



**Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala**

**“Efecto de la administración de
simvastatina en contra del daño inducido
por MPP+, como modelo experimental de
la enfermedad de Parkinson”**

T E S I S

**Para obtener el título de:
Licenciado en Biología**

P R E S E N T A

Gilberto Hevyn Chávez Cortés

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



Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2018



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.

Dedicatoria

Agradecimientos.

Índice	Pag.
1. Abreviaturas.....	1
2. Resumen.....	2
3. Introducción.....	3
4. Antecedentes.....	5
5. Generalidades de la Enfermedad de Parkinson.....	6
6. Organización funcional de los ganglios basales.....	7
7. Síntesis de la DA.....	9
8. Catabolismo de la DA.....	10
9. Cambios de la organización funcional de los ganglios basales en la Enfermedad de Parkinson.....	11
10. Procesos bioquímicos implicados en la EP.....	12
11. Neuroinflamación en la EP: actividad de la microglía.....	14
12. Tratamientos de la EP.....	16
13.1 Modelos experimentales de la EP.....	18
13.2 Mecanismo de daño de 1-metil 4-fenilpiridinium.....	19
14. Estatina: química y propiedades funcionales.....	21
15. Metabolismo de la Simvastatina.....	22
16. Actividad neuroprotectora de la Simvastatina.....	24
17. Hipótesis.....	25
18. Objetivo General.....	25
19. Objetivos Particulares.....	25
20. Método.....	26
21. Resultados.....	29
21.1 <i>Efecto de la administración oral sub-crónica de simvastatina frente al daño generado por MPP+ sobre la conducta de giro</i>	29
21.2 <i>Efecto de la administración oral sub-crónica de simvastatina frente al daño generado por MPP+ sobre el contenido de DA en el cuerpo estriado de la rata</i>	30
21.3 <i>Efecto de la administración oral sub-crónica de simvastatina frente al daño generado por MPP+ en contra de la formación de productos lipídicos fluorescentes en cuerpo estriado de la rata</i>	31
21.4 <i>Efecto neuroprotector de simvastatina sobre el daño inducido por MPP+ mediante la señal inmunofluorescente para TH y GFAP en cuerpo estriado de la rata</i>	32
22. Discusión.....	34
23. Conclusiones.....	37
24. Referencias.....	38

1. Abreviaturas.

6-OHDA	6 hidroxidopamina
ATP	Adenosin Trifosfato
ATV	Área Tegmental Ventral
BHE	Barrera hematoencefálica
CE	Cuerpo Estriado
COMT	Catecol-O-Metil Trasferasa
DA	Dopamina
DAT	Transportador de Dopamina
DOPAC	Acido 3,4- Dihroxifenilacético
EP	Enfermedad de Parkinson
ERO	Especies Reactivas de Oxigeno
FPP	Farnesil Pirofosfato
GFAP	Proteína Glial Fibrilar acídica
GGPP	Geranil Pirofosfato
GPe	Globus Palidus external
GPi	Globus Palidus Internal
HMG- Co A	Hidroximetilglutaril Coenzima A reductasa
HVA	Ácido Homovanílico
IL	Interleucinas
INF γ	Interferón Gama
L-DOPA	Levodopa
MAO	Monoamino Oxidasa
MPP+	1-metil 4-fenil pirimidium
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NA	Núcleo Acumbens
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotido
NCP	Núcleo Caudado Putamen
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NOSi	Óxido nítrico Sintasa inducible
NST	Núcleo Subtálamico
PON	Paraoxonasa
PQ	Paraquat
ROT	Rotenona
SNpc	Sustancia Nigra pars compacta
SNpr	Sustancia Nigra pars reticulata
TGF α	Factor de Crecimiento Transformante
TH	Tirosina Hidroxilasa
TNF- α	Factor de necrosis tumoral Alfa
VMAT	Transportadores vesiculares de monoaminas

2. Resumen.

La enfermedad de Parkinson (EP) se define como un desorden neurodegenerativo crónico y progresivo, caracterizado por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta (SNpc) y disminución de Dopamina (DA) en el núcleo caudado y putamen generado por un estrés oxidante, a partir de un aumento en las concentraciones de radicales libres a causa de una disfunción en la actividad mitocondrial, entre otros.

La sintomatología de la EP se encuentra caracterizada principalmente por la presencia de temblor en reposo, rigidez y por la dificultad de ejecutar movimientos. Se ha evidenciado que la inyección unilateral intraestriatal de 1-metil 4-fenilpiridinio (MPP+) en el cuerpo estriado de animales de laboratorio provoca algunas de las principales características bioquímicas, fisiopatológicas e histopatológicas de la EP. Por otra parte las estatinas son fármacos hipolipemiantes, que al actuar como inhibidores de la enzima hidroximetilglutaril CoA reductasa (HMG-CoA) responsable de la biosíntesis del ácido mevalónico, provoca la disminución en las concentración de una serie de moléculas isoprenoides relacionadas con la modulación de algunos mecanismos que participan en la generación de estrés oxidante. De tal forma que la inhibición de la enzima promueve la activación de mecanismos antioxidantes.

En el presente trabajo se exponen los resultados de la evaluación del efecto de la administración oral sub-crónica de 40 mg/kg/día de simvastatina durante 7 días frente a las alteraciones conductuales, bioquímicas e histológicas generadas por la administración intraestriatal de MPP+ (10 µg/8 µL).

Los resultados del estudio demuestran que el pretratamiento con la administración oral sub-crónica de 40 mg/Kg/día de simvastatina durante 7 días previos a la lesión con MPP+ es capaz de disminuir significativamente ($P < 0.05$) el número de giros en la conducta inducida por la administración subcutánea de apomorfina, esto se correlaciona con la evaluación de las concentraciones de DA obtenidas por HPLC de DA en la cual existe una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre el grupo tratado con simvastatina previo al daño por MPP+ y el grupo tratado únicamente con la neurotóxica además se demostró que bajo el mismo modelo de administración del fármaco, las concentraciones de productos lipídicos fluorescentes del ensayo de peroxidación lipídica disminuyen significativamente ($P < 0.05$) con respecto a el daño generado por MPP+. El efecto neuroprotector de la simvastatina frente al daño generado por MPP+, se pudo observar por medio de inmunofluorescencia, reflejando una permanencia mayor del porcentaje de la señal a tirosina hidroxilasa (TH), con respecto al grupo tratado únicamente con MPP+ mismo que alcanzo diferencias estadísticamente significativas

($P < 0.05$) entre grupos. Por el contrario, el ensayo de inmunofluorescencia de la proteína fibrilar glial ácida (GFAP), nos indica un aumento en la expresión de la proteína en el grupo tratado con MPP+, por el contrario, el porcentaje de expresión de GFAP se ve reducido significativamente ($P < 0.05$) en el grupo tratado previamente con simvastatina.

Los resultados del trabajo nos indican una efectividad de la administración oral subcrónica de 40 mg/Kg/día de simvastatina durante 7 días frente al daño generado por la administración intraestriatal de MPP+ (10 μ g/8 μ L). Sin embargo es necesario futuros estudios para evidenciar el mecanismo de protección de la simvastatina en el presente modelo experimental de la EP.

3. Introducción.

La pérdida crónica y progresiva de neuronas dopaminérgicas en la vía nigro-estriado es una característica de la Enfermedad de Parkinson (EP), esta disminución en la densidad de las células dopaminérgicas genera cambios en la organización funcional de los ganglios basales y produciendo una sintomatología propia de la enfermedad caracterizada por la pérdida de la ejecución de movimientos voluntarios, presencia de temblor en reposo, rigidez y entrecimiento de los movimientos o la incapacidad para iniciarlos (Ayton & Lei, 2014; Blandini et al. 2000; Chávez -León et al. 2013).

La EP es considerada la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente sólo después de la enfermedad de Alzheimer, en general, en la mayoría de los casos en personas mayores de 60 años. En la actualidad México no cuenta con un estudio epidemiológico sobre la incidencia de EP, la evidencia actual sugiere una heterogeneidad clínica (diferencias entre cuadro clínico) en las poblaciones de EP de distintos países por lo que es posible, que los pacientes mexicanos se comporten de una forma similar, dificultando un censo adecuado de la población con EP. De acuerdo a estimaciones publicadas en un estudio realizado por el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de la ciudad de México, alrededor de 160,000 personas presentan esta enfermedad en el país. Se cree que a nivel mundial alrededor del 1% de la población mayor de 60 años presenta algún síndrome parkinsonico (Rodríguez-Violante et al., 2011).

En la fisiopatología de EP, el estado de estrés oxidante juega un papel crucial, evidenciado por un incremento de marcadores de daño oxidante, los cuales involucran oxidación de proteínas, lípidos, DNA e incluso de RNA, generado a partir de un déficit en el funcionamiento en las defensas antioxidantes, así como la disminución en la eficacia de los mecanismos de reparación del DNA y la pérdida de regulación del sistema inmune son factores que contribuyen al aumento de estrés oxidante y llevan al daño cerebral

progresivo (Angoa & Rivas, 2007). El desarrollo de la forma idiopática de la EP se ha asociado con la exposición a factores ambientales, aunque también se encuentra el desarrollo de la enfermedad por factores hereditarios. En los pacientes que carecen de una clara carga genética, los mecanismos patogénicos son difíciles de entender, debido a la variedad de factores que participan entre los que están las toxinas ambientales, el estrés oxidante, la disfunción mitocondrial entre otros (Gómez- Chavarrin et al., 2012).

Otra característica invariable de la EP es el incremento de la inflamación, se encuentra evidenciado por un aumento de la actividad glial, en la sustancia nigra de pacientes parkinsonicos y el incremento en las concentraciones de citosinas, tales como factores de necrosis tumoral (TNF- α), interleucinas (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-6), factor de crecimiento transformante (TGF)- α , TGF- β 1 y TGF- β 2) en el estriado y fluido cerebroespinal. Este incremento en la concentración de citosinas se encuentra ligado al incremento en la densidad de las células gliales, generando una sobre expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (NOSi), promoviendo la generación de un estrés oxidante en la sustancia nigra en pacientes con EP (Selley, 2005).

En los últimos años el tratamiento de la EP se basa en el uso de fármacos que recomponen las concentraciones de DA por medio del uso de su precursor metabólico, denominado como L-dopa. Sin embargo, las complicaciones motoras de la administración crónica de L-dopa han emergido como una limitación mayor en el tratamiento, es por ello que el uso en conjunto de terapias neuroprotectoras que retrasen la progresión de la enfermedad pueden retardar también la necesidad de L-dopa (Angoa & Rivas, 2007; Rodriguez-Violante, 2011).

Por otro lado el uso las estatinas, es recomendado para la reducción en la incidencia de enfermedades cardiacas, por sus características hipolipemiantes, al actuar como inhibidores de la enzima hidroximetilglutaril CoA (HMG-CoA) que es responsable de la biosíntesis del ácido mevalónico, molécula clave en la síntesis del colesterol (Dolga et al., 2011) además de disminuir la concentración de una serie de moléculas isoprenoides relacionadas con la activación de algunos mecanismos que participan en la generación de estrés oxidante (van der Most et al., 2009)

A partir de la evidencia clínicas y el efecto neuroprotector evidenciado en diferentes modelos experimentales de las estatinas, el objetivo del presente estudio está dirigido a la descripción del efecto de la simvastatina frente al daño generado por MPP+.

4. Antecedentes.

La etiología de la EP es desconocida; sin embargo recientemente se han demostrado que los procesos inflamatorios cumplen un importante rol en las etapas iniciales de la enfermedad. Ya que las células dopaminérgicas de la sustancia nigra son bastante susceptibles a estos procesos. (Wang et al., 2011). Aunado a ello la presencia de altos niveles de hierro registrados en la sustancia nigra (SN) de pacientes parkinsonicos, promueve la disminución de las defensas antioxidantes y la peroxidación lipídica que potencializa el daño celular.

Por otro lado, se tiene reportado que la medicación con simvastatina tiene un efecto inhibitorio sobre la enzima hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (HMG CoA) disminuyendo las concentraciones de colesterol por lo cual es recomendado en la prevención de enfermedades cardiovasculares y la prevención de accidentes cerebro vasculares (Yan et al., 2011).

Se ha reportado que el uso de las estatinas en prácticas clínicas y modelos experimentales, generan una significativa neuroprotección, evidenciada bajo diferentes parámetros que denotan la acción de diversas vías de señalización celular en las cuales interactúan estos fármacos. Recientemente G. Eger et al. (2016) demostraron el efecto neuroprotector de la administración oral de la simvastatina (10 mg/Kg/día) por 30 días, frente a un modelo murino sub-crónico de manía bipolar inducido por la administración de lisdexanfetamina dimesilato (30 mg/Kg/día) el cual genera un desbalance, determinado por un incremento en la peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y la alteración en las enzimas antioxidantes en diferentes áreas cerebrales; sin embargo en el grupo tratado con simvastatina genera un incremento en la repuesta antioxidante al aumentar la actividad de diferentes enzimas como catalasa y superóxido dismutasa, la regulación de la glutatión peroxidasa, así como la disminución de la peroxidación lipídica.

Además se ha demostrado un efecto similar del fármaco en modelo de ratas hemiparkinsonicas generado a partir de la inyección intranigral de lipopolisacáridos (LPS) (5 µg/µL). El grupo administrado con simvastatina durante dos semanas (5 mg/kg/día) previo a la lesión demostró una resistencia significativa por el daño inducido por la inyección de LPS, ya que en ensayos inmunohistoquímicos demostró una disminución en la actividad de los astrocitos y una reducción en la expresión de TNF- α , potencializando un efecto anti-inflamatorio. De tal manera que se genera una protección de células dopaminérgicas en sustancia nigra y una protección en las proyecciones estriatales (Wang et al., 2015).

De manera general en diversos estudios se han demostrado que las estatinas disminuyen la concentración de citosinas al inhibir reclutamiento y la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio, atenuando la producción de factores quimiotácticos que participan en la respuesta inflamatoria. La síntesis hepática de colesterol y aumentar la expresión de receptores LDL, las estatinas pueden inhibir la síntesis de importantes intermediarios isoprenoides, tal como farnesil pirofosfato (FPP) y geranyl pirofosfato (GGPP), que son necesarios para promover la actividad de una serie de vías como Ras, Rho, Rac y Rap, que activan las vías inflamatorias y son capaces de disminuir la producción de óxido nítrico (Obregón et al., 2011).

Cabe mencionar que en un estudio comparativo de una población medicada con estatinas se observó una reducción en la incidencia de casos de demencia o enfermedad de Parkinson. Asociando a la simvastatina con una reducción significativa en la incidencia de demencia en sujetos ≥ 65 años. (Wolozin et al., 2007) El reciente incremento en la evidencia clínica e investigación básica, demuestra un efecto positivo en la demencia y progresión de la EP, a partir del uso de la simvastatina permitiendo plantear la idea del uso de este fármaco como un coadyuvante en el tratamiento de la enfermedad, por su acción en la prevención de daño oxidante, antiinflamatorio y anti-apoptótico.

5. Generalidades clínicas de la Enfermedad de Parkinson.

La EP es una condición neurodegenerativa crónica y progresiva, que compromete la calidad de vida de los pacientes. La sintomatología de la EP se genera como resultado de la muerte de un 40-50% de células dopaminérgicas en la vía nigroestriatal y la disminución de un 70-80% de DA (Stowe et al., 2009; Shadrina et al., 2010), además los pacientes con EP clásica presentan una sintomatología caracterizada por una alteración en la ejecución de los movimientos, aunque este tipo de desorden neurodegenerativo, incluyendo también problemas psiquiátricos tales como depresión y demencia, así como alteraciones autosómicas y alteraciones del sueño (Stowe et al., 2009).

Hasta el momento se desconocen la causa de la enfermedad, sin embargo se tienen caracterizados una serie de factores genéticos, los cuales representan de un 5-10% de los casos diagnosticados, no obstante el 90% de los casos registrados son esporádicos y relacionados a factores ambientales generados a partir de la exposición a agentes químicos tóxicos, sin estar ligados a algún factor genético aparente (Rosner et al., 2008). De acuerdo a estimaciones de Van Den Eeden et al. (2003) en un estudio que engloba a las cuatro razas más comunes en Estados Unidos, se encontró una variación en la incidencia de la enfermedad, con una tasa mayor de casos en individuo de raza blanca, pero en donde

también destacan la comunidad latina con el segundo lugar en el número de casos reportados .

Las alteraciones que caracterizan a la enfermedad pueden estar presentes al momento del diagnóstico e incluso precederlo, encontrando una correlación constante en los estudios entre la aparición de algunas complicaciones de la enfermedad y la edad del paciente. (Gómez et al., 2011). Para el completo diagnóstico de la EP se cuenta con apoyado de una serie de pruebas de imagen cerebral, de neuroimagen y pruebas neurofisiológicas, que pueden ayudar a excluir otras enfermedades que pueden tener una sintomatología similar a la EP (Escamilla & Mínguez, 2012). En relación a la sintomatología de la enfermedad, la ejecución de los movimientos voluntarios alterados es resultado de un incorrecto procesamiento de información sensorio-motriz, organizada por una compleja red neuronal en donde se ven involucrados el motor tálamo-cortical y los ganglios basales. El progresivo fenómeno neurodegenerativo de las células dopaminérgicas de la SNpc que define a la EP, tiene como consecuencia el cambio de la organización funcional de los ganglios basales y por lo tanto la pérdida de capacidades motrices (Blandini et al., 2000).

6. Organización funcional de los ganglios basales.

Los ganglios basales son un conjunto de núcleos cerebrales localizados en el interior del telencéfalo, interconectados por una red de proyecciones de naturaleza diversa, en relación a su principal neurotransmisor, tienen la función de procesar la información proveniente de diferentes regiones corticales y modulares a través de una vía de retroalimentación tálamo cortical. Por su complejidad sobresalen; el núcleo caudado-putamen (Ncp), núcleo acumbens (NA) (en roedores estas estructuras son homólogas a una estructura nombrada cuerpo estriado), globus pallidus (GP); globus pallidus interno (GPi), conocido como núcleo entopeduncular en roedores y globus pallidus externo (GPe), sustancia nigra (SNpc, pars compacta, SNpr pars reticulata (SNr), núcleo subtálamico (NST) y área de tegmental ventral (ATV) (Blandini et al., 2000).

En los roedores, el cuerpo estriado (CE) es la principal estructura de entrada a los ganglios basales, de acuerdo a una ubicación comparativa de las regiones de CE con el caudado-putamen de los primates; dorsomedialmente, se encuentra el caudado, el putamen en la porción dorso lateral y el núcleo acumbens localizado en la porción ventral del CE. Para la mayoría de las especies el 95% del CE está constituido principalmente por proyecciones de neuronas espinosas medianas, de naturaleza gabaérgica, las cuales tienen como característica poseer un extensa arborización dendrítica, esta es clave para la creación de sistemas de actividad específicas, las cuales se originan de una amplia gama de estructuras corticales y subcorticales (Blandini et al., 2000; McBride & Parker, 2015).

Según estudios la mayoría de las inervaciones aferentes del estriado son de naturaleza excitatoria, proyecciones glutamatérgica virtualmente dirigidas de todas las áreas corticales; también se encuentran inervaciones de naturaleza dopaminérgica dirigidas desde SNc principalmente y en menor densidad ATV. Se considera que la información cortical es transferida por los ganglios basales al tálamo y de regreso a la corteza, de acuerdo al modelo de los circuitos subspecializados y en relación al circuito motor se ha teorizado el funcionamiento de tres vías, las cuales son activadas en serie para la ejecución del movimiento. Al inicio del acto motor la vía hiperdirecta estimula el Gpi/SNpr, esto genera inhibición de los estímulos generados por el tálamo a nivel funcional esto inhibe los movimientos innecesarios para el inicio del patrón de movimientos a ejecutar. Acto seguido la vía directa, mediado por la actividad de estimulación de los receptores estriales dopaminérgicos tipo D1, proyecta e inhibe el complejo Gpi/SNr que excita a las neuronas talámicas y corticales, ajustando y ejecutando el programa motor seleccionado. Finalmente la activación de los receptores tipo D2 que inhiben la vía Indirecta y que en conjunto con los núcleos Gpe y el NST como estaciones intermedias, participan en la activación nuevamente el Gpi/SNpr inhibiendo el tálamo y suprimiendo programas motores competitivos a la terminación del movimiento. (Figura 1) (Blandini et al., 2000; McBride & Parker, 2015).

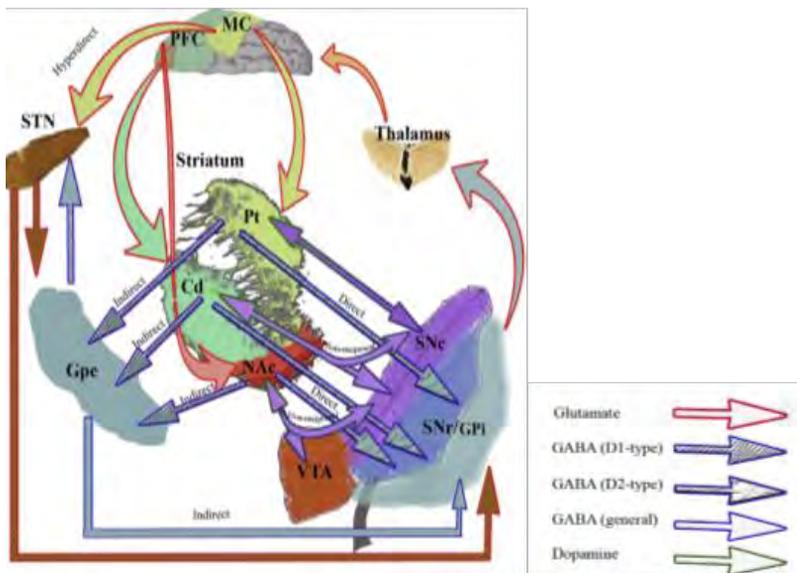


Figura 1. Sistema de los ganglios basales incluyendo las vías directa, indirecta e hiperdirecta. (McBride & Parker, 2015)

De tal manera que dentro de este circuito la DA adquiere un carácter dual sobre las neurona estriatales, al generar un estado excitatorio sobre la vía directa e inhibitorio sobre la vía indirecta, por lo cual es considerado un neurotransmisor regulador sobre ambas vías, manteniendo inhibidos el complejo GPi/SNr y facilitando permanentemente la ejecución de planes motores corticales (Álvarez González, 2001; Ávila Luna, 2014).

7. Síntesis de la DA

La dopamina (DA) es un neurotransmisor catecolaminérgico, los cuales en general su estructura está compuesta de un núcleo catecol (un anillo benceno con dos hidroxilos y una cadena de etilamina o alguno de sus derivados), en el sistema nervioso central, participa en la regulación de la vía tálamo cortical y señalización de procesos conductuales, así como en la comunicación neuroendocrina. Su síntesis tienen lugar en las terminales nerviosas dopaminérgicas, a partir de la acción secuencial de Tirosina Hidroxilasa (TH) y L-DOPA descarboxilasa (Figura 2) (Bahena-Trujillo & Arias-Montaño, 2000).



Fig. 2 Biosíntesis de las catecolaminas neurotransmisoras. El aminoácido L-tirosina es el precursor de catecolaminas. El primer paso en esta vía de reacción está catalizado por la enzima tirosina-hidroxilasa (TH), que es limitante de la velocidad. (Beatriz Pormilio et al. 2016)

Previo a la liberación sináptica la DA es almacenada en vesículas por medio de los transportadores vesiculares de monoaminas (VMAT) (proteínas localizadas en las vesículas sinápticas), por un gradiente electroquímico generado por una bomba de protones (H+) (ATPasa). Posteriormente, la DA contenida en vesículas es liberada al exterior de la célula al fusionarse la membrana vesicular con la membrana de la terminal presináptica, la liberación se genera por la fosforilación de sinapsinas que debilitan la unión de las vesículas con el citoesqueleto, esta fosforilación es llevada a cabo por la acción de cinasas (dependientes de Ca²⁺). (Bahena-Trujillo & Arias-Montaño, 2000; López, 2008)

8. Catabolismo de la DA

La DA recapturada por el sistema de transportadores de DA, es metabolizada por la enzima monoamino-oxidasa A (MAO-A), presente en el interior de la terminación nerviosas, en ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) el cual es liberado al exterior de la terminal para ser convertido en ácido Homovanílico (HVA) por la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT). La DA no capturada por las terminales dopaminérgicas es metabolizada en HVA por la acción secuencial de las enzimas COMT y MAO-A (Figura 3) (Bahena-Trujillo & Arias-Montaño, 2000).

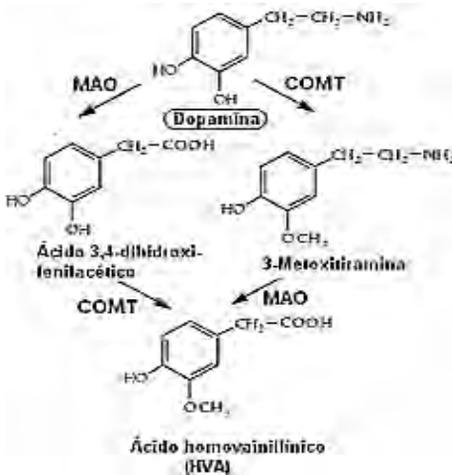


Figura 3. Catabolismo de las catecolaminas. Actividad de la enzima monoamino-oxidada (MAO) y la actividad catecol-o-metiltransferasa (COMT). En el mecanismo de degradación de la DA (Pomilio, A. B et al. 2016)

Existen dos familias farmacológicas de receptores dopaminérgicos denominadas D1 y D2 todos ellos acoplados a proteínas G. Los receptores de la familia D1 (subtipos D1 y D5) estimula la formación de AMPc como principal mecanismo de transducción de señales. Los subtipos pertenecientes a la familia D2 (D2, D3 y D4) inhiben la formación de AMPc, activan canales K⁺ y reducen la entrada de iones Ca²⁺ a través de canales de dependientes de voltaje. (Bahena-Trujillo & Arias-Montaño, 2000) Se ha observado que es necesaria la activación simultánea de ambos recetores para la plena expresión de las conductas motoras mediadas por estos núcleos (Bahena-Trujillo & Arias-Montaño, 2000; Góngora, 1990).

9. Cambios de la organización funcional de los ganglios basales en la Enfermedad de Parkinson

La principal alteración resultante de déficit dopaminérgico de la vía nigro-estriada es la potenciación de la vía indirecta sobre la vía directa afectado a los núcleos de salida del circuito, generando una señal inhibitoria de la actividad tálamo-cortical. De tal manera que es evidente que el rol que ejerce la DA en condiciones fisiológicas, sobre el circuito de los ganglios basales es el de al regular la transmisión glutamatérgica hacia las áreas motoras, facilitando así los procesos motrices generados desde la corteza. Además el desequilibrio se acentúa por las proyecciones corticales del estriado ya que reduce su actividad sobre la vía directa sin cambiar su efecto sobre la indirecta. (Figura 4B) (Blandini et al., 2000; Alvarez González, 2001).

Por medio de técnicas de imagenología se ha evidenciado la disminución en la conectividad de núcleos cerebrales en pacientes parkinsonicos no tratados con L-Dopa en comparación a un grupo control, esto se observa en particular en la disminución de la conectividad funcional del putamen; De la misma forma se ha reportado un disminución en la conectividad entre la región dorso lateral en cuerpo estriado y la corteza prefrontal, zonas que han sido ligadas a la ejecución de movimientos, las cuales se encuentran comprometidas en una etapa temprana de la enfermedad. (Szewczyk-Krolkowski et al., 2014; Rolinski 2015).

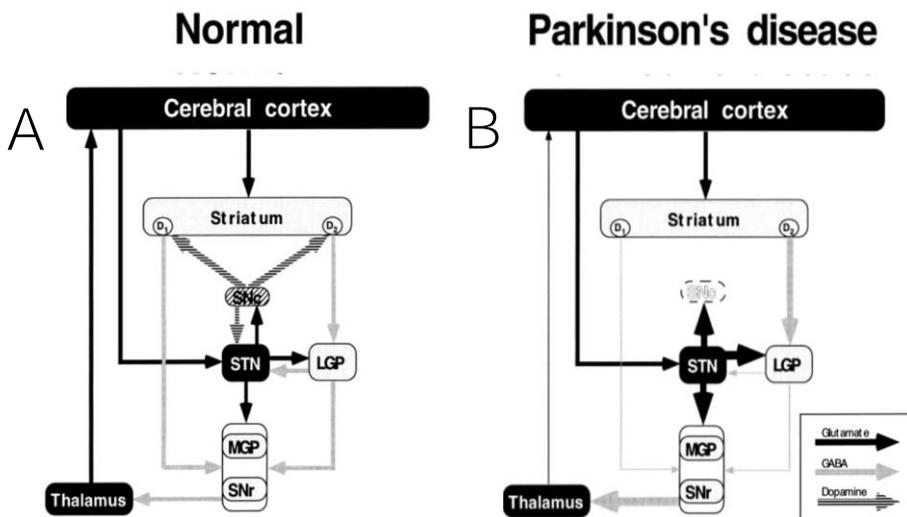


Figura 1. A) Modelo convencional de la organización funcional de los ganglios basales. B) El esquema ilustra los cambios ocurridos en esta organización en la enfermedad de Parkinson (Blandini, 2000).

10. Procesos bioquímicos implicados en la Enfermedad de Parkinson

Una potencial causa en el origen de las enfermedades neurodegenerativas se relaciona con un desbalance entre la generación de radicales libres y los sistemas de defensa antioxidante, por mencionar como ejemplo, en paciente se ha reportado la disminución en los niveles de superóxido dismutasa y catalasa que funcionan como un sistema coordinado en una serie de pasos metabólicos para la reducción del oxígeno que en conjunto con la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa disminuyen las concentraciones de especies reactivas de oxígeno (Figura 5) (Martínez et al., 2003).

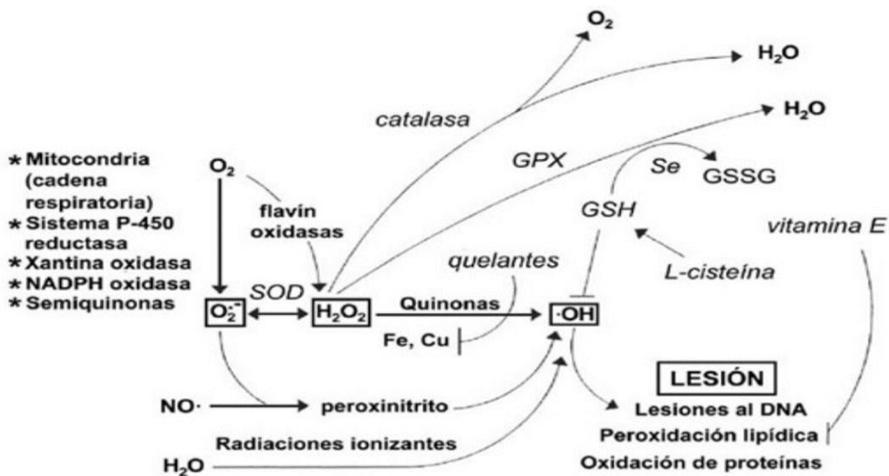


Figura 5. Los sistemas antioxidantes trabajan en forma coordinada en una serie de pasos metabólicos, por ejemplo en los sistemas enzimáticos el $\cdot O_2^-$ al ser metabolizado por la SOD se produce H_2O_2 , los peróxidos a su vez son metabolizados hasta H_2O y O_2 por la catalasa o la glutatión peroxidasa que actúa en forma acoplada con la glutatión reductasa. Estos sistemas antioxidantes disminuyen con la edad, en ciertos procesos patológicos (Martínez et al., 2003).

El daño celular pueden agravarse, de igual manera por la disminución en la eficiencia en los mecanismos de reparación de ADN (Aquilano & Ciriolo, 2014; Angoa & Rivas, 2007, Martínez et al., 2003; López, 2008). Se ha reportado que dentro de las primeras etapas de la EP se presenta una temprana elevación de los niveles de hierro en los núcleos subcorticales, se ha reportado esta característica bioquímica de la EP tanto en casos idiopático como en casos ligados a trastornos genéticos hereditarios, para algunos investigadores se describe como la principal razón de la pérdida de neuronas dopaminérgicas (Adriana, 2010; Ayton & Lei, 2014), ya que el hierro en su estado reducido (Fe^{+2}) tiende a generar fácilmente una producción de anión hidroxilo y radical hidroxilo, por medio de la reacción de Fenton (Ayton & Lei, 2014).

11. Neuroinflamación en la Enfermedad de Parkinson: Actividad de la Microglía.

La neuroinflamación es el principal mecanismo de protección y restauración de la estructura y función cerebral frente a un daño o infección. Sin embargo un exceso en la respuesta y una inflamación crónica, induce un efecto citotóxico y un incremento en la progresión de las enfermedades neurodegenerativas promoviendo un deterioro relacionado con una respuesta inmune (Kempuraj et al. 2017).

Los mastocitos son sensores multifactoriales y efectores en los trastornos del sistema nervioso, vascular y del sistema inmunológico. En el cerebro, los mastocitos se localizan principalmente en la región interna de la BHE (Barrera hematoencefálica) al ser activados pueden generar un efecto degenerativo, al aumentar la permeabilidad de la BHE (por medio de moléculas vasodilatadoras) al promover una interacción entre la comunicación neuronal y la actividad de la glía con los componentes neurovasculares. La liberación de mediadores inflamatorios tales como IL-1, TNF- α , IL-6, quimosinas y liberación de ERO por la microglía, células T y los mastocitos inducen a una neuroinflamación (Kempuraj et al. 2017).

Los procesos inflamatorios de la EP se relacionan con la pérdida de la actividad de algunos inmunomoduladores y moléculas de adhesión celular neuronal producidas por la mayoría de las células neuronales, los receptores de estas moléculas se encuentran expresados en la microglía del SNC, de tal manera la regulación de la actividad de la microglía se relaciona con la actividad de células neuronales y por lo tanto la regulación de la neuroinflamación (Wang et al., 2015). Por otra parte la pérdida de la regulación de vías inflamatoria puede ser generada, como resultado de una acumulación de agregados proteicos de α -sinucleína o alteraciones de señalización relacionadas con actividad del sistema inmune en la EP. Por otro lado, la actividad de la glía puede expresar (fenotipo alternativo M1), un aumento en la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12 y otras moléculas citotóxicas que contribuyen al aumento en la respuesta proinflamatoria (Chandra et. al 2017; Wang et al., 2015), esta actividad se encuentra mitigada por la microglía M2 genera una inmunosupresión con un rol antagonista de la clase M1, promoviendo la reparación del tejido, produciendo citocinas antiinflamatorias como IL-4, IL-13, IL-10 y TGF- β (Kirkley et al., 2017). Los niveles de NADPH-oxidasa (Nox) es el mayor regulador de cambio entre los fenotipos de astrocitos M1/proinflamatoria y M2/inmunoregulador. La angiotensina II, vía del receptor de angiotensina 1, que es el mayor activador del complejo (NADPH-oxidasa), induciendo a un efecto pro-oxidante y proinflamatoria (Labandeira-Garcia et al., 2017)

La mayoría de los genes expresados en las respuestas proinflamatoria es controlada por la transcripción del factor NF- κ B que mantiene una actividad crucial frente a la respuesta inflamatoria por la regulación de genes que codifican citocina proinflamatorias como (TNF- α , IL-1 β y IL-6) liberados por la microglía y la actividad del óxido nítrico sintasa inducible. (Chandra et. al., 2017; Kirkley et al., 2017). La liberación de mediadores inflamatorios, por parte de la microglía promueve el daño de neuronas dopaminérgicas, que resulta en la generación de gliosis reactiva, es un proceso por el cual existe una perpetuidad resultando en una neuroinflamación crónica impulsando la degeneración neuronal progresiva en la EP, se ha sugerido que la relación de la microglía en la inflamación, es un proceso, en un estado temprano de la enfermedad (Figura7) (Flood et al., 2011).

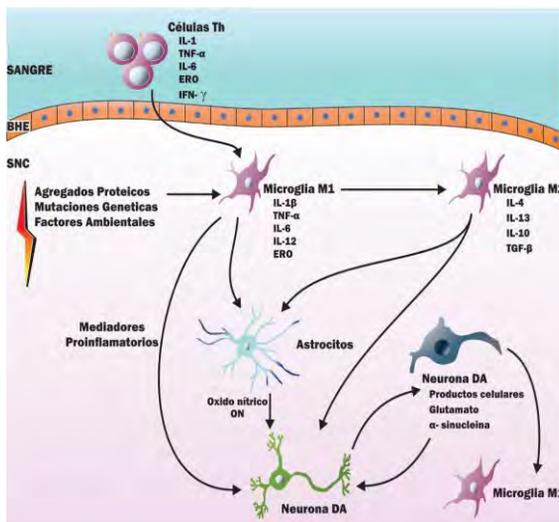


Figura 7. El diagrama representa el mecanismo de neuroinflamación de la EP, la microglía activa M1, en condiciones patológicas. La liberación de mediadores proinflamatorios activa a los astrocitos que conducen a una producción elevada de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno. Contribuyendo a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. La liberación de moléculas de las células dopaminérgicas dañadas puede causar además la activación de la glía potencializando la respuesta inflamatoria. En algunas etapas de la enfermedad, la subpoblación de la microglía, puede activarse el fenotipo M2 que puede liberar factores antiinflamatorios (Wang et al., 2015).

Aunado a ello la progresión de la enfermedad y la disminución de las células dopaminérgicas por la activación de la microglía se encuentra relacionada por una infiltración de células T, proceso regulado por la secreción de citosinas, quimiocinas, elementos pro inflamatorios y también elementos citotóxicos tales como el glutamato, aspartato y ácido quinolinico. Procesos ligados a una interacción entre las vías proinflamatorias y los receptores exitotóxico, produciendo un incremento de los proceso neurodegenerativos (Blaylock, 2017; Chandra et. al 2017). De manera puntual la liberación de TNF- α , es reconocida por su actividad proinflamatoria, desempeñando un papel central como iniciadora de la cascada de activación de otras citocinas involucradas en la respuesta de alteraciones fisiológicas y la activación de la microglía potencializando el daño (Harms et al, 2011).

Como ya se había mencionado y como un mecanismo agravante en la progresión de la enfermedad, la actividad de la microglía produce la liberación de una serie de productos citotóxicos que provocan daño y muerte neuronal; por el aumento de la concentración de •NO (particularmente cuando se estimula con interferón gamma, $IFN\gamma$, y factor de necrosis tumoral alfa, $TNF-\alpha$) El •NO producido por la glía activada o por los astrocitos en respuesta a ROS, actúa como mediador en la neurodegeneración y activa procesos inflamatorios. El aumento excesivo de NO y ROS inhibe la respiración mitocondrial en las neuronas, produciendo la liberación de glutamato (a través del transportador de glutamato GluT) estimulando los receptores NMDA (NMDAR) (Martínez et al., 2003).

La activación de estos receptores dispara la entrada masiva de Ca^{+2} en las neuronas, llevando a las células a muerte apoptótica. Ya que la excitabilidad de la microglía es dependiente de la actividad sináptica neuronal y esta actividad astrocitaria se encuentra relacionada con la liberación de glutamato, la presencia de Ca^{2+} extracelular puede modular una actividad exitoxica neuronal, mecanismo el cual en una enfermedad neurodegenerativa potencializara el daño y la progresión (Martínez et al., 2003).

12. Tratamientos de la Enfermedad de Parkinson.

Considerando la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson el principal objetivo del tratamiento es reducir la velocidad de progresión de la enfermedad y el control de los síntomas, previsualizando los efectos secundarios derivados de los fármacos que se usan para aliviarlos (Escamilla & Mínguez, 2012). La diferentes clases de drogas que controlan la sintomatología en los pacientes con la EP son prescritas de acuerdo al progreso de la enfermedad con respecto a diferentes escalas (the Unified Parkinson's Disease RatingScale, the Hoehn and Yahr scale and the Schwab and England scale), cabe mencionar que la elección de las drogas depende de una combinación de factores, incluyendo la efectividad relativa y los efectos adversos de cada fármaco (Scottish Intercollegiate Guidelines Network, 2010)

Ya que la DA no puede cruzar la barrera hematoencefálica se han desarrollado una serie de fármacos que favorecen la producción de este neurotransmisor o retrasar el deterioro celular. El uso del precursor metabólico de la DA, la levodopa (L-DOPA) en combinación con inhibidores de la monoamino oxidasa (MAO-B) o la catecol-orto-metiltransferasa (COMT), continua siendo actualmente el tratamiento médico más eficaz para la enfermedad de Parkinson. Tras su administración oral, la levodopa produce fluctuaciones en los niveles plasmáticos debido a su corta vida media. La estimulación pulsátil de los receptores de DA depende de los niveles de L-DOPA en la sangre, lo que da lugar al desarrollo de complicaciones motoras. El uso de inhibidores de la MAO-B o la COMT

evita la descomposición de la levodopa por parte del sistema nervioso periférico permitiendo el uso de una dosis menor del fármaco, finalizando en la estimulación de los receptores dopaminérgicos a nivel estriatal constituyendo en la reducción de las fluctuaciones motoras y las discinesias, en ocasiones estas fluctuaciones suelen ser reguladas con el uso de otro agonista dopaminérgico conocido como apomorfina que a diferencia que la DA, tiene rápido acceso a través de la BHE actuando sobre los receptores dopaminérgicos (Escamilla & Mínguez, 2012).

Previo al uso de la levodopa como el principal fármaco para la reducción de la sintomatología de la EP se propuso el uso de drogas anticolinérgicas, que al tener una actividad competitiva con los receptores muscarínicos, disminuye considerablemente la hiperactividad ganglionar generada en la enfermedad sin embargo su uso en la actualidad se propone en conjunto con otras estrategias farmacológicas incrementando la efectividad del tratamiento (Brocks, 1999).

Sin embargo los beneficios clínicos de la levodopa se ven opacados por la presencia de complicaciones, por lo cual se ha llegado a sugerir el uso de implantes colocados por medio de un método quirúrgico para disminuir los síntomas motores de la enfermedad, la estimulación cerebral profunda consiste en la implantación de un electrodo en el NST o GPi conectado a un generador de impulsos, el sistema genera cambios en la fisiología del circuito ganglionar a través de modificaciones en el patrón de modificación en el patrón de oscilación sincronización y descarga de estas redes neuronales (Ruedas-Acevedo et al., 2014).

La disminución de la efectividad de los fármacos con el paso del tiempo y la disminuida cantidad de pacientes como candidatos para someterse a método quirúrgico, son razones que obligan al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que puedan someterse a prueba para generar un tratamiento alternativo para la enfermedad de Parkinson.

13.1 Modelos experimentales de la Enfermedad de Parkinson.

Los modelos clásicos de la enfermedad de Parkinson son generados a partir del uso de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), 6-Hidroxidopamina (6-OHDA) y actualmente el uso de químicos de uso agrícola como el paraquat (PQ) y la rotenona (ROT) que como uno de sus principales características, como modelo experimental es la disminución de la DA. Generan un déficit de la actividad motriz en diferentes especies animales, reflejado a partir de la administración de agonistas dopaminérgicos (G. Bazzu et al., 2010).

El efecto tóxico de estas moléculas se produce al atravesar la barrera hematoencefálica. El MPTP entra al astrocito donde es metabolizado por la monoamino oxidasa B, y se transforma en el 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺), se libera al espacio presináptica y entra en las neurona dopaminérgicas a través del transportador de DA y se va directamente a la mitocondria. (Adriana et al., 2010).

La ROT, PQ, y 6OHDA atraviesan la membrana de las neuronas y también se dirigen a la mitocondria. Todos los tóxicos actúan inhibiendo el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, lo cual aumenta la generación de especies reactivas de oxígeno, disminuye el potencial redox y por lo tanto la síntesis de ATP (Figura 8).

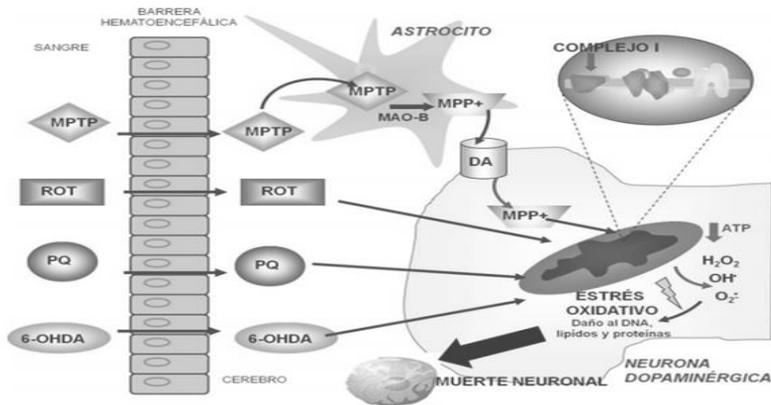


Figura 8. Efecto tóxico de los agentes neurotóxicos. Los tóxicos descritos: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinio (MPTP), Rotenona (ROT), paraquat (PQ), 6 hidroxidopamina (6OHDA), atraviesan la barrera hematoencefálica. (Adriana 2010).

La generación de especies reactivas de oxígeno induce estrés oxidante, propiciando daño a las biomoléculas. Todo ello fomenta la muerte de las neuronas dopaminérgicas. Aunque la administración del MPTP no produce ningún cambio deletéreo significativo en la degeneración de la vía nigro estriatal dopaminérgica en la rata, debido a la ausencia de la maquinaria enzimática para ser metabolizado y generar los productos neurotóxicos, la administración directa de su metabolito, MPP⁺ (1-metil 4-fenilpiridinium), produce la destrucción de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y las fibras dopaminérgicas estriatales (Adriana et al., 2010). Tanto agentes ambientales como agentes neurotóxicos, ejercen un crucial mecanismo de estrés oxidante, así como la actividad microglía y la disfunción mitocondrial (Adriana et al., 2010)

13.2 Mecanismo de daño de 1-metil 4-fenilpiridinium

Desde el punto de vista neuroquímico también existe una gran similitud entre el parkinsonismo inducido por el MPTP y otros modelos experimentales de la EP. La acción neurotóxica, se caracteriza como en la EP, de una disminución en las concentraciones de DA y de sus metabolitos, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y el ácido homovanílico (HVA), así como una disminución de la actividad enzimática tirosina hidroxilasa y una alteración en la densidad de los receptores dopaminérgicos, que en pruebas conductuales de giro se ve reflejado por un aumento significativo en el número de giros ipsilateral (Adriana et al., 2010).

El MPTP es caracterizada como una molécula altamente lipofílica con una capacidad facilitada de atravesar la barrera hemato encefálica, induce uno de los modelos experimentales más utilizados para el estudio de la patogénesis de la EP, la administración sistémica de MPTP en modelos murinos causa una selectiva pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra. En la neurotoxicidad generada por el MPTP se requiere la actividad de la monoamino oxidasa B para metabolizarlo como MPP⁺, que es liberado al espacio extracelular como metabolito neurotóxico, proceso generado principalmente en las células de la glía.

El MPP⁺ al ser internalizado por el transportador de DA en las células dopaminérgicas, el efecto neurotóxico del MPP⁺ es generado por la inhibición del complejo I mitocondrial del sistema de transporte de electrones (NADPH ubiquinona oxidoreductasa) (Figura 9) (Drechsel y Patel,2008; Nicotra y Parvez, 2002).

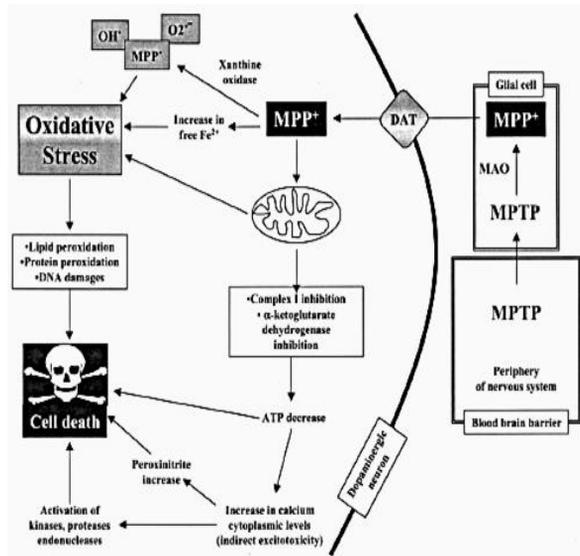


Figura 9. Mecanismo hipotético de la toxicidad del MPTP. El metabolito activo MPP⁺ cruza la membrana neuronal por medio del Transportador de DA. Conduce a una inhibición de la cadena respiratoria pero también al estrés oxidante, desencadenando la muerte celular. La inhibición mitocondrial provoca una disminución de ATP presumiblemente es responsable de la excitotoxicidad secundaria que induce un aumento niveles de calcio citoplásmico. (Blum et al., 2001).

A consecuencia de ello se produce una disminución en las concentraciones de ATP y un aumento en las concentraciones de las especies reactivas de oxígeno, el estrés oxidante generado, un aumento en la señalización de muerte neuronal. Además la neurotoxicidad generada por el MPTP genera un aumento en las concentraciones de calcio, inducido por

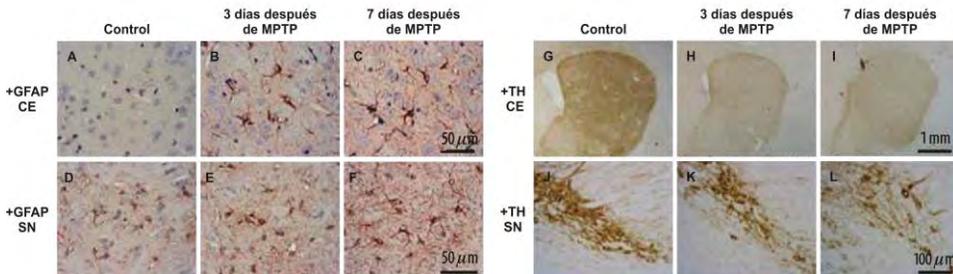


Figura 10. Efecto de la administración intraestriatal de MPP⁺, demuestra la actividad progresiva de la microglía, evidenciada por la respuesta +GFAP (A, B, C). Se puede observar la disminución de la señal +TH en las fibras dopaminérgicas (G, H, I) a partir de la administración del neurotóxico. De igual manera la administración intra nigral de MPP⁺, genera un aumento en la actividad de la microglía (D, E, F) y la disminución de la señal +TH en los somas dopaminérgicas presentes en SN (J, K, L) (Watanabe et. al, 2005).

un efecto exitotóxico mediado por el glutamato, estimulando la actividad de la óxido nítrico sintasa (Drechsel y Patel, 2008; Nicotra y Parvez, 2002).

Además de la disminución en la señal positiva para Tirosina Hidroxilasa (TH) en estudios de inmunofluorescencia se ha observado un aumento en el número de astrocitos con señal positiva para GFAP en sustancia nigra y en estriado, en animales administrados con MPP+ (Figura 10), esto sugiere una acción compensatoria contra el daño neuronal generado por la neurotóxina. (Watanabe et. al, 2005). La sobre producción de ERO por el incremento de la actividad microglía y la formación de agregados de α -sinucleína y muerte neuronal, A su vez la entrada de las células T del sistema inmune, reaccionan con proteínas nitradas potenciando la actividad neurotóxica de la microglía en el modelo de MPTP (Mosley, 2012).

14. Estatina: Química y propiedades funcionales

Las estatinas son el tratamiento por elección para el tratamiento de la hipercolesterolemia. Su estructura química se divide en tres partes, una análoga con una función sustrato de la enzima HMG- CoA reductasa, una anillo hidrofóbico unido covalentemente al sustrato análogo relacionado con la unión de la estatina al sustrato, grupos laterales en el anillo que definen la propiedades de solubilidad del fármaco y por lo tanto muchas de sus propiedades farmacocinéticas. Debido a su perfil de eficacia y seguridad, es por lo cual en los últimos años han obtenido un acrecentado rol, en la disminución de riesgo cardiovascular en pacientes con niveles relativamente normales de colesterol aunque todas las estatinas mantienen un mecanismo común de acción, difieren en su estructuras químicas, su perfiles farmacocinéticas y sus propiedades de eficacia. (Schachter et al., 2004).

La estatinas de manera general son conocidas por ser inhibidores de la enzima hidroximetilglutaril-Co A (HMG- CoA) reductasa, son comúnmente usadas como fármacos hipolipemiantes, aprovechando este efecto en la reducción del colesterol, demostrando una disminución en la incidencia de enfermedades cardiacas. El bloqueo de actividad de esta enzima impide la síntesis del ácido mevalónico, indicando que esta acción interfiere con otros mecanismos de comunicación celular ya que la síntesis de esta molécula son indispensable para la producción de isoprenoides, como farnesil pirofosfato (FPP) y geranil pirofosfato (GGPP) (Figura 11), que son necesarios para la acción de vías celulares como Ras, Rho, Rac y Rap, que activan vías inflamatorias y son capaces de disminuir la producción de óxido nítrico (Obregón, 2011; van der Most et al, 2009).

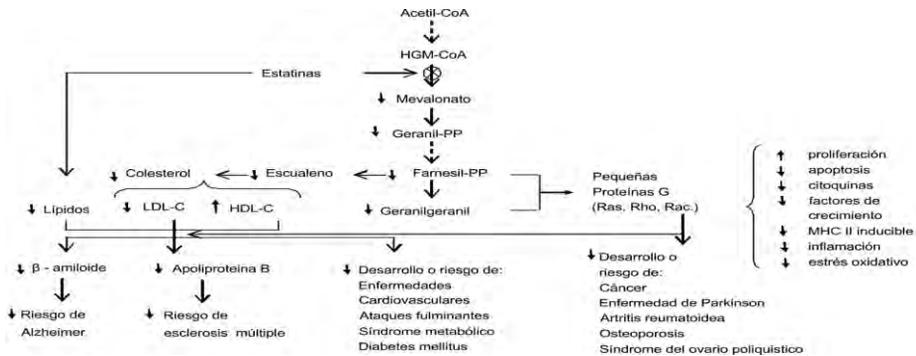


Figura 11. Modelo explicativo de la variedad de efectos biológicos de las estatinas. La inhibición de la HMG-CoA reductasa no reduce intermediarios isoprenoides, afectando la activación de proteínas G. Esto puede resultar en la modulación de señales de transducción desde receptores a la expresión del gen, afectando directamente el balance proliferación/apoptosis, las quimiocinas inflamatorias y los mensajes citogénicos mediados por las proteínas G (Hegwin-Angarita, 2012).

Por otro lado la síntesis de FPP es esencial para la producción de grupos hemo y ubiquinonas (coenzima Q10) los cuales tienen una función antioxidante y el dolicol el cual puede tener una función de quelante de radicales libres, sin embargo no se encuentra esclarecido si eso ocurre también en el cerebro (van der Most et al., 2009)

15. Metabolismo de la Simvastatina.

La simvastatina, derivado metilado de la lovastatina, ambos pro-fármacos, que requieren hidrólisis para su activación a su forma ácida por acción de esterasas. La simvastatina es utilizada para el tratamiento de la hipercolesterolemia primaria, reduciendo los niveles de las LDLs, triglicéridos y de la apolipoproteína B. Después de la atorvastatina, la simvastatina es el más potente de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa. Su estructura química de lactona, le genera una lipófila elevada. (García-Sabina et al., 2011)

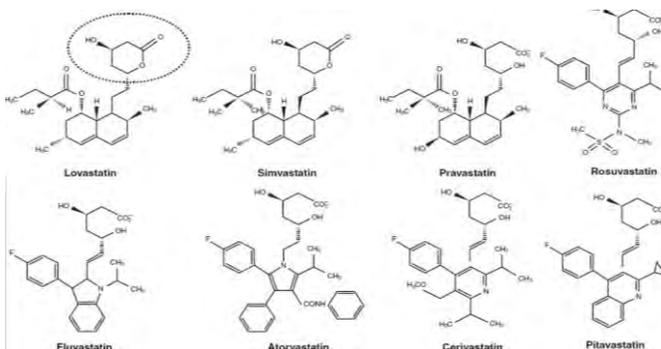
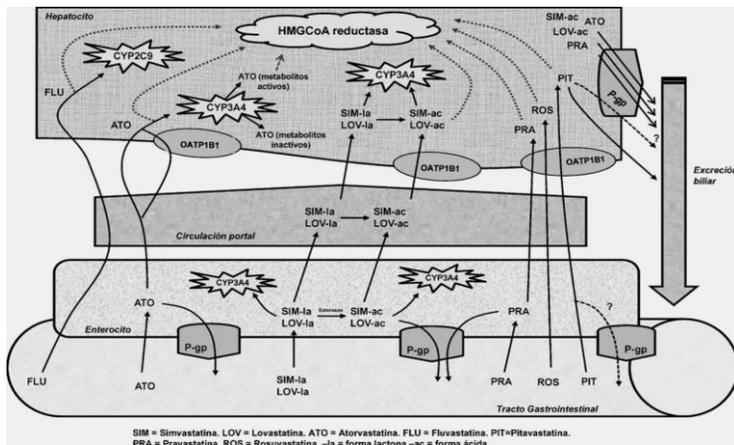


Figura 12 Estructura química de diferentes estatinas (Hegwin-Angarita, 2012).

Al ser metabolizada por la actividad enzimática de esterasas, generan una forma activa acida, internalizada por los hepatocitos en una baja biodisponibilidad (<5%), esta considerable disminución de las concentraciones es a consecuencia de un primer paso metabólico en la pared intestinal y a nivel hepático debido a la actividad de la isoenzima 3A4 del citocromo P450 (CYP3A4) (responsable de la eliminación presistémica de las simvastatina, al inactivarla tanto en su forma de lactona como la acida de la misma) y de la glucoproteína P (P-gp) que se encuentra ampliamente localizado en el tracto gastrointestinal, hígado, riñón, cerebro y placenta. Actúa como una bomba excretando xenobióticos hacia el espacio extracelular y es la responsable de los mecanismos de resistencia a ciertos fármacos (García- Sabina et al., 2011).

La simvastatina penetra en los hepatocitos en parte en su forma de lactona (forma liposoluble) se difundiendo a través de la membrana plasmática y en parte en su forma ácida (forma hidrosoluble) a través del OATP1B1. (Wang et al., 2011)



Aspectos Fármacos cinéticos relevantes del metabolismo de las estatinas (García- Sabina et al., 2011)

16. Actividad neuroprotectora de la Simvastatina.

Ya que diferentes mecanismos se encuentran relacionados con la patogénesis de la EP, evidencias sugieren que la respuesta inflamatoria que se encuentra caracterizada por una activación de la microglía y la acumulación de mediadores inflamatorios tales como citosinas y proteasas en sustancia nigra y cuerpo estriado que en conjunto son responsables de la progresión de la EP (Wang et al., 2011).

Como posible efecto neuroprotector inducido por las estatinas se ha propuesto la participación en la activación de la cascada de señalización Ras-ERK y AKT que pueden incrementar la acción de proteínas de sobrevivencia como la Bcl-2 (Thouennon, 2015; van der Most et al., 2009). Se ha reportado que la administración con estatinas inducen a un incremento de la actividad de eNOS, una actividad que sobre regula la producción de ON, evidenciando en diferentes trabajos que el aumento en la actividad de eNOS modulando la vía de señalización de diferentes mecanismos antioxidantes generando un efecto neuroprotector de las estatinas (Wang et al., 2011).

Por otra parte diferentes estudios han comenzado a estudiar los diferentes mecanismos de neuroprotectores a partir del uso de neurotóxicas como como el MPTP, reportando que la administración oral de simvastatina previene la formación de 3- nitrosina, en el estriado bajo un modelo dosis dependiente, esta neuroprotección ha sido asociada, con la respuesta antiinflamatoria del fármaco disminuyendo la producción de TNF- α y anión supero oxido. Similar a este efecto antiinflamatorio, se tienen caracterizadas diferentes líneas de estudio de las estatinas, se ha demostrado que frente a un modelo parkinsonicos inducido por la administración de LPS en ratas, la simvastatina retrasa la degeneración dopaminérgica generada por el modelo por efecto de la activación del factor neurotrófico (Wang et al., 2011).

Cabe mencionar que alguno estudios indican que en cultivos de células neuronales con acumulaciones de α - sinucleína, como modelo parkinsonicos *in vitro*, las estatinas disminuyen la acumulación de agregados (Bar- On, 2008), resultados similares fueron obtenidos por Koob et al. (2010) bajo un modelo transgénico del cultivo neuronales.

17. Hipótesis.

La administración oral de simvastatina es capaz de disminuir las alteraciones conductuales, bioquímicas y morfológicas generadas por la administración intraestriatal de MPP+.

18. Objetivo General.

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

19. Objetivos Particulares.

- Determinar el efecto de la administración oral subcrónica de simvastatina por medio de la conducta de giro inducida por la administración de apomorfina, siete días después de la microinyección intraestriatal de MPP+.
- Evaluar las concentraciones de DA en el cuerpo estriado, bajo el mismo esquema de administración oral sub-crónico de simvastatina después de la lesión con MPP+
- Caracterizar la acción de la administración oral subcrónica de simvastatina frente a una prueba de peroxidación lipídica por medio de la cuantificación de producto lipídicos fluorescentes producidos por la administración de MPP+ en el cuerpo estriado de la rata
- Evaluar el efecto de la administración subcrónica de simvastatina en contra del daño inducido por MPP+ por medio de la evaluación del área porcentual de la señal TH y la señal GFAP

20. Método

Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho de un peso de entre 280 y 310 g. Con acceso libre a comida y agua, ciclos de luz oscuridad de 12 h., ajenos a la exposición de otros tratamientos. El manejo de los animales se llevó a cabo en base a la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO1999) para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

Procedimiento Quirúrgico

La administración unilateral de MPP+ de 10 mg disueltos en 8 μ L de solución salina (Rubio-Osornio et al. 2015), se realizó en el cuerpo estriado con el uso de las coordenadas estereotaxicas: +0.5 mm anteroposterior, -3.0 mm lateral y -4.5 mm ventral a la dura (Paxinos y Watson, 1998). Previo al procedimiento quirúrgico los animales fueron administrados con una dosis anestésica de Ketamina y Xilacina (80/12 mg/Kg).

Tratamiento Farmacológico

La distribución de los animales y el tratamiento farmacológico correspondió a los siguientes cuatro grupos: control (vehículo v.o./s.s. i.n), control de simvastatina (Sim v.o./s.s. i.n), control de daño de MPP+ (vehículo v.o./ MPP+. i.n) y experimental (simvastatina v.o./MPP+ i.n.) en un esquema de administración oral sub-crónico de 40 mg/kg/día de simvastatina durante siete días o la administración de la solución vehículo (1% de Tween 80, 500 μ L) durante siete días previos a la administración intraestriatal de MPP+ (10 μ g/8 μ L) (Selley, 2005)

Conducta de Giro

La conducta de giro se registró a los 6 días posteriores a la administración de MPP+, las ratas fueron administradas con una dosis sub-cutánea de hidrocloreuro de apomorfina (1 mg/Kg) disuelta en una solución antioxidante de ácido ascórbico y solución salina (1:1 p/v) (Rubio-Osornio et al., 2015); para la evaluación se utilizaron cajas de acrílico de 40x60x10 cm, en las cuales cada animal fue evaluado durante un periodo de 60 min por animal.

Concentración de Catecolaminas por HPLC

El Contenido de DA se evaluó por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado por un detector electroquímico. Siete días posteriores a la cirugía con MPP+. El cuerpo estriado fue disecado, pesado y homogenizado por sonicación en una solución antioxidante de ácido perclórico y metabisulfito de sodio (1M, 0.1%P/V) (1:10 p/v). El homegenizado se centrifugo a 4000 x g durante 15 min. a una temperatura de 4°C, el sobrenadante fue analizado por HPLC (columna Altech 100 x 4.5 mm), acoplado a una

bomba Perkin-Elmer LC-250 y un detector electroquímico Metrohm (Mod 641-VA) con un integrador Hewlett-Packard 3396-II . Las áreas bajo la curva obtenidas fueron evaluadas por interpolación a la curva de calibración construida a partir de estándares específicos de concentración (200, 400, 800,1600, 3200 nM.). Reportando los resultados en µg de DA por mg de tejido húmedo.

Peroxidación Lipídica

El efecto de la simvastatina en la formación de productos lipídicos fluorescentes en el cuerpo estriado fue evaluado 24 h después de la inyección de MPP+. Los tejidos fueron homogenizados en 2.1 ml de solución salina. 1ml del homogenizado se coloca por duplicado en tubos de ensayo cubiertos de la luz, a las cuales se les adiciono a cada una de las muestras 4 mL de una mezcla de cloroformo y metanol (2:1 v/v) tapando los tubos para evitar su evaporación. Posteriormente la mezcla se agita vigorosamente en el vortex durante 10 segundos y se deja reposar por 20 min después fue centrifugada a 2000 rpm durante 10 min, dejando reposar por 30 min a una temperatura de 20°C , permitiendo la separación de fases, aspirando el sobrenadante con ayuda de una bomba de vacío. De la solución restante se toma 1 mL y coloca en una celda de cuarzo para su lectura después de adicionarse 100 µL de metanol y se mezcla por inversión. Finalmente las muestras fueron leídas en un espectrómetro de fluorescencia LS50B Perkin-Elmer a 370 de excitación y a 430 nm de emisión. Previamente la sensibilidad del espectrómetro se ajusta a 140 unidades de fluorescencia con una solución estándar de quinina preparado en una solución de ácido sulfúrico 0.05 M (100 µg/mL). Los resultados fueron expresados como unidades de fluorescencia por µg de tejido

Inmunofluorescencia para TH y GFAP en el cuerpo estriado de la rata.

Después de siete días de la administración de MPP+ los animales fueron anestesiados con una dosis de pentobarbital y realizando una perfusión intracardiaca con 200 ml de solución salina e inmediatamente después con 200 ml de paraformaldehído al 4% posteriormente se extrajeron los cerebros y fueron almacenados en paraformaldehído y refrigerados para su posterior procesamiento. Previo a los cortes los cerebros fueron colocados en una solución búfer de fosfatos y sacarosa al 20% hasta que los tejidos se precipitaran, después se realizó un cambio de solución con sacarosa al 30%, de igual manera esperando a que cada uno de los cerebros se precipitara en la solución. Los cortes coronales se realizaron realizados con un criostato de la sección AP: +1.6 mm a AP -0.48 mm en relación a Bregma, con un espeso de 22 µm visualizando la zona de lesión con la finalidad de realizar una evaluación óptica porcentual para la señal +TH y + GFAP del cuerpo estriado.

Los tejidos fueron lavados PBST 3% (10 min.), después fueron colocados en una solución desensmascaradora de epítopes precalentada a 70°C, durante 1 h. Se realizaron tres lavados

más con PBST 3% (por 10 min cada uno) para posteriormente realizar un bloqueo con BSA (6 mg) y suero de caballo (4 μ L) disueltos en 200 μ L de PBST 3%, después de una hora se añadió el anticuerpo primario de ratón contra TH (1:100) y el anticuerpo primario de conejo contra GFAP dejándolo encubar por una noche. Posteriormente se realizaron tres lavados más con PBST y se encubo el anticuerpo secundario por 2 h, finalmente los tejidos fueron montados en portaobjetos previamente silanizados agregando 3 μ L de solución antioxidante.

Fueron tomados 9 cortes de cada cerebro, dentro de las coordenadas ya mencionadas, fueron fotografiados 6 campos de los cuerpos estriados de los hemisferios lesionados tanto para la señal TH como para GFAP. Las fotografías fueron procesadas como figuras binarias por medio de *Image J software*, evaluando las áreas porcentuales de ambas señales en de cada corte. Los resultados fueron reportados como el promedio del área porcentual de la seña, 1 para cada una de las marcas.

Análisis Estadístico.

Los resultados de la evaluación de conducta de giro, la cuantificación de DA, formación de productos lipídicos fluorescentes y los porcentajes de área de +TH y +GFAP fueron analizados mediante un análisis de varianza, ANOVA de una vía, seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey. Los valores fueron considerados con diferencias estadísticamente significativas a partir de un valor de $P < 0.05$

21. Resultados.

21.1 Efecto de la administración oral sub-crónica de simvastatina frente al daño generado por MPP⁺ en conducta de giro.

La evaluación de la prueba de conducta inducida con apomorfina (1 mg/ Kg) se llevó acabo 6 días después de la lesión intraestriatal de MPP⁺ (10 mg / 8 µL). En donde el análisis estadístico demuestra un aumento significativo ($P < 0.05$) entre el promedio de giros del grupo tratado con MPP⁺ en comparación con el grupo de animales tratados con simvastatina previo a la administración con MPP⁺. Considerando a los grupos con administrados intraestriatal de solución salina como controles (Gráfica 1).

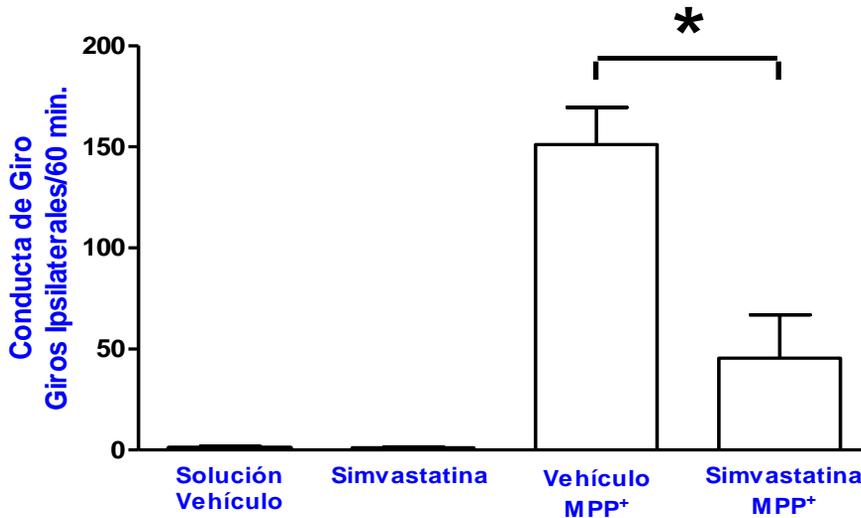


Figura 1. Efecto de la administración oral subcrónica de 40 mg/kg/día de Simvastatina en conducta de giro, inducido, por la administración subcutánea de apomorfina (1mg/kg) 6 días después de la administración intraestriatal de MPP⁺. Los resultados son expresados como media \pm E.S. de 6-8 animales por grupo. Las diferencias entre los grupos en la conducta de giro se considera estadísticamente significativa a partir de una ($P < 0.05$) los datos fueron analizados con una prueba de Kruskal-Wallis seguida por una prueba de U de Mann-Whitney.

21.2 Efecto de la administración oral sub-crónica de simvastatina frente al daño generado por MPP⁺ en la evaluación de las concentración de DA en cuerpo estriado de la rata.

Siete días después de la administración intra estriatal de MPP⁺ los animales fueron sacrificados, los cerebros extraídos y se obtuvo el cuerpo estriado de cada uno de los animales para evaluar la concentración de DA. En donde el análisis estadístico demuestra una disminución significativa ($P < 0.05$) de DA en el grupo tratado con MPP⁺ en comparación los grupos controles y se demostró una permanencia de las concentraciones de DA en el grupo tratado con simvastatina previo a la administración intra estriatal de MPP⁺ (Gráfica 2).

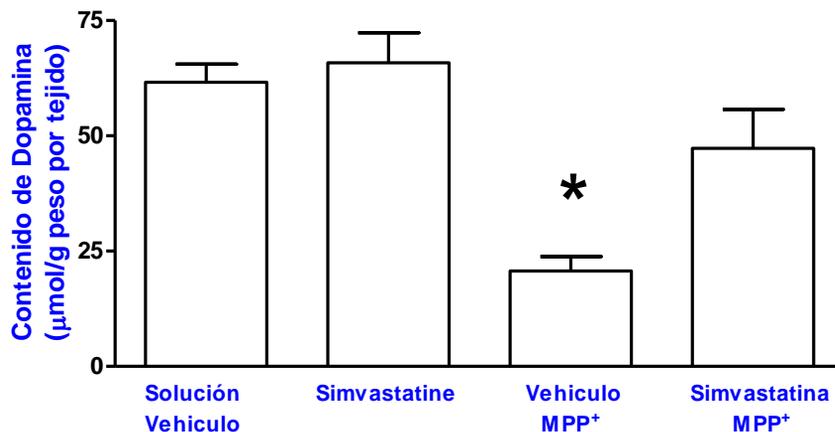


Figura 2. Efecto de la administración oral subcrónica de 40 mg/kg/día de Simvastatina en la evaluación de las concentraciones de DA detectada por HPLC acoplado a un detector electroquímico. Los resultados son expresados como media \pm E.S. de 6-8 animales por grupo. Las diferencias significativas de la concentraciones de DA entre los grupos se considera estadísticamente partir de una * ($P < 0.05$), los datos fueron analizados con una prueba de análisis de varianza ANOVA de una vía seguida por una prueba de comparación múltiple de Tukey.

21.3 Efecto de la administración oral sub-crónica de simvastatina frente al daño generado por MPP+ en la formación de productos lipídicos fluorescentes en cuerpo estriado de la rata.

Siete días después de la administración intra estriatal de MPP+ los animales fueron sacrificados, los cerebros extraídos y se obtuvo el cuerpo estriado de cada uno de los animales para evaluar la concentración de productos lipídicos fluorescentes. El análisis estadístico demuestra un aumento significativa ($P < 0.05$) en la concentración de productos lipídicos fluorescentes en el grupo tratado únicamente con MPP+ en comparación del grupo tratado con simvastatina previo al daño generado con MPP+. Se han considerado a los grupos con administrados intraestriatal de solución salina como controles (Gráfica 3).

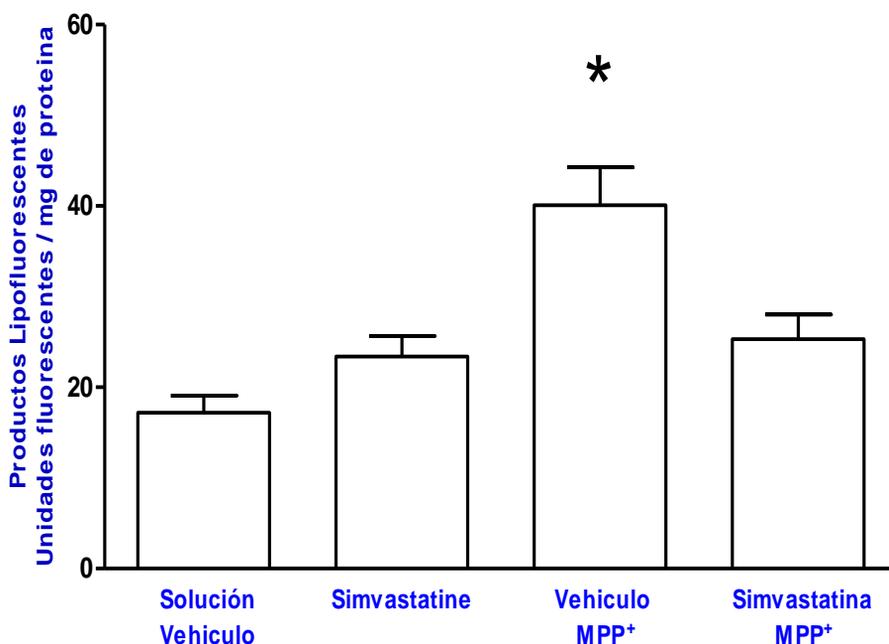
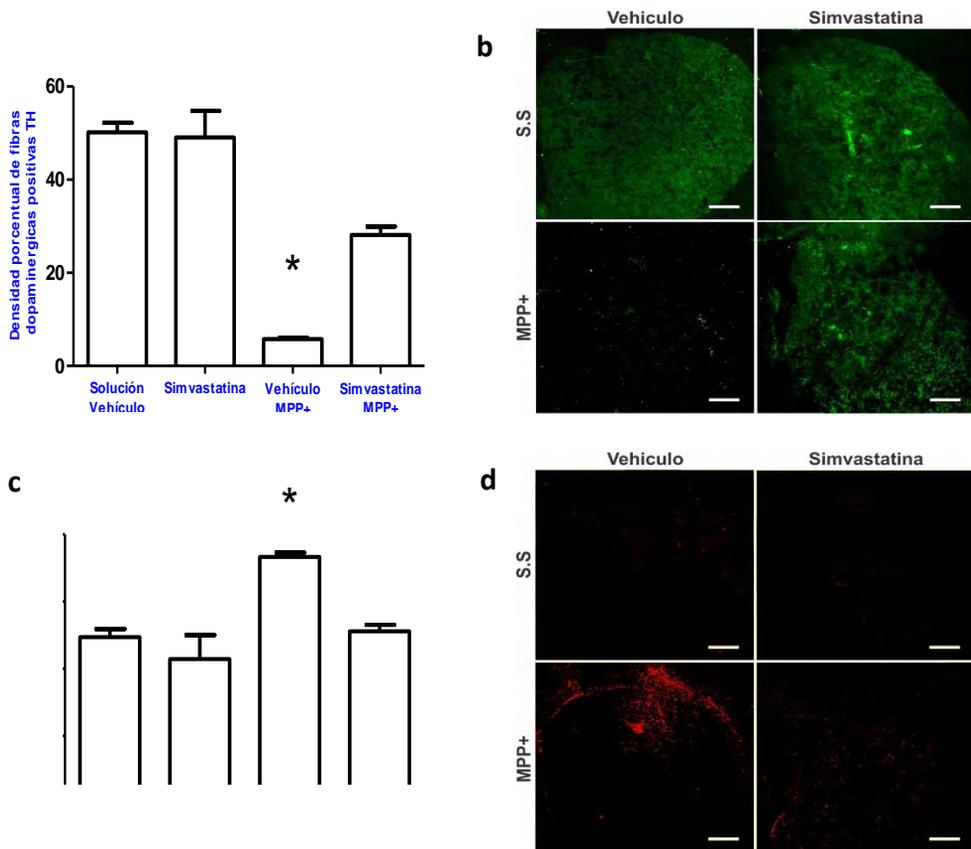


Figura 3. Efecto de la administración oral subcrónica de 40 mg/kg/día de Simvastatina en la evaluación de las concentraciones de productos lipídicos fluorescentes por medio de espectrómetro de luminiscencia. Los resultados son reportados como unidades fluorescentes por mg de proteína como media \pm E.S. de 6-8 animales por grupo. Las diferencias significativas entre los grupos se considera estadísticamente partir de una ($P < 0.05$), los datos fueron analizados con una prueba de Kruskal-Wallis seguida por una prueba de Tukey.

21.4 Efecto de la administración oral sub-crónica de simvastatina frente al daño generado por MPP+ en ensayo de inmunofluorescencia +TH y +GFAP en cuerpo estriado de la rata.

Siete días después de la administración intra estriatal de MPP+ los animales fueron administrados con una dosis anestésica de pentobarbital, para ser perfundidos, se extrajeron los cerebro que posteriormente fueron procesados por una técnica de inmunofluorescencia para la evaluación de las señales +TH y +GFAP. El análisis estadístico muestra una permanencia significativa ($P < 0.05$) de la señal +TH del grupo tratado con simvastatina previamente a el daño generado por la administración de MPP+ en comparación con el grupo tratado únicamente con MPP+. Por otra parte la señal +GFAP presenta un aumento significativo en el grupo de animales tratados únicamente con MPP+ en comparación con el grupo tratado previamente con simvastatina. Considerando el porcentaje del área de la señal de los grupos administrados con solución salina, intraestriatal como controles.



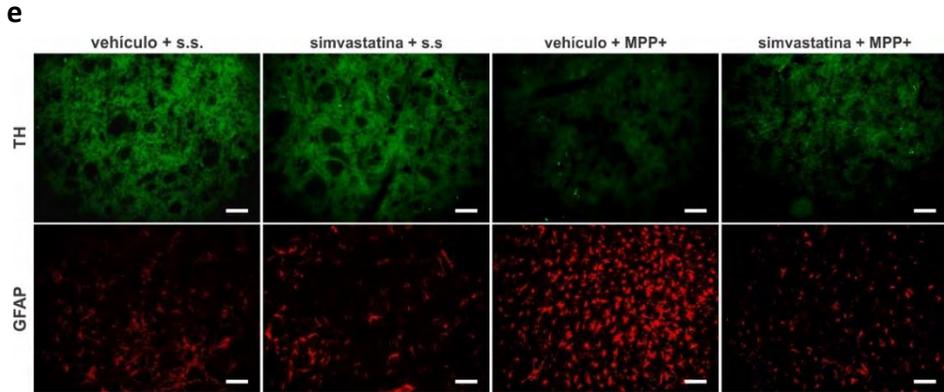


Figura 4. Efecto de la administración oral subcrónica de 40 mg/kg/día de Simvastatina. **a,b)** Los resultados son reportados como la densidad porcentual de la señal positiva a TH (verde) en el cuerpo estriado siete días después de la lesión generada por la inyección intra estriatal. **c,d)** Densidad porcentual de la señal inmunofluorescente para GFAP (rojo) en el cuerpo estriado siete días después de la lesión generada por la inyección intra estriatal. **b,d)** bar= 400µm; **e)** bar= 100µm. Los resultados son reportados como porcentaje de la señal inmunofluorescente tanto de TH como de GFAP con 8 campos tomados de manera aleatoria del cuerpo estriado, de 9 cortes por unidad experimental. Las diferencias significativas entre los grupos se considera estadísticamente partir de una ($P < 0.05$), los datos fueron analizados con una prueba de Kruskal-Wallis seguida por una prueba de Tukey.

22. Discusión.

En la actualidad el tratamiento de la EP consta en disminuir la sintomatología a partir de la administración oral de L-DOPA, como precursor metabólico dopaminérgico restableciendo los niveles del neurotransmisor. Sin embargo este tratamiento no presenta ningún efecto neuroprotector frente a la progresión de la enfermedad. Por otro lado la administración intra estriatal de MPP+ (10 µg/8 µL) genera un modelo hemiparkinsonico caracterizado por una serie de alteraciones conductuales, bioquímicas y morfológicas similares a la EP. La lesión generada por la administración i.e. de MPP+ nos permite utilizar el modelo para la evaluación de la efectividad de diferentes fármacos y su respuesta para contrarrestar el efecto neurotóxico.

Se ha demostrado que administración de estatinas, genera un efecto neuroprotector, frente a la administración intraestriatal de MPP+. El efecto inhibitor de la hidroximetilglutaril Co-A reductasa por la administración de la estatina, reduce las concentraciones de moléculas isoprenoides, implicadas en la regulación de vías de relacionadas con la formación de radicales libres y la generación de un estrés oxidante. Sin embargo este efecto neuroprotector no se tiene elucidado por completo.

Cabe mencionar que después de la administración intra estriatal de MPP+, se produce una pérdida progresiva de las terminales dopaminérgicas, la disminución en las concentraciones de DA y el aumento en la densidad de receptores dopaminérgicos, generando un fenómeno de hipersensibilidad por denervación, o “up-regulación” evidenciado por una prueba de conducta rotatoria (giros ipsilateral), producida por la administración subcutánea de apomorfina (1mg/kg), (Adriana, 2010; Rubio-Osornio et al, 2015).

Se demostró que la lesión producida con MPP+ genera un aumento significativo, en el número de giros en la prueba conductual en comparación con el grupo control (Grafica 1), este resultado se correlaciona con el ensayo histológico en la cual se evidencia una pérdida significativa de la señal +TH en el cuerpo estriado en comparación con grupo de animales administrados previamente con el tratamiento de simvastatina (Grafica 3).

Estos resultados comparten una similitud con el trabajo de Yan et al. (2011) demostraron la efectividad de simvastatina (10 mg/kg/día) a partir de un modelo de EP en base a la administración de 6OHDA, a partir de la hipótesis que la denervación estriatal dopaminérgica es generada por un incremento concentraciones de glutamato y una disminución en la densidad de receptores NMDA los cuales, se ha evidenciado que la regulación de receptores NMDA está directamente correlacionada con mediadores

inflamatorios. Por otra parte Xu et al. (2013) Demostraron que la simvastatina reduce la muerte neuronal y las células en apoptosis, también demostraron restablece la señal +TH y DA en células PC12 encubada con 6OHDA correlacionándose con la disminución de citosinas proinflamatorias, demostrando en estudios previos que el uso de la simvastatina regula la expresión de receptores NMDA.

Reportes recientes mencionan un efecto similar a nuestros resultados por la administración de lovastatina (5 mg/kg i.p.) frente al daño producido por la administración intra estriatal de MPP+ (15 mg /8 µL), disminuyendo hasta en un 40% el número de giros en la prueba conductual producida por la administración de apomorfina, además de promover la permanencia en las concentraciones de DA y disminuyendo la formación de peróxidos lipídicos generados por la administración de la toxina en comparación el grupo de animales tratados únicamente con el MPP+ (Aguirre-Vidal et al.,2015). La pérdida de proyecciones estriatales dopaminérgicas, la pérdida de catecolaminas y el aumento de la peroxidación lipídica se correlaciona con la toxicidad producida por algunas citocinas y la activación de la microglía, mecanismos que desencadenaría en un proceso de neuroinflamación. Se acepta que la inflamación tiene un papel importante en la patogénesis de las enfermedades cerebrales, es considerado un objetivo farmacológico relevante, en el cual las estatinas pueden tener efecto modulador pertinente para el tratamiento de las afecciones neuroinflamatorias.

Diversos estudios han demostrado la importancia del efecto terapéutico de la reducción de la expresión de citocinas de las cuales destaca la participación de TNF- α , como promotor de la actividad glial, por lo tanto se ha argumentado que la disminución de la de concentración de esta citocina se encuentra relacionada con la disminución de la progresión del daño neuroinflamatorio (Harms et al., 2011; McCoy et al., 2009). De acuerdo a Santiago et al. (2009), la simvastatina podría ejercer su acción neuroprotectora a partir de un efecto antiinflamatorio, demostrando en un modelo de i.n LPS que conduce a la activación directa de la microglía. La actividad de las estatinas frente a la progresión del daño generado por aumento de las concentraciones de TNF- α se encuentra sustentado por Kalonia et al. 2010, demostrando en un modelo comparativo el efecto de diferentes estatinas previo a una lesión de ácido quinolinico, demostró una disminución significativa de en los niveles de TNF- α en el grupo del animales tratados con simvastatina (30 mg/kg) indicando un efecto antiinflamatorio.

Hemos demostrado que la inyección intra estriatal de MPP+ (10 µg/8 µL), produce un aumento en la activación de la microglía/astrocitos, reflejada por la señal positiva para GFAP. Nuestro estudio demuestra que la simvastatina normaliza tanto la actividad de astrología como formación de productos lipofluorescentes. En este trabajo describimos un

efecto similar de la simvastatina frente a daño producido por la administración de LPS (Santiago et al., 2009) los cuales destacan importancia de la activación de la microglía resulta en la producción de ERO como anión superóxido que media la neurotoxicidad mediante procesos inflamatorios, relacionándose con la pérdida de células dopaminérgicas.

Sin embargo, sin dejar tomar en cuenta que el principal efecto neurotóxico del MPP+ que resulta de la disfunción mitocondrial generada por la neurotóxica, nuestros resultados difieren a los de algunos equipos como por lo reportado por Santiago et al. 2009 quien reporta no encontrar ningún efecto de la simvastatina frente al daño generado por el MPP+.

Por otro lado, los resultados del presente estudio re encuentran ampliamente relacionados con estudios clínicos como los de Wolozin et al. (2007) que demuestra que las estatinas tienen un fuerte efecto en la reducción de incidencia de demencias y reducción en la presencia de casos de pacientes con EP, demostrando que la simvastatina tiene un mayor efecto benéfico en ambos parámetros aun por encima de otras estatinas como la pravastatina o lovastatina.

Uno de los factores por los cuales se contribuye una mayor eficacia de la simvastatina comparada con otras estatinas es su facilidad para penetrar la barrera hematoencefálica. La simvastatina se caracteriza por tener una fuerte eficacia y una permeabilidad intermedia comparada con otras estatinas con un orden de permeabilidad comenzando con la lovastatina seguida por la simvastatina y finalizando con la atorvastatina; esta característica le confiere una mayor eficacia que estatinas como la atorvastatina la cual tiene un fuerte efecto antiinflamatorio pero no reducida capacidad de penetrar la barrera hematoencefálica, reduciendo su eficacia en la prevención de enfermedades neurodegenerativas. (Wolozin et al., 2007)

El estudio de las estatinas brindar las bases de un tratamiento alternativo para enfermedades neurodegenerativas como la EP abriendo nuevas perspectivas para la familia de estos fármacos sin embargo se requiere de una mayor cantidad de estudios para elucidar su actividad neuroprotectora.

23. Conclusiones.

En el presente trabajo se observó que el pretratamiento en un esquema de administración oral sub-crónico de 40 mg/kg/día de simvastatina durante siete días. Disminuye significativamente el número de giros por hora en la prueba de conducta.

Esta evaluación se correlaciona con las concentraciones de DA en el cuerpo estriado de los animales que tuvieron el pretratamiento de 40 mg/kg/día de simvastatina previo a la lesión generada por la administración intrastriatal de MPP+ reflejando una preservación en las concentraciones de DA en comparación con el grupo tratado únicamente con la neurotóxica.

La preservación de las concentraciones de DA, se atribuye a una neuroprotección generada por el pretratamiento de simvastatina, reflejado en una disminución significativa de la generación de productos lipídicos fluorescentes, previo a la lesión producida por la administración intrastriatal de MPP+.

Esta neuroprotección también se ve reflejada en la comparación del porcentaje de área promedio de señal +TH entre el grupo administrado con simvastatina previamente a la lesión con MPP+ y el grupo de animales únicamente lesionados con la neurotóxica.

Por otra parte el porcentaje de área de la señal +GFAP refleja una disminución del daño producido por la lesión de la neurotóxica en el grupo de animales con el pretratamiento de simvastatina en comparación con los animales tratados únicamente con la neurotóxica.

24. Referencias.

- Alarcón, A. Adriana, A. A., del Ángel, A. S., & Fainstein, M. K. (2010). Modelos neurotóxicos de la enfermedad de Parkinson y disfunción mitocondrial. *Revista de Educación Bioquímica*, 29(3), 92–100.
- Aguirre-Vidal, Y., Montes, S., Tristan-López, L., Anaya-Ramos, L., Teiber, J., Ríos, C., Monroy-Noyola, A. (2015). The neuroprotective effect of lovastatin on MPP+-induced neurotoxicity is not mediated by PON2. *NeuroToxicology*, 48,166–170.
- Alvarez González Eduardo, Alvarez González Lázaro, Macías González Raúl, Pavón Fuentes Nancy Conceptos actuales sobre la función de los ganglios basales y el papel del núcleo subtalámico (NST) en trastornos del movimiento *Rev Mex Neuroci* 2001; 2(2) 77-85
- Angoa Pérez, & M. Rivas Arancibia, S. (2007). Estrés oxidativo y neurodegeneración: ¿causa o consecuencia? *Arch Neurocién (Mex)* 12(1) 45-54.
- Aquilano, K., Baldelli, S., & Ciriolo, M. R. (2014). Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Frontiers in Pharmacology*. doi.org/10.3389/fphar.2014.00196
- Avila-Luna, A., & Bueno-Nava, A. (2014). Los ganglios basales: la participación dopaminérgica estriatal. *Investigación en Discapacidad*, 3(1), 19–24.
- Ayton, S., & Lei, P. (2014). Nigral iron elevation is an invariable feature of Parkinson's disease and is a sufficient cause of neurodegeneration. *BioMed Research International*, 2014, 581256. <https://doi.org/10.1155/2014/581256>
- Bahena-Trujillo, R., Flores, G., & Arias-Montaño, J. A. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Revista Biomedica*, 11(1), 39–60.
- Bar-On, P., Crews, L., Koob, A. O., Mizuno, H., Adame, A., Spencer, B., & Masliah, E. (2008). Statins reduce neuronal alpha-synuclein aggregation in in vitro models of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 105(5), 1656–1667.

- Bazzu, G., Calia, G., Puggioni, G., Spissu, Y., Rocchitta, G., Debetto, P. Miele, E. (2010). alpha-Synuclein- and MPTP-generated rodent models of Parkinson's disease and the study of extracellular striatal dopamine dynamics: a microdialysis approach. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 9(4), 482–490.
- Blandini, F., Nappi, G., Tassorelli, C., & Martignoni, E. (2000). Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 62(1), 63–88.
- Blaylock, R.(2017). Parkinson's disease: Microglial/macrophage-induced immunoexcitotoxicity as a central mechanism of neurodegeneration. *Surgical Neurology International*, 8(1), 65. https://doi.org/10.4103/sni.sni_441_16
- Brocks, D.R. (1999). Anticholinergic drugs used in Parkinson's disease: An overlooked class of drugs from a pharmacokinetic perspective. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 2 (2):39-4
- Burns, R. S., Chiueh, C. C., Markey, S. P., Ebert, M. H., Jacobowitz, D. M., & Kopin, I. J. (1983). A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(14), 4546-4550.
- Chávez-León, E., Ontiveros-Uribe, M. P., & Carrillo-Ruiz, J. D. (2013). La enfermedad de Parkinson: neurología para psiquiatras. *Salud mental*, 36(4), 315–324.
- Chegwin-Angarita, C., Nieto-Ramírez, I. J., Atehortúa, L., & A, L. J. S. (2012). Las estatinas: Actividad biológica y producción biotecnológica. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 157–178.
- Dolga, A. M., Culmsee, C., de Lau, L., Winter, Y., Oertel, W. H., Luiten, P. G. M., & Eisel, U. L. M. (2011). Statins--increasing or reducing the risk of Parkinson's disease? *ExperimentalNeurology*, 228(1), 14. doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.11.013
- Drechsel, D. A., & Patel, M. (2008). Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 44(11), 1873–1886.

- Eger, G. A., Ferreira, V. V., Batista, C. R., Bonde, H., de Lima, D. D., Wyse, A. T. S., da Cruz, J. G. P. (2016). Antioxidant effect of simvastatin through oxidative imbalance caused by lisdexamfetamine dimesylate. *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias*, 88(1), 335–348.
- Escamilla S.F., & Mínguez C. A. (2012). Recomendaciones de Práctica Clínica en la enfermedad de parkinson Edit. Glosa, S.L. 21-75. Recuperado a partir de www.fedesparkinson.org/newsfep/news/20120302/guia_parkinson.pdf
- Flood, P. M., Qian, L., Peterson, L. J., Zhang, F., Shi, J.-S., Gao, H.-M., & Hong, J.-S. (2011). Transcriptional Factor NF- κ B as a Target for Therapy in Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease*, 2011, 1–8. <https://doi.org/10.4061/2011/216298>
- Fridman O., Fuchs A., Porcile R., Morales A., Gariglio L. (2011). Paraoxonasa: sus múltiples funciones y regulación farmacológica. *Arch Cardiol Mex* 2011;81(3):251-260
- García-Sabina, A., Gulín-Dávila, J., Sempere-Serrano, P., González-Juanatey, C., & Martínez-Pacheco, R. (2012). [Specific considerations on the prescription and therapeutic interchange of statins]. *Farmacia Hospitalaria: Organo Oficial De Expresion Cientifica De La Sociedad Espanola De Farmacia Hospitalaria*, 36(2), 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.farma.2011.02.010>
- Gerlach, M., Ben-Shachar, D., Riederer, P., & Youdim, M. B. H. (1994). Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *Journal of neurochemistry*, 63(3), 793–807.
- Gómez, R., Hudson, L., & Venegas, P. (2011). Trastornos autonómicos en enfermedad de Parkinson. *Revista médica de Chile*, 139 (1), 100–106.
- Gómez-Chavarín, M., Roldan-Roldan, G., Morales-Espinosa, R., Pérez-Soto, G., & Torner-Aguilar, C. (2012). Mecanismos fisiopatológicos involucrados en la enfermedad de Parkinson. *Arch Neurocién (Mex)*, 17(1), 25–33.
- Góngora Alfaro J. (1990). Mecanismos de acción de la dopamina y sus análogos farmacológicos en el control de la actividad motora regulada por los ganglios basales. *Rev Biomed*, Vol 1, No 2 66-91

- Harms, A. S., Barnum, C. J., Ruhn, K. A., Varghese, S., Treviño, I., Blesch, A., & Tansey, M. G. (2011). Delayed dominant-negative TNF gene therapy halts progressive loss of nigral dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 19(1), 46–52. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.217>
- Kalonia, H., Kumar, P., & Kumar, A. (2011). Comparative neuroprotective profile of statins in quinolinic acid induced neurotoxicity in rats. *Behavioural Brain Research*, 216(1), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.07.040>
- Kempuraj, D., Thangavel, R., Selvakumar, G. P., Zaheer, S., Ahmed, M. E., Raikwar, S. P., Zaheer, A. (2017). Brain and Peripheral Atypical Inflammatory Mediators Potentiate Neuroinflammation and Neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00216>
- Kirkley, K. S., Popichak, K. A., Afzali, M. F., Legare, M. E., & Tjalkens, R. B. (2017). Microglia amplify inflammatory activation of astrocytes in manganese neurotoxicity. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0871-0>
- Koob, A. O., Ubhi, K., Paulsson, J. F., Kelly, J., Rockenstein, E., Mante, M., Masliah, E. (2010). Lovastatin ameliorates α -synuclein accumulation and oxidation in transgenic mouse models of α -synucleinopathies. *Experimental neurology*, 221(2), 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.11.015>
- Kulisevsky, J., Luquin, M. R., Arbelo, J. M., Burguera, J. A., Carrillo, F., Castro, A., Yañez, R. (2013). Enfermedad de Parkinson avanzada. Características clínicas y tratamiento (parte I). *Neurología*, 28(8), 503–521. doi.org/10.1016/j.nrl.2013.05.001
- Labandeira-Garcia, J. L., Rodríguez-Perez, A. I., Garrido-Gil, P., Rodríguez-Pallares, J., Lanciego, J. L., & Guerra, M. J. (2017). Brain Renin-Angiotensin System and Microglial Polarization: Implications for Aging and Neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, 129. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00129>
- Lin, A. M.-Y., & Ho, L.-T. (2000). Melatonin suppresses iron-induced neurodegeneration in rat brain. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(6), 904–911.

- López, S. (2008). Estrés oxidante, metabolitos oxidados de dopamina y enfermedad de Parkinson. *Rev Fac Med UNAM*, 51(3).
- Martínez, C. D., Vargas, C. R., & Arancibia, S. R. (2003). Estrés oxidante y neurodegeneración. *Rev. la Fac. Med*, 46(6), 229–235.
- McBride, S. D., & Parker, M. O. (2015). The disrupted basal ganglia and behavioural control: An integrative cross-domain perspective of spontaneous stereotypy. *Behavioural Brain Research*, 276, 45–58. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.05.057>
- McCoy, M. K., Ruhn, K. A., Martínez, T. N., McAlpine, F. E., Blesch, A., & Tansey, M. G. (2008). Intranigral Lentiviral Delivery of Dominant-negative TNF Attenuates Neurodegeneration and Behavioral Deficits in Hemiparkinsonian rats. *Molecular Therapy*, 16(9), 1572–1579. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.146>
- Mosley, R. L., Hutter-Saunders, J. A., Stone, D. K., & Gendelman, H. E. (2012). Inflammation and adaptive immunity in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(1), a009381.
- Ng C.J., Wadleigh D.J., Gangopadhyay A., Hama S., Grijalva V.R., Navab M. (2001). Paraoxonase- 2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem*; 276:44444–9.
- Nicotra, A., & Parvez, S. (2002). Apoptotic molecules and MPTP-induced cell death. *Neurotoxicology and Teratology*, 24(5), 599–605.
- Obregón, O., Gestne, A., Lares, M., Castro, J., Stulin, I., Martínez, J., ... Aponte, A. (2011). Efectos tempranos de las estatinas: inflamación y oxidación. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 23(6), 269–274.
- Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th. New York, NY, USA: Academic Press; 1998Pérez, M. A., & Arancibia, S. R. (2007). Estrés oxidante y neurodegeneración: ¿ causa o consecuencia. *Arch Neurocién (Mex)*, 12(1), 45–54.
- Pomilio, A. B., Vitale, M. G., Ciprian Ollivier, J. O., & Vitale, A. A. (2016). Implicancias clínicas de metiltransferasas de moléculas pequeñas. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 50(1), 77–98.

- Rodríguez-Violante, M., Villar Velarde, A., Valencia Ramos, C., & Cervantes Arriaga, A. (2011). Características epidemiológicas de pacientes con enfermedad de Parkinson de un hospital de referencia en México. *Arch Neurocién (Mex)*, 16(2), 64–68.
- Rolinski, M., Griffanti, L., Szewczyk-Krolkowski, K., Menke, R. A. L., Wilcock, G. K., Filippini, N., Mackay, C. E. (2015). Aberrant functional connectivity within the basal ganglia of patients with Parkinson’s disease. *NeuroImage: Clinical*, 8, 126–132.
- Rosner, S., Giladi, N., & Orr-Urtreger, A. (2008). Advances in the genetics of Parkinson’s disease. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(1), 21–34. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00731.x>
- Rubio-Osornio, M., Gorostieta-Salas, E., Montes, S., Pérez-Severiano, F., Rubio, C., Gómez, C., Guevara, J. (2015). Epicatechin Reduces Striatal MPP⁺-Induced Damage in Rats through Slight Increases in SOD-Cu,Zn Activity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 276039. <https://doi.org/10.1155/2015/276039>
- Rueda-Acevedo, M., Bastidas Benavides, J. L., & Bareño Silva, J. (2014). Effectiveness of deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in patients with Parkinson’s disease: experience in Antioquia. *Acta Neurológica Colombiana*, 30(3), 143–148.
- Santiago, M., Hernández-Romero, M. C., Machado, A., & Cano, J. (2009). Zocor Forte (simvastatin) has a neuroprotective effect against LPS striatal dopaminergic terminals injury, whereas against MPP⁺ does not. *European Journal of Pharmacology*, 609(1), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.03.026>
- Schachter, E. N., Zuskin, E., Rienzi, N., Goswami, S., Castranova, V., Siegel, P., Chung, E. (2004). Pharmacological studies of the effect of wheat grain extract. *Respiration; International Review of Thoracic Diseases*, 71(3), 276–283. <https://doi.org/10.1159/000077426>
- Schachter, M. (2005). Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 19(1), 117–125.

- Selley, M. L. (2005). Simvastatin prevents 1 methyl 4 phenyl 1,2,3,6 tetrahydropyridine induced striatal dopamine depletion and protein tyrosine nitration in mice. *Brain Research*, 1037(1–2), 1–6 ://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.02.083
- Shadrina, M. I., Slominsky, P. A., & Limborska, S. A. (2010). Molecular mechanisms of pathogenesis of Parkinson’s disease. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 281, 229–266. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(10\)81006-8](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(10)81006-8)
- Stowe, R. L., Ives, N. J., Clarke, C., van Hilten, J., Ferreira, J., Hawker, R. J., Gray, R. (2008). Dopamine agonist therapy in early Parkinson’s disease. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2), CD006564. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006564.pub2>
- Szewczyk-Krolikowski, K., Menke, R. A., Rolinski, M., Duff, E., Salimi-Khorshidi, G., Filippini, N., Mackay, C. E. (2014). Functional connectivity in the basal ganglia network differentiates PD patients from controls. *Neurology*, 83(3), 208–214.
- Thouennon, E., Cheng, Y., Falahatian, V., Cawley, N. X., & Loh, Y. P. (2015). Rosiglitazone-activated PPAR γ induces neurotrophic factor- α 1 transcription contributing to neuroprotection. *Journal of Neurochemistry*, 134(3), 463–470. <https://doi.org/10.1111/jnc.13152>
- Tiwari, P. C., & Pal, R. (2017). The potential role of neuroinflammation and transcription factors in Parkinson disease. *Dialogues in clinical neuroscience*, 19(1), 71.
- Van Den Eeden, S. K. (2003). Incidence of Parkinson’s Disease: Variation by Age, Gender, and Race/Ethnicity. *American Journal of Epidemiology*, 157(>11), 1015–1022. <https://doi.org/10.1093/aje/kwg068>
- van der Most, P. J., Dolga, A. M., Nijholt, I. M., Luiten, P. G. M., & Eisel, U. L. M. (2009). Statins: Mechanisms of neuroprotection. *Progress in Neurobiology*, 88(1), 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.02.002>
- Wang, Q., Yan, J., Chen, X., Li, J., Yang, Y., Weng, J., Yenari, M. A. (2011). Statins: multiple neuroprotective mechanisms in neurodegenerative diseases. *Experimental Neurology*, 230(1), 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.04.006>

- Wang, T., Cao, X.-B., Chen, X.-W., Huang, P.-P., Zhang, T., Chen, Z.-B., & Tang, B.-S. (2015). Influence of simvastatin on dopaminergic neurons of lipopolysaccharide-induced rat model of Parkinson's disease. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(1), 64–67. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60189-9](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60189-9)
- Watanabe, Y., Himeda, T., & Araki, T. (2005). Mechanisms of MPTP toxicity and their implications for therapy of Parkinson's disease. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 11(1), RA17-23.
- Wolozin, B., Wang, S. W., Li, N.-C., Lee, A., Lee, T. A., & Kazis, L. E. (2007). Simvastatin is associated with a reduced incidence of dementia and Parkinson's disease. *BMC Medicine*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/1741-7015-5-20>
- Xia, R. (2011). Physiological and biomechanical analyses of rigidity in Parkinson's disease. En *Etiology and Pathophysiology of Parkinson's Disease*. InTech. <https://doi.org/10.5772/17849>
- Yan, J., Xu, Y., Zhu, C., Zhang, L., Wu, A., Yang, Y., Wang, Q. (2011). Simvastatin Prevents Dopaminergic Neurodegeneration in Experimental Parkinsonian Models: The Association with Anti-Inflammatory Responses. *PLoS ONE*, 6(6).
- Xu YQ, Long L, Yan JQ, Wei L, Pan MQ, Gao HM, Zhou P, Liu M, Zhu CS, Tang BS, Wang Q (2013c) Simvastatin induces neuroprotection in 6-OHDA-lesioned PC12 via the PI3 K/AKT/caspase 3 pathway and anti-inflammatory responses. *CNS Neurosci Ther* 19:170–177