo debilita el sistema inmune para tomar medidas en beneficio de la sobrevivencia de los animales.

Es por ello que estas variables observadas deben ser estandarizadas para definir la viabilidad del modelo.

La prueba de pasarela es una prueba muy fina para determinar las alteraciones motoras de la marcha, es importante se corrijan o se revisen las variables que no permitieron un análisis correcto de la prueba.

La preservación significativa de las neuronas dopaminérgicas de la SNC, el restablecimiento de la vía nigro-estriatal así como la recuperación de la coordinación motora se probablemente se debe, a la relación sinérgica entre el BDNF y el receptor D3, sin embargo sería importante explorar si este restablecimiento del sistema se debió a una posible respuesta neurogénica, ya que como antecedente se sabe que la neurogénesis, en etapa adulta, es estimulada por estos dos elementos (BDNF y RD3); y así proponerlo como un posible tratamiento neurogenerativo y neuroprotector viable para pacientes con EP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

A

Akunne H, Towers P, Ellis G, Dijkstra D, Wikstrom H, Heffner T, Wise L, Pugsley T. (1995). Characterization of binding of [3H]PD 128907, a selective dopamine D3 receptor agonist ligand, to CHO-K1 cells. *Life Science*. 57: 1401-1410.

Alanis QM. (1996). Historia natural de la enfermedad de Parkinson. En Otero-Siliceo. 1996. Parkinson enfoque al futuro. Instituto Nacional de Neurología. Fondo de Cultura Económica. México. 11-17.

Alarcón A, Santamaría del Ángel A, Konigsberg F. (2010). Modelos Neurotóxicos de la enfermedad de Parkinson y Disfunción mitocondrial. *Revista de Educación Bioquímica*. 29(3): 92-100.

Alexander G, Crutcher H. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: Neuronal substrates of parallel processing. 137. 266-271.

Allen S, Dawbarn D. (2006). Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clinical Science*. 110: 175-191.

Alm P. (2007). A new framework for understanding stuttering: The dual premotor model. In *Research, Treatment, and Self-Help in Fluency Disorders: New Horizons: Proceedings of the Fifth World Congress on Fluency Disorders*, Dublin. (pp. 77-83). The International Fluency Association.

Arbuthnott G, Ingham C, Wickens J. (2000). Dopamine and synaptic plasticity in the neostriatum. *Journal of Anatomy*. 196:587-596.

Argüelles D, Bernal V, Martínez-Fong, D. (2002). Modernos caballos de Troya. *Avance y Perspectiva*. 21:15-20.

Altar C, Boylan C, Jackson C, Hershenon S, Miller J, Wiegand S, Hyman C. (1992). Brain-derived neurotrophic factor augments rotational behavior and nigrostriatal dopamine turnover in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89(23): 11347-11351.

Álvarez-Maya I, Navarro-Quiroga I, Meraz-Ríos M, Aceves J, Martínez-Fong D. (2001). In vivo gene transfer to dopamine neurons of rat substantia nigra via the high-affinity neurotensin receptor. *Molecular Medicine*. 7: 186-192.

Anaya-Martínez V. (2006). Colaterales axónicas de las neuronas de la sustancia negra parte compacta: Inervación dopaminérgica del núcleo reticular talámico. Tesis de doctorado, Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV, UNIDAD ZACATENCO.

Arango-Rodríguez M, Navarro-Quiroga I, González-Barrios J, Martínez-Arguelles D, Bannon M, Kouri J, Martínez-Fong D. (2006). Biophysical characteristics of neurotensin polyplex for in vitro and in vivo gene transfection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects*. 1760(7): 1009-1020.

Aposhian H, Ingersoll R, Montgomery E. (1999). Transport and control of manganese ions in central nervous system. *Environmental Research section A* 80: 96-98.

Arias-Carrión O. (2008). Terapia celular para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. *Revista Medica Universidad de Navarra*. 52 (2):17-24

Aschner M, Erikson, K, Dorman D. (2005). Manganese dosimetry: species differences and implication for neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology*. 35: 1-32.

Aschner M, Guilarte T, Schneider J, Zheng W. (2007). Manganese: Recent advances in understanding its transport and neurotoxicity *Toxicology and Applied Pharmacology*. 221:131-147.

Ávila-Costa M, Flores E, Colin-Barenque L, Ordoñez J, Gutiérrez A, Niño-Cabrera H, Fortoul T. (2004). Nigrostriatal modifications after vanadium inhalation: an immunocytochemical and cytological approach. *Neurochemical research*. 29(7): 1365-1369.

Avila-Costa M, Ordoñez-Librado J, Anaya-Martínez V, Sánchez-Betancourt J, Gutiérrez-Valdez A, Reynoso-Erazo L. (2013). Inhalación de manganeso como modelo experimental de la Enfermedad de Parkinson. En: Butanda A, Guevara-Flores A, Guevara-Fonseca J, Matuz-Mares D, Rendón E, Vázquez-Meza H. (2013). *Mensaje Bioquímico*. Universidad Nacional Autónoma de México. 37: 140 - 159,

B

Barde Y, Edgar D, Thoenen H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO Journal*. 1:549-553.

Baron M, Vitek J, Bakay R, Green J, McDonald W, Cole S, DeLong R.(2000). Treatment of advanced Parkinson's disease by unilateral posterior GPi pallidotomy: 4- year results of a pilot study. *Movement Disorders*. 15: 230-237.

Baquet Z, Gorski J, Jones K. (2004). Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor. *The Journal of Neuroscience*. 24: 4250-4258.

Baydyuk M, Russel T, Liao G, Zang K, Ji A, Reichard L, Xu B. (2010). TrkB receptor controls striatal formation by regulation the number of newborn striatal neurons. *PNAS*. 108. (4): 1699-1674.

Baydyuk M, Nguyen M, Xu B. (2011). Chronic deprivation of TrkB signaling leads to selective late-onset nigrostriatal dopaminergic degeneration. *Experimental Neurology*. 228:118-125.

Baydyuk M, Xie Y, Tessarollo L, Xu Baoji X. (2013). Midbrain-Derived Neurotrophins Support Survival of Immature Striatal Projection Neurons. *The Journal of Neuroscience*. 33(8):3363-3369.

Beattie E, Howe C, Wilde A, Brodsky F, Mobley W. (2000). NGF signals through TrkA to increase clathrin at the plasma membrane and enhance clathrin-mediated membrane trafficking. *The Journal of Neuroscience*. 20:7325-7333.

Beckstead R, Domesick V, Nauta W. (1979). Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Res*. 175:191-217.

Beckstead R, Frankfurter A. (1982). The distribution and some morphological features of substantia nigra neurons that project to the thalamus, superior colliculus and pedunculo-pontine nucleus in the monkey. *Neuroscience*. 7(10):2377-2388.

Benítez, CA. (2013). Evaluación del tratamiento con el agonista preferencial del receptor D3 (7-OHDPAT) asociado a la transfección del BDNF en un nuevo modelo de la enfermedad de Parkinson en rata. Tesis Maestría. Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias. CINVESTAV, UNIDAD ZACATENCO.

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

Betarbet R, Sherer T, Greenamyre J. (2002). Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays*. 24: 308-318.

Björklund T, Kirik D. (2009). Scientific rationale for the development of gene therapy strategies for Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*. 1792:703-13.

Blöchl A, Sirrenberg C. (1996). Neurotrophins stimulate the release of dopamine from rat mesencephalic neurons via Trk and p75L_{nt}r receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 271(35): 21100-21107.

Booze R, Wallace D. (1995). Dopamine D2 and D3 receptors in the rat striatum and nucleus accumbens: use of 7-OH-DPAT and [125I]-iodosulpride. *Synapse*. 19: 1-13.

Bourne J, Harris K.(2008). Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annual Review of Neuroscience*. 31:47 – 67.

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

Bové J, Prou D, Perier C, Przedborski, S. (2005). Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx*. 2(3):484- 494.

Braak H, Braak E. (2000). Pathoanatomy of Parkinson's disease. *Journal Neurology*. 247, 3- 10.

Briones L. (2013). Efecto del tratamiento con L-Dopa asociado a la transfección del gen del factor neurotrófico BDNF en el control del Parkinson experimental. Tesis Maestría. Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV, UNIDAD ZACATENCO.

C

Cabezas R, Ávila M, Torrente D, El-Bachá R, Morales L, Gonzalez J, Barreto G. (2013). Astrocytes Role in Parkinson: A Double-Edged Sword. *Neurodegenerative Diseases*. INTECH. P. 497.

Camp D, Browman K, Robinson T. (1994). The effects of methamphetamine and cocaine on motor behavior and extracellular dopamine in the ventral striatum of Lewis versus Fisher 344 rats. *Brain Research*. 668:180-193.

Campdelacreu J. (2012). Enfermedad de Parkinson y Enfermedad de Alzheimer: factores de riesgo ambientales. *Neurología*.

Carlin R, Grab D, Cohen R, Siekevitz P. (1980). Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *The Journal of Cell Biology*. 86, 831–845.

Castillo-Padilla D, Rivas-Arancibia S. (2011). Interacción entre factores neurotróficos y especies reactivas de oxígeno en los mecanismos de muerte y proliferación celular. *Archivo de Neurociencias*. 16(1): 26-32.

Cathomas F, Vogler C, Euler-Sigmund J, Quervain D, Papassotiropoulos A. (2010). Fine-mapping of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene supports an association of the Val66Met polymorphism with episodic memory. *The international journal of neuropsychopharmacology*. 13(08): 975-980.

Cepeda C, Hurst R, Altemus K, Flores-Hernandez J, Calvert C, Jokel E, Grandy D, Low M, Rubinstein M, Ariano M, Levine M. (2001). Facilitated glutamatergic transmission in the striatum of D2 dopamine receptor-deficient mice. *Journal of Neurophysiology*. 85: 659–670.

Chakravarthy S, Saiepour M, Bence M, Perry S, Hartman R, Couey J, Mansvelder H, Levelt C. (2006). Postsynaptic TrkB signaling has distinct roles in spine maintenance in adult visual cortex and hippocampus. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103: 1071–1076.

Chin-Chang H, Yi-Hsin W, Chin-Song L, Nai-Shin C, Tzu-Chen Y. (2003). Dopamine transporter binding in chronic manganese intoxication. *Journal of Neurology*. 250: 1335-1339.

Critchfield J, Keen C. (1992). Manganese +2 exhibits dynamic binding to multiple ligands in human plasma. *Metabolism*. 41(10): 1087-1092.

Collo G, Zanetti S, Missale C, Spano P. (2008). Dopamine D3 receptor-preferring agonists increase dendrite arborization of mesencephalic dopaminergic neurons via extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. *The European journal of neuroscience*. 28:1231-1240.

D

Dauer W, Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models, *Neuron*. 39(6): 889–909.

Day M, Wang Z, Ding J, An X, Ingham C, Shering A, Wokosin D, Ilijic E, Sun Z, Sampson A, Mugnaini E, Deutch A, Sesack S, Arbuthnott G, Surmeier D. (2006). Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nature neuroscience*. 9:251-259.

Debeir T, Ginesteta L, Francois, C, Laurens S, Martel J, Chopin P, Marien M, Colpaert F, Raisman-Vozari R. (2005). Effect of intrastriatal 6-OHDA lesion on dopaminergic innervation of the rat cortex and globus pallidus. *Experimental Neurology*. 19(2) 3:444- 454.

De Bie R, Schuurman P, Esselink R, Bosch D, Speelman, J. (2002). Bilateral pallidotomy in Parkinson's disease: a retrospective study. *Movement Disorders*. 17: 533- 538.

Deierborg T, Soulet D, Roybon L, Hall V, Brundin P. (2008). Emerging restorative treatments for Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*. 85(4), 407- 32.

Delwaide P. y Gonce M. (1993). Pathophysiology of Parkinson's signs. In J. Jankovic y E. Tolosa (Eds). *Parkinson's Disease and Movement Disorders*, Williams and Wilkins, Baltimore. pp.77-92.

Deogracias R.(2007). Regulación de la expresión del receptor de neurotrofinas TrkB en células nerviosas. Mecanismos moleculares e implicaciones biológicas. Madrid.s.n. . Presentada en Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC - UAM para la obtención del grado de Doctor.

Deutch A. (2006). Striatal plasticity in parkinsonism: dystrophic changes in medium spiny neurons and progression in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission Supplementa*. (70): 67-70.

DeVito J, Anderson M. (1982). An autoradiographic study of efferent connections of the globus pallidus in *Macaca mulatta*. *Experimental Brain Research*. 46: 107-117.

Diaz, J, Ridray S, Mignon V, Griffon N, Schwartz J, Sokoloff P. (1997). Selective expression of dopamine D3 receptor mRNA in proliferative zones during embryonic development of the rat brain. *The Journal of Neuroscience*. 17:4282-4292

DiChiara G, Porceddu M, Morelli M, Gessa G. (1979). Evidence for a GABAergic projection from the substantia nigra to the ventromedial thalamus and to the superior colliculus of the rat. *Brain Research*. 176:273-284.

DiMauro S. (1993). Mitochondrial involvement in Parkinson's disease: The controversy continues. *Neurology*. 43:2170-2172

Du F. (2005). Dopamine D3 receptor-preferring agonists induce neurotrophic effects on mesencephalic dopamine neurons. *European Journal Neuroscience*. 22(10):2422-30.

Dunnett S, Iversen S. (1982). Sensorimotor impairments following localized kainic acid and 6-hydroxydopamine lesions of the neostriatum. *Brain Research*. 248(1):121-127.

E

Egan M, Kojima M, Callicott J, Goldberg T, Kolachana B, Bertolino A, Weinberger D. (2003). The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*. 112(2), 257-269.

Elizondo-Cardenas G, Déctor-Carrillo M, Martínez-Rodríguez, H, Martinez de Villareal L, Esmer- Sanchez, M. (2011). Genética y la enfermedad de Parkinson: Revisión de actualidades. *Medicina Universitaria*. 19(51):96-100.

Emborg ME. (2004). Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. *Journal of Neuroscience Methods*. 139(2):121-43.

English C, Vigers A, Jones K. (2012). Genetic evidence that brain-derived neurotrophic factor mediates competitive interactions between individual cortical neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(47), 19456-19461.

Erikson K, Syversen T, Aschner J, Aschner M. (2005). Interactions between excessive manganese exposures and dietary iron-deficiency in neurodegeneration. *Environmental. Toxicology and Pharmacology*. 19:415-421.

Erikson K, Thompson, J. Aschner M. Aschner J. (2007). Manganese neurotoxicity: a focus on the neonate. *Pharmacology and Therapeutics*. 113. 369-377.

Erro R, Pappata S, Amboni M, Vicidomini C, Longo K, Santagelo G, Picillo M, Vitale C, Moccia M, Giordino F, Brunetti A, Pellicchia M, Salvatore M, Barone P. (2012). Anxiety is associated with striatal dopamine transporter availability in newly diagnosed untreated Parkinson's disease patients. *Parkinsonism and Related Disorders*. 18:1034-1038.

Ethell I, Pasquale E. (2005). Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Progress in Neurobiology*. 75: 161 – 205.

Evan M, Villanueva M. (2005). Etiopatogenia y clínica de la Enfermedad de Parkinson. *La medicina Hoy*. Barcelona. 67(1)567.

F

Fallon J, Moore R. (1978). Catecholamine innervation of the basal forebrain IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *Journal of Comparative Neurology*. 180(3): 545-579.

Fahn S. (2003). Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann NY Acad Sci*. 991:1-14.

Faull R, Mehler W. (1978) The cells of origin of nigrotectal, nigrothalamic and nigrostriatal projections in the rat. *Neuroscience*. 3:989-1002.

Faure M, Alonso A, Nouel D, Gaudriault G, Dennis M, Vincent J, Beaudet A. (1995). Somato dendritic internalization and perinuclear targeting of neurotensin in the mammalian brain. *The Journal of Neuroscience*. 15: 4140-4147.

Figurov A, Pozzo-Miller L. D, Olafsson P, Wang T, Lu, B. (1996). Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature*. 381:706-709.

Frame M, Milanick M. (1991). Mn and Cd transport by the Na-Ca exchanger of ferret red blood cell. *American Journal of Physiology*. 261: 467-475.

Freed W.(1991). Substantia nigra grafts and Parkinson's disease: from animal experiments to human therapeutic trials. *Restorative Neurology Neuroscience*. 3: 109-134.

Fregozo C, Vega M. (2012). Participación de las proteínas de unión a la actina y vías de señalización asociadas a la formación y mantenimiento de las espinas dendríticas. *Neurología: Publicación oficial de la Sociedad Española de Neurología*. 27(7): 421-431.

Freund T, Powell J, Smith A. (1984). Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience*. 13:1189-1179.

Fonnum F, Gottesfeld Z, Grofova I. (1978). Distribution of glutamate decarboxylase, choline acetyltransferase and aromatic amino acid decarboxylase in the basal ganglia of normal and operated rats. Evidence for striatopallidal, striatopeduncular and striatonigral GABAergic fibres. *Brain Research*. 143:125-138

Ford B. (2012). *Tratando el Parkinson:DBS*. Parkinson's Disease Foundation. pp 1-10.

G

Gal S, Fridkin M, Amit T, Zheng H, Youdim M. (2006). M30, a novel multifunctional protective drug with potent iron chelating and brain selective monoamine oxidase-ab inhibitory activity for Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission Supplementa*. 70:447-56.

Gallardo P, Gallardo P, Naranjo B, Sáez A, Lucena M, Luna P. (2012). Trastornos del sueño. Clasificación y codificación. Málaga: FESITESS ANDALUCÍA. pp 50-54

Garbayo E, Aymerich M, Ansorena E, Lanciego J, Blanco-Prieto M. (2006). Terapias neuroprotectoras y neurorestauradoras en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. *Anales del sistema sanitario de Navarra*. 29(3):325-335.

García ChE. (2006). Evaluación de la marcha y de propagación del impulso nervioso en nervios periféricos de ratas tratadas subcrónicamente con Arsenito. Participación del estrés oxidativo. Tesis de doctorado en ciencias (toxicología), CINVESTAV-Zacatenco, México. pp. 20-30.

García-López P, García-Marín V, Freire M. (2007). The discovery of dendritic spines by Cajal in 1888 and its relevance in the present neuroscience. *Progress in neurobiology*. 83(2), 110-130.

García S, Sauri S, Meza D, Lucino C. (2008). Perspectiva histórica y aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Parkinson. *Medicina Interna de México*. 24(1):28-37.

Garduño B, Rangel-Barajas C. (2005). Activación de receptores dopaminérgicos por L-DOPA. De la acción terapéutica a las discinesias. *Revista Biomedica*. 16:273-280.

Garonzik I, Hua, S, Ohara S, Lenz F. (2002). Intraoperative microelectrode and semi-microelectrode recording during the physiological localization of the thalamic nucleus ventral intermediate. *Movement Disorders*. 17 Suppl 3: S135-44.

Gavin C, Gunter K, Gunter T. (1990). Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria. Relevance to manganese toxicity. *The Biochemical Journal*. 266: 329-334.

Gehlert D.(1992). Quantitative autoradiography of Gpp (NH)p sensitive and insensitive [3H]quinpirole binding sites in the rat brain. *Synapse*. 14: 113-120.

Gerlach M, Rieder P. (1999). Time sequences of dopaminergic cell death in Parkinson's disease. Indication for neuroprotective studies. *Advances in Neurology*.80:219-225.

Gershanik OS. (2003). Early onset parkinsonian. *Frontiers in Bioscience*. 8: 568-78.

Gibb W, Rieder P. (1991). Anatomy, pigmentation ventral and dorsal substantia nigra, and differential cell death in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*.54:388-396.

Gilmans A, Winans, N. (1994). Principios de neuroanatomía y neurofisiología clínica de Monter y Gatz. El manual moderno. 3ª Edición. México. D.F. pág 183-192.

Giros B, Martres M, Sokoloff P, Schwartz J. (1990). Clonage du gene recepteur dopaminergique D3 humain et identification de son chromosome. *Comptes Rendus de l' Académie des Sciences*. 3 (311): 501-508.

Giroud-Benitez J. (2004). Enfermedad de Parkinson de inicio temprano *Rev. Neurol*. 38(07): 637

Glinka Y, Tripton K, Youdim M. (1988). Mechanism of inhibition of mitochondrial respiratory complex 1 by 6-hydroxydopamine and its prevention by desferrioxamine. *European Journal of Pharmacology*.35:121-129.

Gómez J, Fusté E. (1994). Medición de la conducta murina en el campo abierto: criterios de agregación. *Revista de Psicología general y aplicada*. 47(3): 285-288.

González-Barrios J, Lindahl M, Bannon M, Anaya-Martínez V, Flores G, Navarro-Quiroga I, Martinez-Fong D. (2004). Neurotensin polyplex as an efficient carrier for delivering the human GDNF gene into nigral dopamine neurons of hemiparkinsonian rats. *Molecular Therapy*. 14(6): 857-865.

González-Hernández T, Rodríguez M. (2000). Compartmental organization and chemical profile of dopaminergic and GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat. *Journal of Comparative Neurology*. 421(1): 107-135.

González SM. (2011). Inhibición de la síntesis de neurotransmisor en neuronas dopaminérgicas de los ganglios basales. Localización celular del receptor H3 de Histamina. Barcelona s.n. Tesis Presentada por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Graham DG. (1978). Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol*. 14:633-643.

Graybiel AM. (2000). The basal ganglia. *Current Biology*. 10:R 509–R511.

Guillin O, Diaz, J, Carroll, P, Griffon, N, Schwartz, J, Sokoloff, P. (2001). BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization. *Nature*. 411(6833): 86–9.

Guillin O, Griffon N, Bezard E, Leriche L, Diaz J, Gross C, Sokoloff P. (2003). Brain-derived neurotrophic factor controls dopamine D3 receptor expression: therapeutic implications in Parkinson's disease. *European Journal of Pharmacology*. 480(1-3):89–95.

Gunter T, Miller L, Gavin C, Eliseev R, Salter J, Buntinas L, Alexandrov A, Hammond S, Gunter K. (2004). Determination of the oxidation states of manganese in brain, liver, and heart mitochondria. *Journal of Neurochemistry*. 88: 266–280.

Gunshin H, Mackenzie B, Berger U, Gunshin Y, Romero M, Boron W, Nussberger S, Gollan J, Hediger M. (1997). Cloning and characterization of a mammalian protein-coupled metal-ion transporter. *Nature*. 388: 482–488.

Gutiérrez-Valdez AL. (2007). Comparación del efecto de diferentes fármacos en un modelo animal de enfermedad de Parkinson. Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias biológicas. FES-Iztacala UNAM, México.

H

Haber S, Fude J, McFarland N. (2000). Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *The Journal of Neuroscience*. 20(6): 2369-2382.

Hardman J, Limbird L, Molinoff P, Ruddon R. (1996). *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica de Goodman y Gilman*. McGrawHill. pp:524-549.

Harper G, Thoenen H. (1981). Target cells, biological effects, and mechanism of action of nerve growth factor and its antibodies. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 21: 205-229.

Harris KM. (1999). Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Current Opinion in Neurobiology*. 9: 343–348.

Hattori K, Naguro I, Runchel C, Ichijo H. (2009). The roles of ASK family proteins in stress responses and diseases. *Cell Commun Signaling*. 7:9.

Hearn A, Stroupe M, Cabelli A, Ramilo C, Luba J, Tainer J, Nick H, Silver D. (2003). Catalytic and structural effects of amino acid substitution at histidine 30 in human manganese superoxide dismutase: Insertion of valine C gamma into the substrate access channel. *Biochemistry*. 42:2781-2789.

Henze C, Earla C, Sauttera J, Schimidtb N, Themann C, Hartmanna A, Oertel W. (2005). Reactive oxidative and nitrogen species in the nigrostriatal system following striatal 6-hydroxydopamine lesion in rats. *Brain Research*. 1052:97-207.

Hernandez-Baltazar D, Martinez-Fong D, Trudeau L. (2012). Optimizing NTS-Polyplex as a Tool for Gene Transfer to Cultured Dopamine Neurons. *PLoS One*. 7(12): 51341.

Hoehn M, Yahr M. (1998). Parkinsonism: onset, progression, and mortality. *Neurology*. 50(2): 318-318.

Hoglinger G, Feger J, Prigent A, Michel P, Parain K, Champy P, Ruberg M, Oertel W, Hirsch E. (2003). Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *Journal of Neurochemistry*. 84: 491-502.

Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H. (2000). The neuroprotective effect of inflammation: implications for therapy of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*. 107:161-166.

Holligan W, Kischka U, Marshal C. (2004). *Handbook of Clinical Neurophysiology*. 2° edicion. Oxford-University. Oxford, UK. P. 873.

Hopkins D, Niessen L. (1976). Substantia nigra projections to the reticular formation, superior colliculus and central gray in the rat, cat and monkey. *Neuroscience Letters*. 2:253-259.

Horch, H, Katz, L. (2002). BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nature Neuroscience*. 5: 1177-1184.

Howe C, Valletta J, Rusnak A, Mobley W. (2001). NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway. *Neuron*. 32: 801-814.

Howells D, Porritt M, Wong J, Batchelor P, Kalnins R, Hughes J, Donnan G. (2000). Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. *Experimental neurology*. 166(1): 127-35.

Huang E, Reichardt L. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual Review of Neuroscience*. 24: 677-736.

Hughes A, Daniel S, Ben-Shlomo Y, Lees A. (2002). The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain*. 125: 861-870.

Hyman C, Hofer M, Barde Y, Juhasz M, Yancopoulos G, Squinto S, Lindsay R. (1991). BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature*. 350(6315): 230-232.

Hyman C, Juhasz M, Jackson C, Wright P, Ip N, Lindsay R. (1994). Overlapping and distinct actions of the neurotrophins BDNF, NT-3, and NT-4/5 on cultured dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalon. *The Journal of neuroscience*. 14(1):335-347.

I

Ingham C, Hood S, Arbuthnott G. (1989) Spine density on neostriatal neurones changes with 6-hydroxydopamine lesions and with age. *Brain Research*. 503: 334-338.

Irigoyen J, Jiménez Y, López C, Huerta F. (1999). Análisis de Comportamiento en Campo Abierto. *Revista Sonorense de Psicología*. 13(2): 30- 46.

J

Jackson D, Westlind-Danielsson A. (1994). Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioral aspects. *Pharmacol Ther*. 64: 291-369.

Jang S, Liu X, Yepes M, Shepherd K, Miller G, Liu Y, Ye K. (2010). A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7, 8-dihydroxyflavone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107(6): 2687-2692.

Jaimez CM. (2007). Estudio de un modelo catecolaminérgico del sistema nervioso periférico y su relación con la enfermedad de Parkinson y las disfunciones simpáticas derivadas. Tesis Doctorado. Universidad de Valencia.

Jaunarajs K, Angoa-Perez M, Kuhn D, Bishop C. (2011). Potential mechanisms underlying anxiety and depression in Parkinson's disease: consequences of L-DOPA treatment. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 35(3):556-64.

Johnson H, Hökfelt T, Ulfhake B. (1996). Decreased expression of TrkB and TrkC mRNAs in spinal motoneurons of aged rats. *European Journal of Neuroscience*. 8: 494-499.

K

Kaneko M, Xie Y, An J, Stryker M, Xu B. (2012). Dendritic BDNF synthesis is required for late-phase spine maturation and recovery of cortical responses following sensory deprivation. *The Journal of Neuroscience*. 32(14): 4790-4802.

Kang H, Schuman E. (1995). Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science*. 267: 1658-1662.

Kilpatrick I, Starr M, Fletcher A, James T, Macleod N. (1980). Evidence for a GABAergic nigrothalamic pathway in the rat-I. Behavioral and biochemical studies. *Experimental Brain Research*. 40:45-54.

Kim J, Bak I, Hassler R, Okada Y. (1971). Role of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the extrapyramidal motor system: 2. Some evidence for the existence of typer of GABA- rich strionigral neuron. *Experimental Brain Research*. 14:95:104.

Kolb B, Whishaw I. (2009). *Fundamentals of human neuropsychology*. Macmillan. Nueva York . p. 8-9.

Kopyov O, Jacques D, Duma C, Buckwalter G, Kopyov, A, Lieberman A, Copcutt B. (1997). Microelectrode-guided posteroventral medial radiofrequency pallidotomy for Parkinson's disease. *Journal of neurosurgery*. 87(1): 52-59.

Koolman J, Roehm H. (2005). *Color Atlas of Biochemistry*. 2º edición. Editorial Marcel Dekker.NY,EEUU. pp: 606.

Kung M, Chumpradit S, Frederick D, Garner S, Burris K, Molinoff P, Kung H.(1994). Characterization of binding sites for [125I] R(1)trans-7-OH-PIPAT in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 350: 611-617.

L

Lahti R, Roberts R, Tamminga C. (1995). D2-family receptor distribution in human post-mortem tissue: an autoradiographic study. *NeuroReport*. 6: 2505-2512.

Lai E, Jankovic J, Krauss J, Ondo W, Grossman R. (2000). Long-term efficacy of posteroventral pallidotomy in the treatment of Parkinson's disease. *Neurology*. 55: 1218-1222.

Laitinen L, Bergenheim A, Hariz M. (1992). Leksell's posteroventral pallidotomy in the treatment of Parkinson's disease. *Journal of Neurosurgery*. 76: 53-61.

Lalonde R, Hayzoun K, Selimi, F, Mariani J, Strazielle C. (2003). Motor coordination in mice with hotfoot, Lurcher, and double mutations of the Grid2 gene encoding the delta-2 excitatory amino acid receptor. *Physiology and behavior*. 80(2): 333-339.

Lambert ME. (2002). Cambios emocionales en los enfermos de Parkinson. En: J. Thomas Asistencia y cuidados del paciente de Parkinson, 35-51.

Langston J, Ballard P, Tetrud J. (1983). Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine analog synthesis. *Science*. 219:979-980.

Landis D, Reese T. (1983). Cytoplasmic organization in cerebellar dendritic spines. *The Journal of Cell Biology*. 97:1169–78.

Landwehrmeyer B, Mengod G, Palacios J. (1993). Dopamine D3 receptor mRNA and binding sites in human brain. *Molecular Brain Research*. 18: 187-192.

Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M. (2003). Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in Neurobiology*. 69(5):341-74.

Levant B, Grigoriadis D, Desouza E. (1992). Characterization of [3H]quinpirole binding to D2-like dopamine receptors in rat brain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 262: 929-935.

Lévesque D, Diaz J, Pilon, C, Martres, M, Giros B, Souil E, Schott D, Morgat J, Schwartz J, Sokoloff P. (1992). Identification, characterization, and localization of the dopamine D3 receptor in rat brain using 7-[3H]hydroxy-n,n-di-n-propyl-2-aminotetralin. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89: 8155-8159.

Lewis M, Hunihan L, Franco D, Robertson B, Palmer J, Laurent D, Westphal R. (2006). Identification and characterization of compounds that potentiate NT-3-mediated Trk receptor activity. *Molecular pharmacology*. 69(4), 1396-1404.

Levant B, Bancroft G, Selkirk C. (1996). In vivo occupancy of D2 dopamine receptors by 7-OH-DPAT. *Synapse*. 24: 60-64.

Li Y, Holtzman D, Kromer L, Kaplan D, Chua-Couzens J, Clary D, Knusel B, Mobley W. (1995). Regulation of TrkA and ChAT expression in developing rat basal forebrain: evidence that both exogenous and endogenous NGF regulate differentiation of cholinergic neurons. *The Journal of Neuroscience*. 15: 2888-2905.

Lin B, Levy S, Raval A, Perez-Pinzon M, Defazio R. (2010). Forebrain ischemia triggers GABAergic system degeneration in substantia nigra at chronic stages in rats. *Cardiovascular psychiatry and neurology*. 1-16.

Lindholm D, Dechant G, Heisenberg C, Thoenen H. (1993). Brain-derived neurotrophic factor is a survival factor for cultured rat cerebellar granule neurons and protects them against glutamate-induced neurotoxicity. *European Journal of Neuroscience*. 5: 1455-1464.

Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehnström S, Gustavii B, Frackowiak R, Marsden C. (1990). Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science*. 247(4942): 574-577.

Livingstone C, Strange P, Naylor L. (1992). Molecular modeling of D2-like dopamine receptors. *Biochemical Journal*. 287: 277-282.

Lladó A, Gaig C, Molinuevo J. (2006). Genética de las enfermedades neurodegenerativas más prevalentes. *Medicina Clinica*. 126:662-670.

Lotharius J, Dugan L, O'Malley K. (1999). Distinct mechanism underlines neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *The Journal of Neuroscience*. 19(4):1284-1293.

Luikart B, Nef S, Virmani T, Lush M, Liu Y, Kavalali E, Parada L. (2005). TrkB has a cell-autonomous role in the establishment of hippocampal Schaffer collateral synapses. *The Journal of neuroscience*. 25(15): 3774-3786.

M

Macías M. (2006). Ansiedad, Ira y Tristeza-Depresión en la enfermedad de Parkinson. Tesis de doctorado. Universidad Complutense de Madrid.

MacLeod N, James T, Kilpatrick I, Starr M. (1980). Evidence for a GABAergic nigrothalamic pathway in the rat-II. *Electrophysiological studies*. *Experimental Brain Research*. 40:55-61

Madrazo I, Franco-Bourland R, Ostrosky-Solis F. (1990). Neural transplantation (autoadrenal, fetal nigral and fetal adrenal) in Parkinson's disease: The Mexican experience. *Prog. Brain Research*. 82:593-602.

Margolis E, Lock H, Hjelmstad G, Fields H. (2006). The ventral tegmental area revisited: is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons? *The journal of Physiology*. 577(3): 907-924.

Marolt B. (2007). Tartamudez y Ganglios Basales. Departamento de neurociencias-FLEN. *Archivo neurología neurociencias neuropsiquiatría*. 13 (1): 39-56.

McDonald N, Chao M. (1995). Structural Determinant of neurotrophin action. *Journal of Biology Chemistry*. 270 (34):19669-72.

Martinez-Fong D, Bannon M, Trudeau L, Gonzalez-Barrios J, Arango-Rodriguez M, Hernandez-Chan N, Reyes-Corona D, Armendariz-Borunda J, Navarro-Quiroga I. (2012). NTS-Polyplex: a potential nanocarrier for neurotrophic therapy of Parkinson's disease. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 8:1052-1069.

Martin-Iverson M, Todd K, Altar C. (1994). Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 activate striatal dopamine and serotonin metabolism and related behaviors: interactions with amphetamine. *The Journal of neuroscience*. 14(3):1262-1270.

Marrs G, Green S, Dailey M. (2001). Rapid formation and remodeling of postsynaptic densities in developing dendrites. *Nature Neuroscience*. 4:1006-1013.

Mata I, Kachergus J, Taylor J, Lincoln S, Aasly J, Lynch T, Farrer M. (2005). Lrrk2 pathogenic substitutions in Parkinson's disease. *Neurogenetics*. 6(4): 171-177.

McNeill T, Brown S, Rafols J, Shulson I. (1988). Atrophy of medium spiny striatal dendrites in advanced Parkinson's disease. *Brain Research*. 445:148-152.

Méndez-Alvarez E, Soto-Otero R. (2004). Dopamine: a double-edged sword for the human brain. *Recent Research Developments in Life Science*. 2:217-246.

Meinl E, Krumbholz M, Hohlfeld R. (2006). B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Annals of neurology*. 59(6):880-892.

Meissner W, Hill M, Tison F, Gross C, Bezard E. (2004). Neuroprotective strategies for Parkinson's disease: conceptual limits of animal models and clinical trials. *Trends in Pharmacological Sciences*. 25(5):249-253.

Merlo S, Canonico P, Sortino M. (2011). Distinct effects of pramipexole on the proliferation of adult mouse sub-ventricular zone-derived cells and the appearance of a neuronal phenotype. *Neuropharmacology*. 60(6): 892-900.

Meshul C, Emre N, Nakamura C, Allen C, Donohue M, Buckman J. (1999). Time-dependent changes in striatal glutamate synapses following a 6-hydroxydopamine lesion. *Neuroscience*. 88:1-16.

Mestikawy S, Hamon M. (1986). Is dopamine-induced inhibition of adenylate cyclase involved in the autoreceptor-mediated negative control of tyrosine hydroxylase in striatal dopaminergic terminals?. *Journal of Neurochemistry*. 47:1425-33.

Miller M, Peters A. (1981). Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons. *Journal Comparative Neurology*. 203: 555-557.

Mobley W, Rutkowski J, Tennekoon G, Gemski J, Buchanan K, Johnston M. (1986). Nerve growth factor increases choline acetyltransferase activity in developing basal forebrain neurons. *Brain Research*. 387: 53-62.

Morgado H, Alonso M, López M. (2007). Factores genéticos involucrados en la susceptibilidad para desarrollar enfermedad de Parkinson. *Salud Mental*. 30(1): 16.

Mowla S, Pareek S, Farhadi H, Petrecca K, Fawcett J, Seidah N, Morris S, Sossin W, Murphy R. (1999). Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience*. 19(6): 2069-80.

Mundel P, Heid H, Mundel T, Kruger M, Reiser J, Kriz W. (1997). Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *The Journal of Cell Biology*. 139: 193-204.

Murray A, Ryoo H, Gurevich E, Joyce J. (1994). Localization of dopamine D3 receptors to mesolimbic and D2 receptors to mesostriatal regions of human forebrain. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91: 11271-11275.

Murphy V, Wadhvani K, Smith Q, Rapoport S. (1991). Saturable transport of manganese (II) across the rat blood-brain barrier. *Journal of Neurochemistry*. 57(3): 948-954.

N

Naggapan G, Bai L. (2005). Activity-dependent modulation of the BDNF receptor TrkB: mechanisms and implications. *The Journal of Cell Biology*. 141:187-97.

Narita K, Kawasaki F, Kita H. (1990). Mn and Mg influxes through Ca channels of motor nerve terminal are prevented by verapamil frogs. *Brain Research*. 510: 289-295.

Nawa H, Bessho Y, Carnahan J, Nakanishi S, Mizuno K. (1993). Regulation of Neuropeptide Expression in Cultured Cerebral Cortical Neurons by Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Journal of neurochemistry*. 60(2): 772-775.

Niso-Santano M, González-Polo R, Bravo-San P, Gómez-Sánchez R, Lastres-Becker I, Ortiz-Ortiz M, Soler G, Morán J, Cuadrado A, Fuentes J. (2010). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 is a key factor in paraquat-induced cell death: Modulation by the Nrf2/Trx axis. *Free Radical Biology y Medicine*. 48:1370-1381.

Nitsch C, Riesenberger R. (1988). Immunocytochemical demonstration of GABAergic synaptic connections in rat substantia nigra after different lesions of the striatonigral projection. *Brain research*. 461(1): 127-142.

O

Obeso J, Rodríguez M, Gorospe A, Guridi J, Alvarez L, Macias R. (1997). Surgical treatment of Parkinson's disease. *Baillieres Clinical Neurology*. 6: 125-145.

Obeso J, Guridi J, Alvarez L, Macias R, Linasoro G. (1998). Ablative surgery for Parkinson's disease. In Jankovic J, Tolosa E, (eds). *Parkinson's disease and movement disorders*. 3ed. Media: Williams & Wilkins. 1049-1064.

Olanow C, Tatton W. (1999). Etiology and Pathogenesis of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 22:123-144

Ordoñez-Librado J, Gutierrez-Valdez A, Colín-Barenque L, Anaya-Martínez V, Díaz-Bech P, Avila-Costa M. (2008). Inhalation of divalent and trivalent manganese mixture induces a Parkinson's disease model: Immunocytochemical and behavioral evidences. *Neuroscience*. 155(1): 7-16.

Ordoñez-Librado J, Anaya-Martínez V, Gutierrez-Valdeza A, Montiel-Flores E, Reyes Corona D, Martinez-Fong D, Ávila-Costa M. (2010). L-DOPA treatment reverses the motor alterations induced by manganese exposure as a Parkinson disease experimental model. *Neuroscience Letters*. 471(2): 79-82.

Ordoñez-Librado J, Anaya-Martínez V, Gutiérrez-Valdez A, Colín-Barenque L, Montiel-Flores E, Avila-Costa, M. (2011). Manganese inhalation as a Parkinson disease model. *Parkinson's disease*. 2011:1-14.

Otero-Siliceo E. (1996). *Parkinson enfoque al futuro*. Instituto Nacional de Neurocirugía. Fondo de Cultura Económico. México. Cap: I,II,III,XIII,XIV

Ouagazzal A, Creese I. (2000). Intra-accumbens infusion of D3 receptor agonists reduces spontaneous and dopamine-induced locomotion. *Pharmacology Biochemical and Behavior*. 67:637- 645.

P

Pal P, Samii A, Calne D. (1999). Manganese neurotoxicity: A review of clinical features, imaging and pathology. *Neurotoxicology*. 20: 227-238.

Pankratz N, Foroud T. (2007). Genetics of Parkinson disease. *Genetics in Medicine*. 801-11.

Parsons B, Stanley M, Javitch J. (1993). Differential visualization of dopamine D2 and D3 receptors in rat brain. *European Journal of Pharmacology*. 234: 269-272.

Paxinos G, Watson C. (1986). *The rat brain in Sterotaxic Coordinates*. 2nd edn. Academic Press, New York.

Penzes P, Beeser A, Chernoff J, Schiller M, Eipper B, Mains R, Huganir R. (2003). Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron*. 37(2): 263-274.

Pérez M, Arancibia S. (2007). Estrés oxidativo y neurodegeneración: ¿causa o consecuencia?. *Archivos de Neurociencias*. 12(1):45-54.

Picazo O, Chuc-Meza E, Anaya-Martínez V, Jiménez I, Aceves J, García- Ramírez M. (2009). 6-Hydroxydopamine lesion in thalamic reticular nucleus reduces anxiety behaviour in the rat. *Behavioural brain research*. 197(2): 317-22.

Prensa L, Parent A. (2001). The nigrostriatal pathway in the rat: a single-axon study of the relationship between dorsal and ventral tier nigral neurons and the striosome/matrix striatal compartments. *The Journal of Neuroscience*. 21:7247-7260.

Porritt M, Batchelor P, Howells D. (2005). Inhibiting BDNF expression by antisense oligonucleotide infusion causes loss of nigral dopaminergic neurons. *Experimental neurology*. 192(1): 226-234.

Pothakos K, Kurz M, Lau Y. (2009). Restorative effect of endurance exercise on behavioral deficits in the chronic mouse model of Parkinson's disease with severe neurodegeneration. *BMC Neuroscience*. 10:16.

Potashkin J, Blume S, Runkle N. (2011). Limitations of Animal Models of Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease*. 2011: 1-7.

Przedborski S, Vila M. (2003). The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 991:189-198.

Prut L, Beltzung C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*. 463: 3-33.

Purves-Stewart J. (1898). Paralysis agitans with an account of new symptom. *The Lancet*. 11:1258-1260

R

Rabin O, Hegedus L, Bourre J, Smith Q. (1993). Rapid brain uptake of manganese (II) across the blood-brain barrier. *Journal of Neurochemistry*. 61(2): 509-517.

Rao A, Kim E, Sheng M, Craig A. (1998). Heterogeneity in the molecular composition of excitatory postsynaptic sites during development of hippocampal neurons in culture. *The Journal of Neuroscience*. 18: 1217-1229.

Ramón y Cajal S. (1928). Degeneration and regeneration of the nervous system. In Ramón y Cajal S. ed. New York: Haffner Publishing.

Rauskolb S, Zagrebelsky M, Dreznjak A, Deogracias R, Matsumoto T, Wiese S, Erne B, Sendtner M, Schaeren-Wiemers N, Korte M, Barde Y. (2010). Global deprivation of brain-derived neurotrophic factor in the CNS reveals an areaspecific requirement for dendritic growth. *The Journal of Neuroscience*. 30: 1739-1749.

Reyna VP. (2012). "Evaluación del efecto del tratamiento con el agonista D3 (7-OH-DPAT) asociado a la transfección del factor neurotrófico BDNF sobre las alteraciones motoras en un modelo de rata hemiparkinsoniana por 6-OHDA en el haz medial". Tesis Maestría. Dpto. Fisiología, Biofísica y Neurociencias CINVESTAV, UNIDAD ZACATENCO.

Ricci A, Vega J, Mammola C, Amenta F. (1995). Localization of dopamine D3 receptor in rat cerebellar cortex: a light microscopic autoradiographic study. *Neurosci Letters*. 190: 163-166.

Richard I, Schiffer R, Kurlan R. (1996). Anxiety and Parkinson's disease. *Journal Neuropsychiatry Clinical Neuroscience*. 8:383-92.

Ropper A, Samuels M. (2007). *Adams and Victor's Principles of Neurology*. Estados Unidos. McGraw-Hill's. Cap.39.

Roth J, Horbinski C, Feng L, Dolan K, Higgins D, Garrick M. (2000). Differential localization of divalent metal transporter I with and without iron response element in rat PC12 and sympathetic neuronal cells. *The Journal of Neuroscience*. 20(20): 7595-7601.

Rozas G, Labandeira-García J. (1997). Drug-free evaluation of rat models of parkinsonism and nigral grafts using a new automated rotarod test. *Brain research*. 749(2): 188-99.

Rozas G, López-Martin E, Guerra M, Labandeira-Garcia J. (1998). The overall rod performance test in the MPTP-treated-mouse model of Parkinsonism. *Journal of neuroscience methods*. 83(2):165-175.

S

Sanchez-Betancourt J, Anaya-Martínez V, Gutiérrez-Valdez A, Ordoñez-Librado J, Montiel-Flores E, Espinosa-Villanueva J, Ávila-Costa M. (2012). Manganese mixture inhalation is a reliable Parkinson disease model in rats. *Neurotoxicology*. 33(5):1346-1355.

Sava V, Mosquera D, Song S, Cardozo-Pelaez F, Sánchez-Ramos J. (2004). Effects of melanin and manganese on DNA damage and repair in PC12-derived neurons. *Free Radical Biology y Medicine*. 36(9): 1144-1154.

Savitt J, Dawson V, Dawson T. (2006). Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *The Journal of Clinical Investigation*. 116(7):1744-54.

Seeman P, Grigoriadis D. (1987). Dopamine receptors in brain and periphery. *Neurochemistry. Int*. 10: 1-25.

Sekerkova G, Loomis, P, Changyaleket B, Zheng L, Eytan R, Chen B, Mugnaini E, Bartles J. (2003). Novel espin actin-bundling proteins are localized to Purkinje cell

dendritic spines and bind the Src homology 3 adapter protein insulin receptor substrate p53. *The Journal of Neuroscience*. 23:1310-1319.

Sekino Y, Kojima N, Shirao T. (2007). Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochemistry International*. 51:92-104.

Segal R, Takahashi H, McKay R. (1992). Changes in neurotrophin responsiveness during the development of cerebellar granule neurons. *Neuron*. 9:1041- 1052.

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

Schildknecht S, Pörtl D, Nagel D, Matt F, Scholz D, Lotharius J, Schmiege N, Salvo-Vargas A, Leist M.(2009). Requirement of a dopaminergic neuronal phenotype for toxicity of low concentrations of 1-methyl-4-phenylpyridinium to human cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 241:23-35.

Schinder A, Poo M. (2000). The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosciences*. 23(12): 639-45.

Schuler F, Casida, J. (2001). The insecticide target in the PSST subunit of complex I. *Pest Management Science*. 57: 932-940.

Shen R, Altar C, Chiodo, L. (1994). Brain-derived neurotrophic factor increases the electrical activity of pars compacta dopamine neurons in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91(19): 8920-8924.

Sherer T, Betarbet, R, Stout, A, Lund S, Baptista M, Panov A, Cookson M, Greenamyre J. (2002). An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. *The Journal of Neuroscience*. 22: 7006-7015.

Sherer T, Kim J, Betarbet R, Greenamyre J. (2003). Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Experimental Neurology*. 179: 9-16.

Sherer T, Betarbet R, Stout A, Lund S, Baptista M, Panov A, Cookson M, Greenamyre J. (2002). An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. *The Journal of Neuroscience*. 22: 7006-7015.

Shishova E. Y, Di Costanzo L, Emig F, Ash D, Christianson D. (2009). Probing the specificity determinants of amino acid recognition by arginase. *Biochemistry*. 48: 121-131.

Slawek J. (2003). Stereotactic surgery in Parkinson disease: patient selection criteria in the light of existing research. *Neurologia Neurochirurgia Polska*. 37: 215-227.

Smith Y, Beyan M, Shink E, Bolam J. (1998). Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience Oxford*. 86: 353-388.

Steg G, Johnels B. (1994). Physiological mechanisms and movement analysis in Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology*. 9:143-147.

Stephens B, Mueller A, Shering A, Hood S, Taggart P, Arbuthnott G, Bell J, Kilford L, Kingsbury A, Daniel S, Ingham C. (2005). Evidence of a breakdown of corticostriatal connections in Parkinson's disease. *Neuroscience*. 132:741-754.

Sokoloff P, Giros B, Martes M, Bouthenet M, Schwartz J. (1990). Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature*. 347:146-151.

Sokoloff P, Guillin O, Diaz J, Carroll P, Griffon N. (2002). Brain-derived neurotrophic factor controls dopamine D3 receptor expression: implications for neurodevelopmental psychiatric disorders. *Neurotoxicity research*. 4(7-8): 671-678.

Sorra K, Harris K. (2000). Overview on the structure, composition, function, development and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus*. 10(5): 501-511.

Sotelo C. (1990). Cerebellar synaptogenesis: what we can learn from mutant mice. *Journal of Experimental Biology*. 153(1):225-249.

Sotogaku N, Oku N, Takeda A. (2000). Manganese concentration in mouse brain after intravenous injection. *Journal Neuroscience Research*. 61: 350-356.

Soto-Otero R, Sanmartín-Suárez C, Sánchez-Iglesias S, Hermida-Ameijeiras A, Sánchez-Sellero I, Méndez-Álvarez E. (2006). Study on the ability of 1, 2, 3, 4-tetrahydropapaveroline to cause oxidative stress: Mechanisms and potential implications in relation to parkinson's disease. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 20(5): 209-220.

Spina M, Squinto S, Miller J, Lindsay R, Hyman C. (1992). Brain-derived neurotrophic factor protects dopamine neurons against 6-hydroxydopamine and

N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity: involvement of the glutathione system. *Journal of neurochemistry*. 59(1): 99-106.

Surmeier D, Kitai S. (1997). State-dependent regulation of neuronal excitability by dopamine. *Nihon shinkei seishin yakurigaku zasshi*. Japanese journal of psychopharmacology. 17(2):105.

T

Tabakman R, Lecht S, Sephanova S, Arien-Zakay H, Lazarovici P. (2004). Interactions between the cells of the immune and nervous system: neurotrophins as neuroprotection mediators in CNS injury. *Progress in brain research*. 146: 385-401.

Tadaiesky M, Dombrowski P, Figueiredo C, Cargnin-Ferreira E, Da C, Takahashi R. (2008). Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 156: 830-840.

Takeda A. (2003). Manganese action in brain function. *Brain Research*. *Brain Research Reviews*. 41: 79-87.

Takeuchi J, Yamagami T, Saiki H. (2000). Details and indications of pallidotomy and thalamotomy for Parkinson's disease. *Nippon Rinsho*. 58: 2072-2077.

Tanaka J, Horiike Y, Matsuzaki M, Miyazaki T, Ellis-Davies G, Kasai H. (2008) Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science*. 319:1683-1687.

Terzioglu M, Galter D. (2008). Parkinson's disease: genetic versus toxin-induced rodent models, *FEBS Journal*. 275(7):1384-1391.

Thoenen H. (1995). Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*. 270: 593-598.

Tirmenstein M, Hu C, Scicchitano M, Narayana P, McFarland D, Thomas H, Schawrtz L. (2005). Effects of 6-hydroxydopamine on mitochondrial function and glutathione status SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Toxicology In Vitro*. 19(4):471-9

Tsukahara T, Takeda M, Shimohama S, Ohara O, Hashimoto N. (1995). Effects of brain-derived neurotrophic factor on 1-methyl-4-phenyl -1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in monkeys. *Neurosurgery*. 37: 733-741.

Tyler W, Pozzo-Miller L. (2003). Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones. *The Journal Physiology*. 553: 497-509.

U

Ungerstedt U. (1968). 6-Hydroxydopamine induced degeneration of central monoaminergic neurons. *European Journal of Pharmacology*. 5:107-110

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

Ungerstedt U. (1971). Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed birotational behavior. *Acta Physiology*. 367:95-121

Ulusoy A, Bjorklund T, Hermening S, Kirik D. (2008). In vivo gene delivery for development of mammalian models for Parkinson's disease. *Experimental neurology*. 209(1):89-100.

V

Valldeoriola-Sierra F. (2007). Cirugía de los trastornos del movimiento. *ARS Médica*. México, D.F. p.5-7.

Van Kampen J, Hagg T, Robertson H. (2004). Induction of neurogenesis in the adult rat subventricular zone and neostriatum following dopamine D3 receptor stimulation. *European Journal of Neuroscience*. 19:2377-2387.

Van Kampen J, Robertson H. (2005). A possible role for dopamine D3 receptor stimulation in the induction of neurogenesis in the adult rat substantia nigra. *Neuroscience*. 136:381-386.

Van Kampen J, Eckman C. (2006). Dopamine D3 receptor agonist delivery to a model of Parkinson's disease restores the nigrostriatal pathway and improves locomotor behavior. *The Journal of neuroscience*. 26(27):7272-7280.

Vaughn J. (1989). Review: fine structure of synaptogenesis in the vertebrate central nervous system. *Synapse*. 3(3): 255-285.

Venero J, Beck K, Hefti F. (1994). 6-Hydroxydopamine lesions reduce BDNF mRNA levels in adult rat brain substantia nigra. *NeuroReport*. 5(4): 429-432.

Vigers A, Amin D, Talley-Farnham T, Gorski J, Xu B, Jones K. (2012). Sustained expression of brain-derived neurotrophic factor is required for maintenance of dendritic spines and normal behavior. *Neuroscience*. 212: 1-18.

Vingerhoets F, Schulzer M, Calne D, Snow B. (1997). Which clinical sign of Parkinson's disease best reflects the nigrostriatal lesion?. *Annals of neurology*. 41(1):58-64.

Von Bohlen und Halbach O, Minichiello, L, Unsicker, K. (2008). TrkB but not trkC receptors are necessary for postnatal maintenance of hippocampal spines. *Neurobiology*. 29:1247-1255.

W

Waterhouse E, Xu B. (2009). New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 42: 81-89.

Wichmann T, DeLong M. (1992). Pathophysiology of parkinsonian motor abnormalities. *Advances in neurology*. 60: 53-61.

Wyszynski M, Kharazia V, Shanghvi R, Rao A, Beggs A, Craig A, Weinberg R, Sheng M. (1998). Differential regional expression and ultrastructural localization of alpha-actinin-2, a putative NMDA receptor-anchoring protein, in rat brain. *The Journal of Neuroscience*. 18: 1383-1392.

X

Xiomerisiou G, Dardiotis E, Tsimourtou V, Kountra P, Paterakis K, Kapsalaki E, Hadjigeorgiou G. (2010). Genetic basis of Parkinson disease. *Neurosurgical focus*. 28(1): 17.

Y

Yurek D, Sladek J. (1990). Dopamine cell replacement: Parkinson's disease. *Annual Review of Neuroscience*. 13:415- 440.

Yurek D, Lu W, Hipkens S, Wiegand S. (1996). BDNF enhances the functional reinnervation of the striatum by grafted fetal dopamine neurons. *Experimental neurology*. 137(1), 105-18.

Yoshihara Y, De Roo M, Muller D. (2009). Dendritic spine formation and stabilization. *Current Opinion in Neurobiology*. 19:14653.

Z

Zabetian C, Hutter C, Yearout D, Lopez A, Factor S, Griffith A, Payami H. (2006). LRRK2 G2019S in families with Parkinson disease who originated from Europe and the middle east: evidence of two distinct founding events beginning two millennia ago. *The American Journal of Human Genetics*. 79(4), 752-758.

Zaja-Milatovic S, Milatovic D, Schantz A, Zhang J, Montine K, Samii A, Deutch, A, Montine T. (2005) Dendritic degeneration in neostriatal medium spiny neurons in Parkinson disease. *Neurology*. 64:545-547.

Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy R, Johansson C, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J, Janson A. (2003). Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100(13): 7925-30.

Zheng W, Aschner M, Ghersi-Egeac J. (2003). Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 192: 1-11.

Zheng J, Shen W, Lu T, Zhou Y, Chen Q, Wang Z, Xiong Z. (2008). Clathrin-dependent endocytosis is required for TrkB-dependent Akt-mediated neuronal protection and dendritic growth. *Journal of Biological Chemistry*. 283(19): 13280-13288.

Zhou Q, Palmiter R. (1995). Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. *Cell*. 83(7), 1197-1209.

Ziff E. (2007). TARPs and the AMPA receptor trafficking paradox. *Neuron*. 53:627-33.

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

Zwingmann C, Leibfritz D, Hazell A. (2004). Brain energy metabolism in a sub-acute rat model of manganese neurotoxicity: An ex vivo nuclear magnetic resonance study using [1-¹³C] glucose. *Neurotoxicology*. 25:573-587.

ANEXO.

Como se mencionó los animales con el modelo de Parkinson inducido por la inhalación de manganeso fueron especialmente susceptibles a las infecciones, por ello se perdió un primer grupo completo de animales con el modelo a los que se colocaron bombas con solución salina (tratamiento Sham), así que se procedió a exponer a Mn a otro grupo de animales, a los cuales se les aplicó el mismo protocolo de evaluaciones conductuales que los animales tratados (BDNF/agonista D3). Pero el análisis de este tejido tardó por lo largo del proceso; por tal motivo y como se señala en el escrito se utilizó como tejido control el de animales con el modelo experimental de Parkinson inducido por inhalación de Mn sacrificados al terminar los 6 meses de exposición a la mezcla de MN.

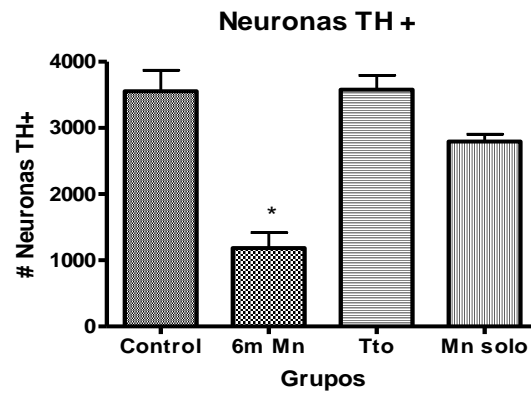
Al realizar el conteo de neuronas positivas a TH, se observaron ciertas discrepancias acerca del modelo de Mn y la recuperación de las neuronas con el tratamiento.

El grupo que solo fue expuesto a Mn durante 6 meses y se sacrificó a los 5 meses posteriores a la inhalación (durante este periodo no se administró tratamiento), al realizar el conteo de neuronas DA se observó aumento no significativo, pero sí del doble del número de neuronas en comparación con el grupo que estuvo expuesto a los 6 m Mn sacrificado una vez finalizadas las inhalaciones, esto supone una posible recuperación espontánea. Este resultado cuestiona el resultado de los datos con el tratamiento, ya que hace pensar que la recuperación que se obtuvo por el tratamiento (100%) posiblemente se deba a la recuperación espontánea de los animales.

Sin embargo es importante mencionar que esta recuperación es cuestionable ¿La recuperación continúa hasta recuperar completamente el sistema? ¿En qué momento comienza la recuperación?, ¿Las neuronas que sobreviven son viables? Por lo que inferimos que probablemente la recuperación que se está dando sea un 33.3% recuperación espontánea y 33.3% recuperación por el tratamiento, haciendo notar que el 33.3% es un dato suficiente para afirmar que el tratamiento es óptimo

para la Enfermedad de Parkinson capaz de actuar como neuroprotector, restablecer la vía nigro-estriatal y por tanto estabilizar la actividad motora. (Gráfica 13)

Se deja a posteriores estudios responder estas interrogantes sobre la recuperación espontánea.



Gráfica.13. Conteo neuronas TH. * Control vs 6 m Mn. $p < 0.05$.