



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA  
SILIBINA POR LAS VÍAS DE ADMINISTRACIÓN ORAL E  
INTRANASAL EN UN MODELO MURINO DE ENFERMEDAD  
DE PARKINSON**

**TESIS**

**QUE PRESENTA:**

Ricardo Jair Ramírez Carreto

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

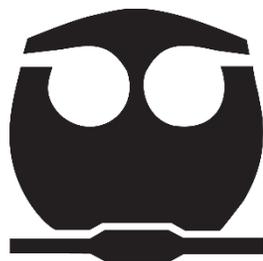
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**DIRECTOR DE TESIS**

Dra. Anahí Chavarría Krauser

RECEPCIONAL ESCRITO

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2021**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARIO ADÁN MORENO EUTIMIO

VOCAL: RUTH IVONNE TÉLLEZ BALLESTEROS

SECRETARIO: ANAHÍ CHAVARRÍA KRAUSER

1ER. SUPLENTE: ISMAEL MANCILLA HERRERA

2DO SUPLENTE: ALBERTO HERNÁNDEZ LEÓN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE NEUROINMUNOLOGÍA, UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN MEDICINA EXPERIMENTAL DE LA FACULTAD DE MEDICINA CON SEDE EN EL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO "DR. EDUARDO LICEAGA", UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:  
DRA. ANAHÍ CHAVARRÍA KRAUSER

---

SUSTENTANTE:  
RICARDO JAIR RAMÍREZ CARRETO

---

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en especial a la Facultad de Química (FQ), por ser la base de mi futuro, por permitirme formar parte de sus instalaciones y su matrícula con todas las oportunidades y facilidades que brindaron para mi formación profesional, académica y personal.

A la Dirección General de Orientación y Atención Educativa (DGOAE) y el Programa de Vinculación con los Egresados de la UNAM (PVEU) por la beca otorgada "Becas de Titulación del Programa de Vinculación con los Egresados de la UNAM Egresados Extemporáneos 2019-2020" con Folio 16042.

A las COMISIONES DE INVESTIGACIÓN Y BIOÉTICA de la División de Investigación de la Facultad de Medicina, UNAM por la revisión y aprobación del proyecto FM/DI/127/2018 con número de registro CICUAL 001-CIC-2019 para el desarrollo del presente trabajo bajo los estándares de calidad y bioética correspondientes.

A la Unidad de Investigación en Medicina Experimental (UIME) de la Facultad de Medicina de la UNAM, así como al Laboratorio de Neuroinmunología por recibirme en sus instalaciones para la planeación, ejecución y conclusión de este proyecto.

A la Dra. Anahí Chavarría Krauser por su dirección, comentarios, observaciones, enseñanzas y oportunidades que enriquecieron mi formación profesional y este proyecto. Por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y sembrar en mí el interés en la Neuroinmunología.

A la Dra. Esperanza García †, por sus enseñanzas, apoyo y colaboración con nuestro proyecto hasta el último momento de su vida, QEPD.

A mis sinodales y revisores de tesis el Dr. Mario Adán Moreno Eutimio y la Dra. Ruth Ivonne Téllez Ballesteros por su interés y entera disposición para la lectura, revisión y corrección para la mejora de esta tesis.

A todos mis amigos y compañeros de la FQ y del Laboratorio de Neuroinmunología por todo su apoyo, ánimo, consejos, tiempo, cariño y enseñanzas para hacer más amenos mis días y ayudarme a lograr mis objetivos y metas.

A toda mi familia por brindarme su comprensión, cariño, ánimos, consejos y fuerza para lograr mis metas.

A mis papás Ricardo Ramírez Ramírez y Cristina Carreto Almaraz, así como a mi hermano Christian Daniel Ramírez Carreto por todo su amor, por comprenderme y apoyarme en todo momento, por confiar en mí y en mis decisiones.

A mí, por nunca rendirme y seguir adelante en cada momento; por los desvelos, el estrés y los problemas que superé sin importar el grado de dificultad y por la entrega para lograr mi sueño de ser Químico Farmacéutico Biólogo.

*"El que no sabe lo que busca, no comprenderá lo que encuentra"*  
- Claude Bernard

## Abreviaturas y Acrónimos

<b>%Cruce</b>	<i>Porcentaje de Cruce en CR</i>	<b>L-DOPA/ Levodopa</b>	<i>Ácido (2S)-2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil)-propanoico</i>
<b>%Escape</b>	<i>Porcentaje de Escape en RT</i>	<b>LID*</b>	<i>Discinesia Inducida por Levodopa</i>
<b>%Tracción</b>	<i>Porcentaje de Tracción en RT</i>	<b>LP</b>	<i>Lipoperóxidos</i>
<b>2,3-DHS</b>	<i>2,3-Dehidrosilibina</i>	<b>M</b>	<i>Grupos control con MPTP</i>
<b>6-OHDA</b>	<i>6-Hidroxidopamina</i>	<b>MAO-A, B</b>	<i>Mono Amino Oxidasa Isoformas A y B</i>
<b>AADC*</b>	<i>Descarboxilasa de Aminoácidos Aromáticos</i>	<b>MDA</b>	<i>Malondialdehido</i>
<b>ADME</b>	<i>Absorción, Distribución, Metabolismo y Eliminación de Fármacos</i>	<b>MPDP+*</b>	<i>1-metil-4-fenil-dihidropiridinio</i>
<b>Ag</b>	<i>Plata</i>	<b>MPP+*</b>	<i>1-metil-4-fenilpiridinio</i>
<b>AgCl</b>	<i>Cloruro de Plata</i>	<b>MPTP*</b>	<i>1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina</i>
<b>ANOVA*</b>	<i>Análisis de Varianza</i>	<b>MS</b>	<i>Grupos con MPTP y Tratamiento de Silibina</i>
<b>ATP</b>	<i>Adenosina Trifosfato</i>	<b>MTT*</b>	<i>Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolio</i>
<b>BDNF*</b>	<i>Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro</i>	<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	<i>Fosfato Dibásico de Sodio</i>
<b>BHE</b>	<i>Barrera Hemato Encefálica</i>	<b>Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	<i>Metabisulfito de Sodio</i>
<b>C</b>	<i>Grupos de Control de Vehículos</i>	<b>NaCl</b>	<i>Cloruro de Sodio</i>
<b>c/12h</b>	<i>Cada 12 Horas</i>	<b>NAD</b>	<i>Nicotina Adenina Dinucleótido</i>
<b>c/8h</b>	<i>Cada 8 Horas</i>	<b>NADH</b>	<i>Nicotina Adenina Dinucleótido Reducido</i>
<b>CE</b>	<i>Cuerpo Estriado</i>	<b>NMDA</b>	<i>N-Metil-D-Aspartato</i>
<b>CMF</b>	<i>Coordinación Motora Fina</i>	<b>OCT3*</b>	<i>Transportador 3 de Cationes Orgánicos</i>
<b>CMG</b>	<i>Coordinación Motora Gruesa</i>	<b>PBS*</b>	<i>Solución Amortiguadora de Fosfatos</i>
<b>CMO</b>	<i>Coordinación Motora Orofacial</i>	<b>pH</b>	<i>Potencial de Hidrógeno</i>
<b>CN</b>	<i>Prueba de Construcción de Nido</i>	<b>PQ</b>	<i>Paraquat/ 1,1-Dimetil-4,4-Dipiridinio</i>
<b>CO</b>	<i>Monóxido de Carbono</i>	<b>ROT</b>	<i>Rotenona</i>
<b>COMT</b>	<i>Catecol-O-Metil-Transferasa</i>	<b>RT</b>	<i>Prueba de Reflejo de Tracción</i>
<b>CR</b>	<i>Prueba de Cruce por Rejilla</i>	<b>S100</b>	<i>Grupos administrados con silibina 100 mg/Kg</i>
<b>CYP*</b>	<i>Citocromos Hepáticos</i>	<b>SC</b>	<i>Vía Subcutánea</i>
<b>D1-D5</b>	<i>Receptores de Dopamina 1 a 5</i>	<b>SN</b>	<i>Sustancia Nigra</i>

<b>DA</b>	<i>Dopamina/ 4-(2-aminoetil)-benzeno-1,2-diol</i>	<b>SNC</b>	<i>Sistema Nervioso Central</i>
<b>DAMPs*</b>	<i>Patrones Moleculares Asociados al Daño Celular</i>	<b>TBA*</b>	<i>Ácido Tiobarbitúrico</i>
<b>DAT*</b>	<i>Transportador de Dopamina</i>	<b>TBARS*</b>	<i>Especies Reactivas con el Ácido Tiobarbitúrico</i>
<b>DMF</b>	<i>Dimetil-Formamida</i>	<b>T-Descenso</b>	<i>Tiempo de Descenso del Ratón en DT</i>
<b>DOPAC</b>	<i>Ácido 3,4-dihidroxifenil acético</i>	<b>TGI</b>	<i>Tracto Gastro Intestinal</i>
<b>DT</b>	<i>Prueba de Descenso en Tubo</i>	<b>TH</b>	<i>Tirosina Hidroxilasa</i>
<b>ECP</b>	<i>Estimulación Cerebral Profunda</i>	<b>TMB</b>	<i>3,3',5,5'-Tetrametilbencidina</i>
<b>EDTA</b>	<i>Etilendiamino-Tetraacetato</i>	<b>TNF*</b>	<i>Factor de Necrosis Tumoral</i>
<b>EGTA</b>	<i>Etilenglicol-Tetraacetato</i>	<b>T-Pose</b>	<i>Tiempo de Pose de las 4 patas tras descender en DT</i>
<b>ELISA*</b>	<i>Ensayos de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas</i>	<b>VO</b>	<i>Vía Oral</i>
<b>EP</b>	<i>Enfermedad de Parkinson</i>	<b>*</b>	<i>= Las siglas están dadas por sus acrónimos en inglés</i>
<b>ER</b>	<i>Error Relativo en CR</i>		
<b>ERNs</b>	<i>Especies Reactivas de Nitrógeno</i>		
<b>ERONs</b>	<i>Especies Reactivas de Oxígeno y Nitrógeno</i>		
<b>EROs</b>	<i>Especies Reactivas de Oxígeno</i>		
<b>FDA*</b>	<i>Food &amp; Drug Administration</i>		
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<i>Ácido Sulfúrico</i>		
<b>HCl</b>	<i>Ácido Clorhídrico</i>		
<b>HClO<sub>4</sub></b>	<i>Ácido Perclórico</i>		
<b>HPLC*</b>	<i>Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución</i>		
<b>HVA*</b>	<i>Ácido Homovanílico</i>		
<b>I-COMT</b>	<i>Inhibidores de la Catecol-O-Metil-Transferasa</i>		
<b>IM</b>	<i>Vía Intramuscular</i>		
<b>I-MAO</b>	<i>Inhibidores de la Mono Amino Oxidasa</i>		
<b>IN</b>	<i>Vía Intranasal</i>		
<b>IP</b>	<i>Vía Intraperitoneal</i>		
<b>KCl</b>	<i>Cloruro de Potasio</i>		
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<i>Fosfato Monobásico de Potasio</i>		

# Índice de Contenido

1. RESUMEN.....	10
1. ABSTRACT.....	10
2. ANTECEDENTES.....	11
3. MARCO TEÓRICO .....	12
3.1. Sistema Nervioso Central.....	12
3.1.1. Núcleos dopaminérgicos .....	12
3.1.2. Dopamina .....	13
3.1.3. Neurodegeneración .....	15
3.2. Enfermedad de Parkinson.....	16
3.2.1. Definición.....	16
3.2.2. Epidemiología e importancia clínica .....	18
3.2.3. Etiología y fisiopatología.....	18
3.2.4. Signos, síntomas y clínica .....	20
3.2.4.1. Signos motores .....	21
3.2.4.2. Signos no motores .....	22
3.3. Tratamiento.....	23
3.3.1. Tratamiento no farmacológico .....	24
3.3.2. Tratamiento farmacológico .....	25
3.3.2.1. Levodopa .....	27
3.3.3. Búsqueda de alternativas terapéuticas.....	28

3.4.	Modelos pre-clínicos de EP.....	29
3.5.	Modelo del MPTP.....	32
3.5.1.	Mecanismo de acción del MPTP .....	32
3.5.2.	Modelo murino.....	34
3.6.	Silimarina y Silibina .....	35
3.6.1.	Origen y composición .....	35
3.6.2.	Perfil químico.....	37
3.6.3.	Perfil farmacológico .....	39
3.6.4.	Efecto neuroprotector de la silibina .....	40
3.7.	Influencia de las vías de administración.....	41
3.7.1.	Vía oral .....	44
3.7.2.	Vía intranasal.....	45
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	50
5.	HIPÓTESIS.....	51
6.	OBJETIVOS.....	51
6.1.	Objetivo general .....	51
6.2.	Objetivos particulares.....	52
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
7.1.	Animales .....	53
7.2.	Ética .....	54
7.3.	Diseño experimental .....	54

7.4.	Esquema de tratamiento .....	55
7.5.	Curva de conservación de dopamina .....	57
7.6.	MTT .....	58
7.7.	TBARS .....	59
7.8.	TNF- $\alpha$ y BDNF .....	60
7.9.	Evaluación conductual motora .....	61
7.9.1.	Prueba de descenso en tubo .....	62
7.9.2.	Prueba de construcción de nido .....	63
7.9.3.	Prueba de caminata en rejilla .....	64
7.9.4.	Prueba de reflejo de tracción .....	66
7.10.	Reactivos .....	68
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	69
8.1.	Validación del modelo de MPTP .....	69
8.2.	La silibina administrada por vía oral conserva los niveles de dopamina estriatal, por vía intranasal no. ....	74
8.3.	La silibina oral restablece la eficiencia respiratoria mitocondrial y reduce la peroxidación lipídica causada por MPTP .....	78
8.4.	La silibina administrada oralmente disminuye los niveles de neuroinflamación por TNF- $\alpha$ e incrementa los niveles de BDNF asociados al MPTP .....	82
8.5.	La administración de la silibina VO mejora las deficiencias motoras en el modelo de MPTP: Bradicinesia, coordinación motora, equilibrio y tono muscular.....	85

8.6. La silibina VO oral tiene efecto neuroprotector en la misma dosis que la silimarina IP ¿Una alternativa con mayor potencial farmacológico? .....	90
9. CONCLUSIÓN.....	92
10. PERSPECTIVAS .....	92
11. REFERENCIAS .....	93
12. ANEXOS.....	113

## 1. RESUMEN

La Enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente en la etapa adulta, se caracteriza por presentar manifestaciones clínicas asociadas principalmente a la falla en el movimiento, asociado con un déficit de dopamina, secundario a la pérdida de neuronas dopaminérgicas. La terapia actual está basada en la restitución de los niveles de dopamina con análogos o precursores de éste, como la levodopa, que provoca efectos secundarios y resistencia al tratamiento en su administración crónica, por lo que es necesario encontrar alternativas y estrategias terapéuticas como el uso de moléculas neuroprotectoras.

La silibina es un flavonolignano obtenido del extracto natural del cardo mariano, conocido como silimarina, al que se le ha comprobado su papel como neuroprotector en la EP, siendo la silibina la molécula más abundante y a la que se le atribuyen gran parte de sus efectos bioactivos. Sin embargo, los estudios *in vivo* han sido efectuados sólo por vía intraperitoneal, que es poco viable en uso en la terapia clínica, por lo que es necesaria su evaluación por vías más convenientes como la oral o la intranasal, que son más cómodas para el paciente y ya se emplean para medicamentos en enfermedades como la EP.

En este trabajo se evaluó el efecto neuroprotector de la silibina en un modelo murino de EP inducido con la proneurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), haciendo énfasis en el análisis en la conservación dosis-dependiente de los niveles de dopamina estriatal. Adicionalmente se evaluaron los efectos de la silibina sobre el contexto bioquímico desfavorable y las manifestaciones motoras en el modelo de EP, para elucidar parte de su posible mecanismo como neuroprotector.

Los resultados muestran que la silibina sí conserva los niveles de dopamina cuando es administrada por vía oral, pero no por la vía intranasal. Su dosis más activa fue de 100 mg/Kg de peso. Así mismo, se demuestra que reduce el daño provocado por el estrés oxidante, restablece la función mitocondrial, disminuye la neuroinflamación, restablece el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y mejora el déficit motor de la EP, por lo que se comprueba que la silibina sí tiene efecto neuroprotector gracias a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias en la vía nigroestriatal, además de conservar niveles de factores de crecimiento y mejorar el perfil motor, por lo que es una posible alternativa farmacológica para el tratamiento de la EP.

## 1. ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most frequent neurodegenerative disease in adult age. PD presents clinical manifestations associated with the loss of striatal dopamine levels secondary to the loss of dopaminergic neurons. The actual therapy consists of the dopamine replacement with analogs or precursors, like levodopa. However, levodopa promotes secondary effects and treatment resistance when administered for prolonged periods. Hence, it is necessary to find new strategies or therapeutic alternatives, such as neuroprotective molecules.

Silymarin is a standardized extract obtained from the milk thistle, which has antioxidant, anti-inflammatory, and neuroprotective effects. Previously, we proved that silymarin administered intraperitoneally preserved dopamine levels and dopaminergic neurons in a mouse model of PD.

Nevertheless, this administration route is not commonly used in patients, so it is necessary to evaluate administration routes such as orally or intranasal, that are more comfortable for the patient and are used for other drugs in PD.

In this work, the neuroprotective effect of silybin, the most abundant flavonolignan of silymarin that has many of silymarin's bioactive effects, was evaluated in a PD murine model induced with the pro-neurotoxin MPTP. We focused on the analysis of the dose-dependent conservation of striatal dopamine levels. Additionally, some biochemical damage parameters (MTT, TBARS, and TNF- $\alpha$ ) and motor deficits were evaluated.

Our results showed that silybin preserved dopamine levels when administered oral, but it didn't have the same effect by the intranasal route. Silybin's more effective oral dose was 100 mg/Kg. Silybin also reduced lipid peroxidation, restored mitochondrial function, diminished neuroinflammation by TNF- $\alpha$ , restored growth factors like BDNF, and improved motor deficits in the MPTP model.

In conclusion, silybin presented neuroprotective effects exerted by its antioxidant and anti-inflammatory properties in the nigrostriatal pathway and by increasing BDNF. Thus, silybin administered orally may be a possibly pharmacological alternative for PD treatment.

## 2. ANTECEDENTES

La enfermedad de Parkinson (EP) es, junto con la enfermedad de Alzheimer, una de las enfermedades neurodegenerativas más frecuentes, y afecta cerca del 0.3% de la población mundial (von Campenhausen, y otros, 2005). Se estima que la cifra global ascenderá a casi 9.3 millones de afectados para el año 2030 y actualmente no existe una terapia que logre revertir, impedir o curar los daños motores y/o bioquímicos que provoca esta enfermedad (Dorsey, y otros, 2007).

La EP se caracteriza por presentar manifestaciones motoras y no motoras consecuentes a una pérdida notable y progresiva de neuronas dopaminérgicas, lo que genera una depleción importante en los niveles de dopamina en el sistema nervioso central (SNC) (Dexter & Jenner, 2013). La neurodegeneración en la EP está relacionada con un microambiente bioquímico desfavorable con estrés oxidante, agregación de proteínas, disfunción mitocondrial y neuroinflamación en los núcleos dopaminérgicos más importantes para la coordinación motora: la sustancia nigra y el cuerpo estriado, entre otros (Raza, y otros, 2019).

En la actualidad, la estrategia de elección para el tratamiento de la EP es el restablecimiento de los niveles de dopamina con el empleo de precursores como la levodopa, que es capaz de cruzar barrera hemato-encefálica (BHE) y llegar hasta los sitios de interés para su conversión a dopamina *in situ* (Haddad, y otros, 2018). Sin embargo, se ha demostrado que la administración crónica de la levodopa genera resistencia al tratamiento y reacciones adversas asociadas con movimientos erráticos anormales en un síndrome conocido como “discinesia inducida por levodopa”, por lo que se buscan alternativas terapéuticas que eviten el uso de la levodopa tanto tiempo como sea posible (Hagell & Cenci, 2005). Una de las estrategias utilizadas para detener el progreso de la EP es por medio de agentes neuroprotectores: moléculas polifenólicas que funcionan como antioxidantes y/o antiinflamatorios, evitando la muerte neuronal y la activación de la glía (Francardo, 2017).

Bajo este contexto, muchos compuestos y productos naturales han sido evaluados como alternativas farmacológicas, destacando el extracto de la semilla del cardo mariano, la silimarina. Pérez-H y colaboradores en 2014, reportaron que la silimarina tiene efectos neuroprotectores administrado por vía intraperitoneal en las dosis de 50 y 100 mg/Kg de peso, en un modelo murino de EP inducido con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), ya que fue capaz de preservar los niveles estriatales de dopamina y conservar las neuronas dopaminérgicas (Pérez-H, y otros, 2014). Sin embargo, en clínica la vía intraperitoneal es poco viable, de manera que es necesario evaluarla por vías más cómodas como la vía oral o la vía intranasal, que ya se utiliza en otros tratamientos en enfermedades neurodegenerativas (Mittal, y otros, 2014).

Este proyecto, busca evaluar el efecto neuroprotector de la silibina, el flavonolignano más abundante de la silimarina, que conserva la mayoría de sus efectos bioactivos (Trouillas, y otros, 2008), al administrarlo por las vías oral e intranasal en un modelo de EP con ratones. Además de evaluar sus efectos antioxidantes y anti-inflamatorios a nivel bioquímico, así como sus efectos sobre el déficit motor que presentan los ratones con el modelo de EP.

## 3. MARCO TEÓRICO

### 3.1. Sistema Nervioso Central

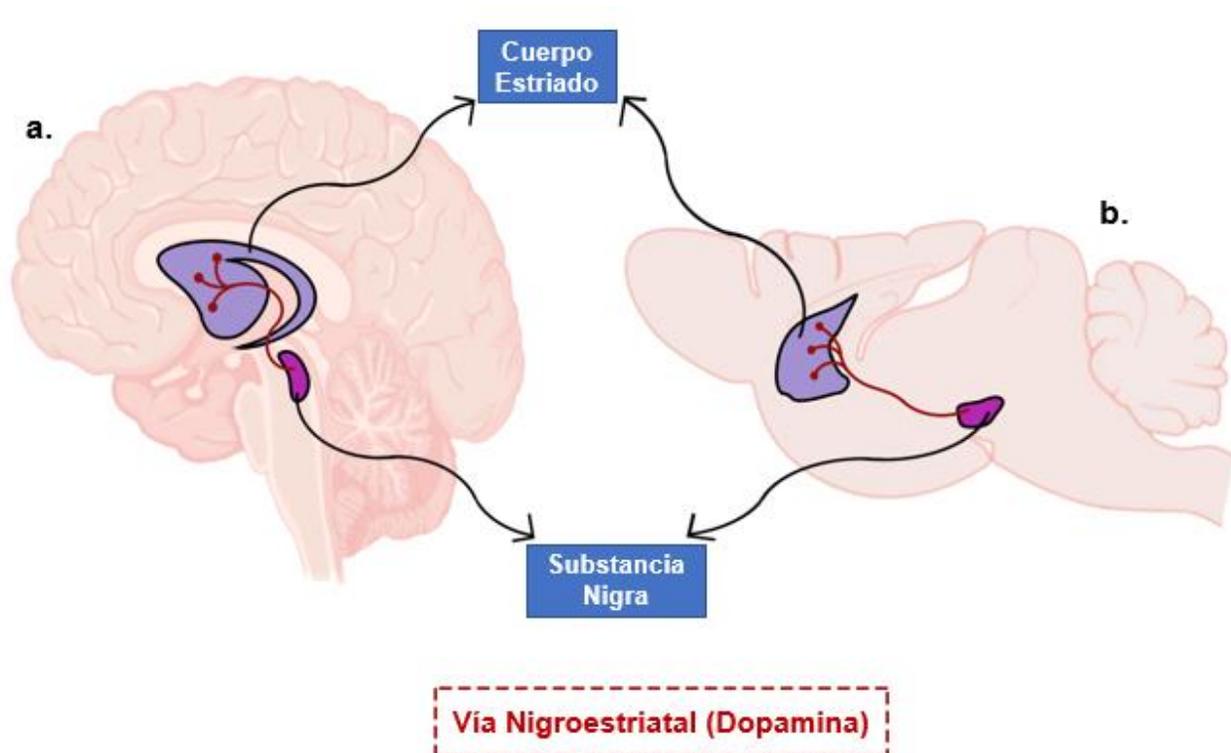
El sistema nervioso central (SNC) es un conjunto de órganos, tejidos, células, moléculas y iones organizados en redes de comunicación neuronal, cuyas múltiples funciones se basan en la comunicación química y eléctrica (Fox, 2016).

El SNC se compone principalmente del cerebro y la médula espinal. Éstos se caracterizan por poseer diferentes regiones anatómicas con sistemas diversos de neurotransmisores y asociaciones de neuronas especializadas, así como de comunicación con células de mantenimiento y vigilancia inmunológica como los astrocitos y la microglía (Ikezu & Gendelmann, 2017; Fox, 2016).

#### 3.1.1. Núcleos dopaminérgicos

Los ganglios basales son localidades cerebrales compuestos por núcleos (cúmulos de cuerpos neuronales interconectados). El núcleo más prominente es el cuerpo estriado (CE) que involucra el núcleo caudado, el putamen y el globo pálido (Figura 1) y su función principal está en el control voluntario del movimiento y la coordinación motora (Fox, 2016). Las proyecciones de estos núcleos se interconectan con otra área importante para la coordinación motora, que se encuentra en el mesencéfalo, ésta es la sustancia nigra (SN, Figura 1). Juntos forman el circuito nigroestriatal y se le adjudica la función de coordinación motora gruesa y fina, así como el movimiento voluntario (Purves, y otros, 2018; Tortora & Derrickson, 2017; Fox, 2016). La comunicación que existe entre las neuronas que componen estos núcleos está coordinada principalmente por la dopamina (DA) o en el caso

de otros núcleos como precursor de la norepinefrina y/o la epinefrina. También se encuentra en sistema nervioso periférico (Buhlman, 2016).



**Figura 1. Vía nigroestriatal en humanos (a.) y ratones (b.)** desde una vista de corte sagital, compuesto por el cuerpo estriado (incluye el putamen, el globo pálido y el núcleo caudado) y la sustancia nigra. Ambos núcleos están conectados por las proyecciones de las neuronas dopaminérgicas que en conjunto definen la función y coordinación motora. Figura realizada con BioRender APP y Adobe Photoshop CS6 v13.0 (x32).

### 3.1.2. Dopamina

La 4-(2-aminoetil)benzeno-1,2-diol (National Center for Biotechnology Information, 2010), mejor conocida como DA (Figura 2), es una catecolamina clasificada como un neurotransmisor del grupo de monoaminas biogénicas (Purves, y otros, 2018) y está implicada en diversos procesos a nivel de SNC asociados con la coordinación motora, emociones y circuitos de recompensa, además de ser uno de los precursores de la norepinefrina y epinefrina (Klein, y otros, 2019).

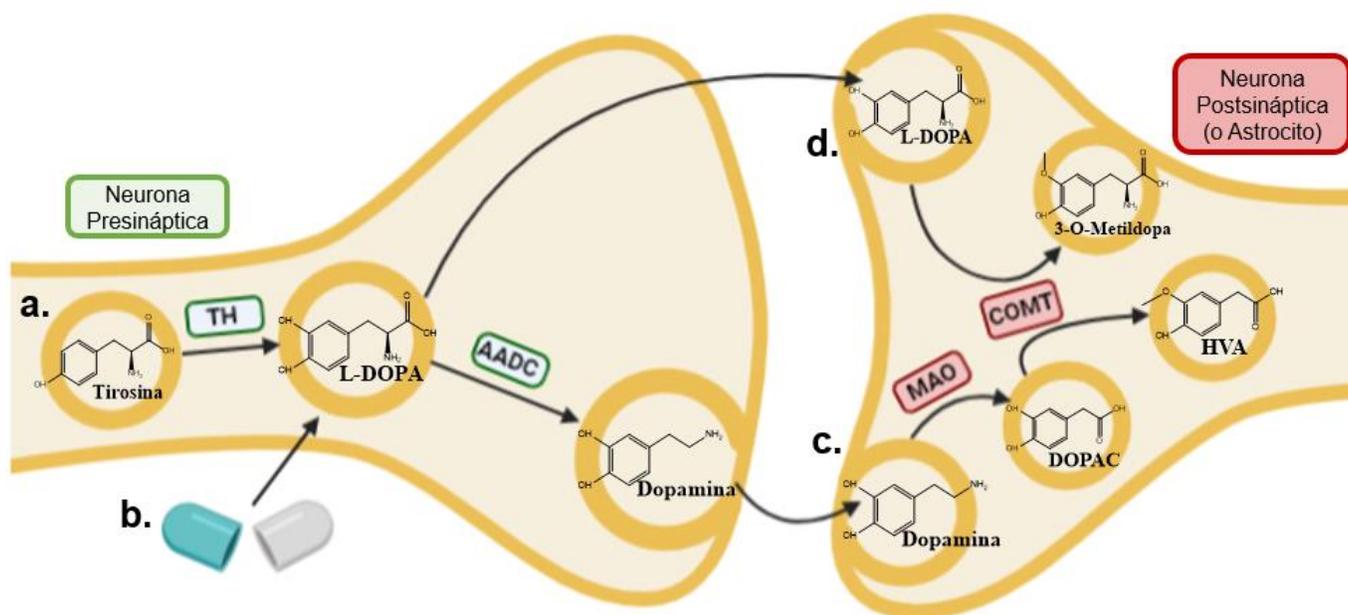
Como se observa en la figura 2a, a partir del aminoácido tirosina con la acción de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) se adiciona un grupo hidroxilo y se forma la primera catecolamina

importante, el Ácido (2S)-2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil)-propanóico (Por sus siglas en inglés, L-DOPA). Este es considerado el paso limitante en toda la ruta biogénica de la dopamina. Una vez sintetizada la levodopa, se descarboxila por la acción de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (por sus siglas en inglés, AADC, Figura 2b), formando la DA, que en la vía nigroestriatal funge como el neurotransmisor que se libera al espacio sináptico para ser capturada por la neurona postsináptica. En otras vías, es el precursor de la noradrenalina y posteriormente de la adrenalina (Klein, y otros, 2019).

En los circuitos dopaminérgicos, la DA ejerce sus acciones al unirse a los receptores metabotrópicos D1 a D5 (Haddad, Sawalha, Khawaja, Najjar, & Karaman, 2018) dividiéndose en 2 grupos importantes: El grupo “similar a D1” al que pertenecen D1 y D5, y que se encuentran expresados en el núcleo caudado, putamen, núcleo accumbens, SN pars reticulata, bulbo olfatorio, amígdala y corteza. Por otro lado, está el grupo “similar a D2” que incluyen a D2, D3 y D4, que se encuentran expresados en el CE, el lateral del globo pálido, el núcleo del núcleo accumbens, el área ventral-tegmental, retina, hipocampo e hipotálamo (Klein, y otros, 2019). D1 y D5 son receptores postsinápticos dopaminérgicos, mientras que D2 y D3 son recapturadores presinápticos en mayor proporción aunque se puedan encontrar en las neuronas postsinápticas (Beaulieu, Espinoza, & Gainetdinov, 2015), los D4 son más abundantes en retina (Cohen, Todd, Harmon, & O'Malley, 1992).

La dopamina es muy susceptible a la oxidación espontánea mediada por metales, enzimas y especies reactivas electrón-deficientes, formando quinonas radicalarias (Segura-Aguilar & Huenchuguala, 2018) que pueden dañar biomoléculas en caso de no ser capturados por una vesícula pre o postsináptica, transportada al citoplasma y metabolizada por la MAO-B (Damier, Kastner, Agid, & Hirsch, 1996) o la Catecol-O-Metil Transferasa (COMT) (Klein, y otros, 2019; Chen, y otros, 2011). Cuando sí es metabolizada correctamente, como se

observa en la figura 2, los productos finales inertes generados a partir de la DA por metabolismo de la MAO y la COMT son el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (por sus siglas en inglés, DOPAC) y el ácido homovanílico (por sus siglas en inglés, HVA), mientras que el exceso de L-DOPA también se metaboliza por la COMT para formar 3-o-metildopa. Todos estos metabolitos carecen de reactividad oxidante y no forman radicales libres (Segura-Aguilar & Huenchuguala, 2018; Girault & Greengard, 2004).



**Figura 2. Biosíntesis y metabolismo de la dopamina.** En la neurona presináptica el aminoácido L-Tirosina (a.) da origen a la L-DOPA cuando es metabolizada por la tirosina hidroxilasa (TH), aunque también se puede obtener administrando este precursor de la dopamina como fármaco por vía sistémica (b.) para ciertas patologías como la EP. Su vía principal de uso es la síntesis de dopamina, neurotransmisor que se libera al espacio sináptico y puede ser capturada por una neurona postsináptica o un astrocito (c.) la cual es metabolizada por el complejo mono amino-oxidasa (MAO) formando ácido 3,4-dihidroxifenilacético (por sus siglas en inglés, DOPAC) y posteriormente procesada por la enzima catecol-o-metil transferasa (COMT) hasta formar el metabolito inactivo ácido homovanílico (por sus siglas en inglés, HVA). Otro camino que puede seguir la L-DOPA es ser liberada para la captura postsináptica y así ser procesada por la COMT para formar 3-o-metildopa, inactivándola cuando se encuentra en exceso (d.). Figura realizada con BioRender APP, CambridgeSoft ChemDraw Professional v15.0 y Adobe Photoshop CS6 v13.0 (x32).

### 3.1.3. Neurodegeneración

Existen procesos patológicos que alteran la homeostasis de los tejidos del SNC que ponen en riesgo la integridad de sus funciones. El principal ejemplo de éstos es el proceso neurodegenerativo (Ikezu & Gendelmann, 2017).

La neurodegeneración es cualquier condición patológica que involucre la pérdida u alteración de la función, estructura y/o asociación de las neuronas en el SNC, el cual se ve reflejado en las manifestaciones clínicas, conductuales y/o cognitivas (Ikezu & Gendelmann, 2017).

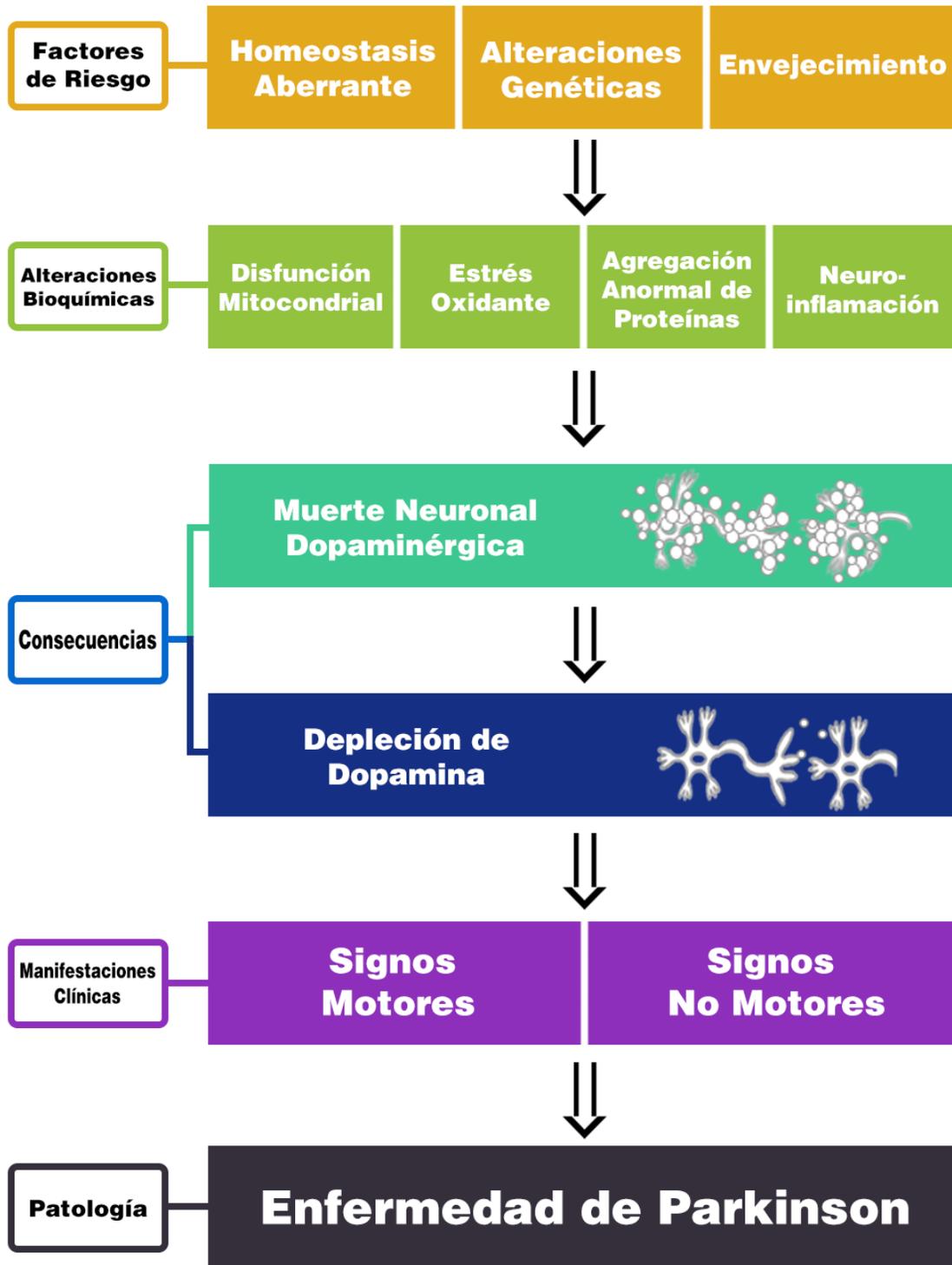
Las lesiones o alteraciones en el circuito nigroestriatal pueden provocar condiciones neurodegenerativas que tienen como consecuencia disfunciones en la actividad motora como temblor, rigidez muscular y movimientos involuntarios. Una de las enfermedades neurodegenerativas más relevantes a nivel mundial, que implican una alteración en este sistema dopaminérgico, es la enfermedad de Parkinson (Purves, y otros, 2018; Tortora & Derrickson, 2017).

## 3.2. Enfermedad de Parkinson

### 3.2.1. Definición

La enfermedad de Parkinson (EP) es un padecimiento crónico neurodegenerativo progresivo (Raza, Anjum, & Ain Shakeel, 2019), caracterizado por una pérdida de neuronas dopaminérgicas la SN, cuya principal consecuencia es la manifestación de un fenotipo parkinsoniano clásico debido a la reducción en los niveles de dopamina en el CE y el incremento de marcadores de daño como la neuroinflamación (Subramaniam & Federoff, 2017).

Usualmente afecta a personas de la tercera edad (Willis, Evanoff, Lian, & Criswell, 2010) y tiene una cierta influencia genética, además de una fuerte influencia ambiental (Figura 3) (Raza, Anjum, & Ain Shakeel, 2019).



**Figura 3. Descripción general de la enfermedad de Parkinson.** Implicaciones en las alteraciones bioquímicas y los factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de EP. Figura realizada con Adobe Photoshop CS6 v13.0 (x32).

### 3.2.2. Epidemiología e importancia clínica

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más importante a nivel mundial, sólo después de la enfermedad de Alzheimer, ya que la EP afecta en un aproximado del 0.3% de la población mundial (von Campenhausen, y otros, 2005) y en 1-3% de las personas mayores de 65 años, el cual se estima que incrementará a 8.7-9.3 millones de personas en el 2030 (Dorsey, y otros, 2007). Por otro lado, en la población mexicana, hasta 2017 se reportó una incidencia de 37.92 de cada 100,000 (Rodríguez-Violante, Velásquez-Pérez, & Cervantes-Arriaga, 2019). Esta enfermedad es más prevalente en hombres que mujeres, ya que estudios epidemiológicos como el de Schrag y colaboradores, demuestran que existe una relación de entre 1.1 a 3 veces más en hombres respecto a mujeres (Schrag, Ben-Sholmo, & Quinn, 2000) o el estudio de Rodríguez-Violante en 2019 que reitera la proporción de Parkinson 1.1:1 en México (Rodríguez-Violante, Velásquez-Pérez, & Cervantes-Arriaga, 2019)

### 3.2.3. Etiología y fisiopatología

En la búsqueda de las causas y alteraciones principales de la EP, se ha establecido que menos del 10% se explica por factores genéticos, los cuales se consideran más como predisponentes que como causas directas (Raza, Anjum, & Ain Shakeel, 2019). Se ha determinado que el signo patognomónico de esta enfermedad es la acumulación de inclusiones citoplasmáticas filamentosas, denominadas cuerpos de Lewy, los cuales son detectados post-mortem (Volpicelli-Daley, Luk, & Lee, 2016). Éstas están conformadas principalmente por las proteínas  $\alpha$ -sinucleína y parkina, cuya acumulación es inducida por la hiperfosforilación y formación fibrosa de éstas, provocando una muerte neuronal (Gorbatyuk, y otros, 2008). Estos agregados de proteína se encuentran principalmente en los ganglios basales (Braak, de Vos, Bohl, & Del Tredici, 2006), bulbo olfatorio (McGeer &

McGeer, 2008), SN e incluso en sistema nervioso entérico (Wakabayashi, Takahashi, Takeda, Ohama, & Ikuta, 1989). Sin embargo, existen muchas características neuroquímicas asociadas al daño celular, además de los cuerpos de Lewy, que desencadenan la muerte neuronal y la subsecuente depleción en los niveles de dopamina, causantes de las manifestaciones clínicas de la EP (Figura 3) (Dexter & Jenner, 2013).

Específicamente en la SN, se reduce la expresión de transportadores de DA y existe una disminución de este neurotransmisor entre un 60-80% (Raza, Anjum, & Ain Shakeel, 2019), por otro lado, en ganglios basales existe evidencia de disfunción mitocondrial (Chaturvedi & Beal, 2008) provocando estrés oxidante y subsecuente daño a biomoléculas (Isobe, Abe, & Terayama, 2010), en parte por la inhibición del complejo I mitocondrial (Keeney, Xie, Capaldi, & Bennett Jr, 2006).

Respecto a lo anterior, de acuerdo con lo encontrado tanto en ensayos clínicos post mortem, como en ensayos *in vitro* y en modelos *in vivo*, se han propuesto dos tipos de mecanismos moleculares asociados al desarrollo de la EP (Lim & Zhang, 2013).

Entre los mecanismos primarios se encuentran los impedimentos homeostáticos de las proteínas, conocido como “homeostasis aberrante”, relacionado con la falla del sistema ubiquitina-proteasoma, autofagia y regulación por chaperonas (Cookson, 2009) y la disfunción mitocondrial asociada al estrés oxidante y la inhibición del complejo I mitocondrial (Chaturvedi & Beal, 2008).

Se ha documentado que las neuronas dopaminérgicas son más susceptibles a las especies reactivas de oxígeno (EROS) (Dias, Junn, & Mouradian, 2013), que son producidas en la mitocondria disfuncional (Figura 3) (Murphy, 2009).

En los mecanismos secundarios, se consideran algunas otras posibles causas como las mutaciones genéticas que causan patogenicidad como la mutación A53T en el gen

*Scna/PARK1* que codifica la  $\alpha$ -sinucleína y la relaciona a la autofagia, además de otras posibles causas como la desregulación en las vías del metabolismo de la DA, la actividad alterada de los canales de calcio y una de las más frecuentes e importantes, la neuroinflamación (Lim & Zhang, 2013).

La neuroinflamación es uno de los fenómenos claves que acompañan a las enfermedades neurodegenerativas como la EP e influye notablemente en la evolución de la patología (Tansey, McCoy, & Frank-Cannon, 2007). Recientes investigaciones apuntan a la neuroinflamación dirigida por la microglía polarizada a un perfil pro-inflamatoria (M1) como uno de los principales contribuyentes en el desarrollo de la EP idiopática, ya que en este estado, secreta moléculas citotóxicas y citocinas pro-inflamatorias como el TNF- $\alpha$ , promoviendo la inflamación y respuestas neurotóxicas (Subramaniam & Federoff, 2017).

La exposición a neuromelanina, proveniente de las neuronas dopaminérgicas muertas en la EP provoca quimiotaxis de macrófagos de origen periférico e incrementa la producción de citocinas pro-inflamatorias, como INF- $\gamma$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en el cuerpo estriado, sustancia nigra y el área tegmental ventral (Subramaniam & Federoff, 2017). Así mismo, la presencia de especies reactivas de oxígeno favorece la activación de NF- $\kappa$ B y la subsecuente síntesis y secreción de las citocinas inflamatorias (Tansey, McCoy, & Frank-Cannon, 2007).

#### 3.2.4. Signos, síntomas y clínica

La EP está caracterizada por manifestaciones clínicas asociadas a una disfunción del circuito dopaminérgico y el sistema neuromotor (Litvan, y otros, 2003), los cuales se pueden dividir en dos grandes grupos: los signos motores (Jankovic, 2008), asociados con las disfunciones en la coordinación motora gruesa y fina, además del movimiento (Berganzo, y otros, 2016), y los signos no motores (Schapira, Chaudhuri, & Jenner, 2017), que se manifiestan por las deficiencias de neurotransmisores como la DA, lo que se revela en

trastornos del sueño (Pfeiffer, 2016), depresión, ansiedad e incluso desórdenes gastrointestinales (Figuras 3 y 4) (Chadhuri & Schapira, 2009).

#### 3.2.4.1. Signos motores

Uno de los signos más evidentes en el padecimiento de la EP es la disfunción motora, la cual se produce como consecuencia de las alteraciones neuroquímicas y neurofisiológicas en las conexiones dopaminérgicas del circuito nigroestriatal (Tortora & Derrickson, 2017), pero éstas son dependientes del tiempo de pérdida neuronal y de la severidad del daño. Por lo que se pueden subdividir estos síntomas en primarios tempranos, primarios tardíos y secundarios (Figura 4) (Jankovic, 2008).

Bajo esta premisa, se les denomina primarios tempranos a aquellos signos que se presentan en las primeras etapas del desarrollo de esta neurodegeneración, como temblores leves, lentitud en el habla, dificultad postural, pérdida de la concentración, expresiones faciales asimétricas, fatiga generalizada y depresión sin causa aparente (Jankovic, 2008). Por otro lado, los signos primarios tardíos se desarrollan con el tiempo y su presencia depende de la variabilidad de los pacientes, generalmente se diagnostica la EP hasta que se presentan estos signos tardíos. Entre éstos, se pueden encontrar alta dificultad postural, discinesia (disminución y dificultad en la capacidad de realizar movimientos voluntarios), bradicinesia (ralentización del movimiento voluntario) (Berardelli, Rothwell, Thompson, & Hallett, 2001), temblor en estado de reposo, rigidez muscular e inestabilidad motriz. (Helmich, Hallett, Deuschl, Toni, & Bloem, 2012).

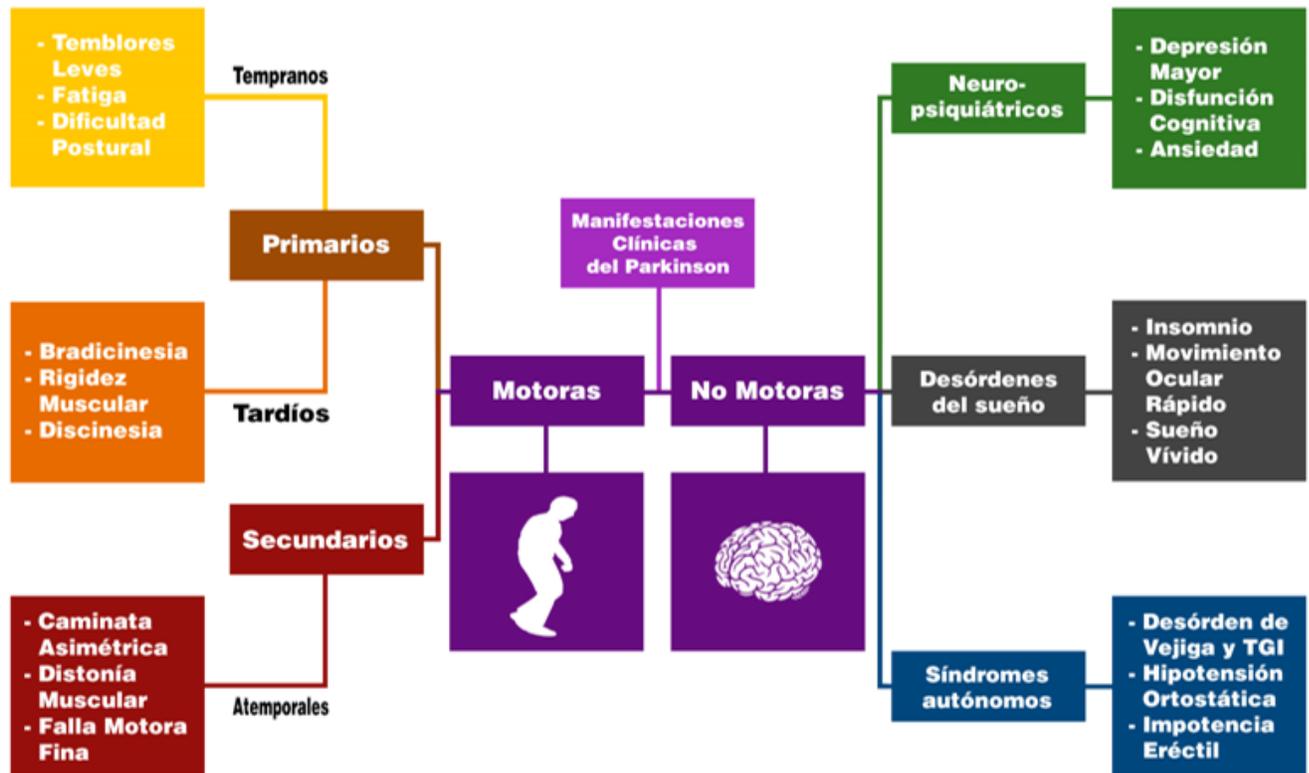
Por último, los signos secundarios son aquellos que son asociadas a la EP pero que no son constantes en todos los pacientes que padecen esta neurodegeneración ni corresponden al progreso temporal, algunos ejemplos son la caminata asimétrica, disfagia, pérdida en el

tono muscular y dificultad en la coordinación motora fina (Figuras 3 y 4) (Raza, Anjum, & Ain Shakeel, 2019).

#### 3.2.4.2. Signos no motores

Otro tipo de manifestaciones clínicas de la EP, son las asociadas a alteraciones de la conducta, cognición y comportamiento (Figuras 3 y 4), las cuales se engloban en la categoría de signos no motores, pero que a su vez pueden subdividirse en tres grandes grupos:

- 1) Neuropsiquiátricos: que incluye depresión (en el 5% de los casos, también asociada a la pérdida discreta de serotonina y noradrenalina), disfunción cognitiva (Aarsland & Kurz, 2010), demencia y ansiedad, entre otras (Chadhuri & Schapira, 2009)
- 2) Desórdenes del sueño: están presentes en aproximadamente el 25% de los pacientes con EP (Raza, Anjum, & Ain Shakeel, 2019), como el insomnio, el movimiento rápido ocular y el sueño vívido.
- 3) Síndromes autónomos: Desórdenes de la vejiga, desórdenes gastrointestinales, hipotensión ortostática e impotencia eréctil. (Schapira, Chaudhuri, & Jenner, 2017)



**Figura 4. Signos motores y no motores más comunes en la enfermedad de Parkinson.** Manifestaciones clínicas más frecuentes que están asociadas al desarrollo de la EP. Figura realizada con Adobe Photoshop CS6 v13.0 (x32)

### 3.3. Tratamiento

Debido a que la EP tiene un origen multifactorial y sus manifestaciones clínicas son variadas, se han desarrollado diferentes estrategias para su tratamiento, desde las alternativas físicas que involucran implantes de dispositivos médicos como electrodos en áreas estratégicas del cerebro para la mejora en la comunicación neuronal (Eleopra, y otros, 2019), hasta la clásica administración farmacológica con dianas asociadas a la fisiopatología para la disminución de la sintomatología (Calleo, y otros, 2015), la mejora en la actividad motora (Avila, y otros, 2015) y reversión en déficits cognitivos (Arvanitakis, Shah, & Bennett, 2019; Calleo, y otros, 2015; Hindle, Petrelli, Clare, & Kalbe, 2013).

### 3.3.1. Tratamiento no farmacológico

El abordaje quirúrgico y la estimulación física relacionada al ejercicio son estrategias que complementan la terapéutica de la EP mejorando parte de la sintomatología, tanto a las motoras, por ejemplo, el tono muscular, como los no motores, especialmente los desórdenes gastrointestinales (van der Kolk & King, 2013). Como parte de la terapia de activación física, se ha comprobado que el entrenamiento para varias actividades como ejercicio aeróbico, de fuerza y flexibilidad, de balanceo y de agilidad, tienen efectos benéficos en pacientes con EP, como mejorías en la marcha, equilibrio y cognición (Evans, Greenfield, Wilson, & Bateman, 2009) lo que ha impulsado la fisioterapéutica y activación física para la mejora en las habilidades motoras (Witt, Kalbe, Erasmi, & Ebersbach, 2017). Por otro lado, las estrategias quirúrgicas siguen dos grandes corrientes, la primera es aquella que aborda cirugías ablativas o curativas, destinadas a remover unilateral o bilateralmente las regiones afectadas como el tálamo (talamotomía), globo pálido (palidotomía) o subtálamo (subtalamotomía), las cuales son extremadamente peligrosas por la dificultad que presentan y son poco recurrentes. Sin embargo, en un estudio de 200 pacientes con talamotomía, se demostró una mejoría modesta del 24.5% y moderada de 45.2% de los temblores en los pacientes sometidos a estas cirugías (Iacono, Henderson, & Lonser, 1995). La segunda corriente es la estimulación profunda cerebral basada en electrodos. En esta estrategia, con ayuda de tecnología y procedimientos estereotáxicos, se hace la implantación de electrodos para estimulación eléctrica unilateral del núcleo intermedio del tálamo con altas frecuencias de 130-200 Hz, para la mejora de signos motores como temblores (Johnson, Miocinovic, McIntyre, & Vitek, 2008).

Debido a la invasividad y riesgo de las alternativas quirúrgicas, se prefiere el abordaje farmacológico para el tratamiento de la EP, complementada con la estrategia de activación física para obtener una mejora en la calidad de vida del paciente.

### 3.3.2. Tratamiento farmacológico

Hasta ahora, no existe una terapia 100% efectiva para modificar o revertir el curso de la EP, sin embargo, las estrategias para el tratamiento farmacológico de la EP se han enfocado en la mejora de la sintomatología y/o en evitar la progresión rápida de la enfermedad (Ullah & Khan, 2018).

**Tabla 1.** Medicamentos Usados en el Tratamiento de la EP (Traducida de Raza et al, 2009, Life Sci. 226)

Tipo de Fármaco	Fármacos Específicos	Mecanismo de Acción
Anticolinérgicos	Trihexifenidilo Benzotropina Etopropazina	Bloquea los receptores de acetilcolina y previene la degeneración de dopamina.
Inhibidores de la Mono Amino Oxidasa (I-MAO)	Seleginina	Bloquea los receptores de la MAO-B y reduce el metabolismo de la dopamina.
Antivirales	Amantadina	Bloquea los receptores de acetilcolina y NMDA, además de que promueve la liberación de dopamina.
Agonistas Dopaminérgicos	Bromocriptina Pergolida, Ropinirol Pramipexol	Estimula directamente a los receptores de dopamina.
Combinaciones de L-DOPA	L-DOPA/Carbidopa L-DOPA/Benserazida	Promueve su metabolismo a dopamina en las células con DOPA-descarboxilasa.
Inhibidores de la Catecol-O-Metil Transferasa (i-COMT)	Entacapona	Bloquea la actividad de la COMT periférica para retener las catecolaminas.

I-MAO = Inhibidor de la Mono Amino Oxidasa, MAO = Monoamino Oxidasa, MAO-B = Mono Amino Oxidasa Isoforma B, NMDA = N-Metil-D-Aspartato, L-DOPA= Levodopa, I-COMT = Inhibidor de la Catecol-O-Metil Transferasa.

Algunos de los medicamentos disponibles en el mundo, como lo expresan Raza y col. en 2019, están asociados a la disminución del daño con estrategias como la neuroprotección y el incremento de los niveles de dopamina con el uso de miméticos de dopamina, agonistas

de los receptores o la administración de precursores, como la L-DOPA que es actualmente la estrategia de mayor uso clínico en el mundo (Tabla 1). Sin embargo, las estrategias deberán cambiar dependiendo del progreso de la patología en los pacientes con esta enfermedad (Tabla 2) (Raza, Anjum, & Ain Shakeel, 2019).

**Tabla 2.** Resumen de las estrategias terapéuticas en la EP (Traducida de Raza et al, 2019, Life Sci. 226)

Estados de la EP	Signos y Síntomas	% de Pérdida Neuronal		Tratamientos disponibles	Respuesta	Efectos Colaterales	Medidas de Mitigación
		SN	Dopaminérgicas				
Templada	<b>I</b> Temblores Unilaterales. Cambios Posturales. Alteraciones en la expresión facial y caminata.	62-82%	40-60%	<b>Edad &lt; 65 años</b> - Benzexol = 0.5-2 mg c/8h - Prociclidina = 2.5-10 mg c/8h	Reduce la rigidez y los temblores.	Boca seca, retención urinaria, constipación, visión borrosa y a veces arritmia cardiaca.	Reducción de dosis y ajustes con medicamentos para disfunción renal.
	<b>II</b> Temblores Bilaterales y Rigidez. Problemas de caminata con mala postura.	85%	75%	<b>Edad &gt; 65 años</b> - Amantadina = 100 mg c/12h			
Moderada	<b>III</b> Pérdida del equilibrio y ralentización del movimiento. Discapacidad en actividades cotidianas como comer.	88%	82%	<b>Edad &lt; 65 años</b> - Sinemet (L-DOPA 250 mg + Carbidopa 25 mg) = 1 tableta c/8h	Mejora la hipocinesia y reduce los temblores.	Nauseas, vómito, hipertensión, discinesia y arritmia cardiaca.	Dosis reducida sólo en conjunto con los alimentos, ejercicio físico y ECP.
	<b>IV</b> El paciente no puede mantenerse levantado por sí mismo. Inestabilidad Postural.	89%	90%	<b>Edad &gt; 65 años</b> - Madopar (L-DOPA 25 mg + Bensirazida 50 mg) = 1 tableta c/8h - Selegilina = 5 mg con el desayuno			
Severa	<b>V</b> Bradicinesia, rigidez, alucinaciones y espasmos musculares	95%	95%	L-DOPA + Selegilina + Bromocriptina: - Semana 1: ½ tableta antes de dormir - Semana 2: 1 Tableta antes de dormir - Semana 3: 1 Tableta c/12h - Semana 4: 1 Tableta c/8h	Mejora en la inestabilidad postural, reduce la rigidez muscular y los temblores.	Nauseas, boca seca, vómito, alucinaciones, somnolencia y diarrea.	Reducción de la dosis al primer instante y aumentarlo de forma gradual en conjunto con ECP.

EP = Enfermedad de Parkinson, SN = Sustancia Nigra, c/8h = Cada 8 horas, c/12h = Cada 12 horas, ECP = Estimulación cerebral profunda

### 3.3.2.1. Levodopa

Como se abordó anteriormente, el ácido (2S)-2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil)-propanóico, conocido como levodopa o L-DOPA, es el aminoácido precursor de la DA (National Center for Biotechnology Information, 2010). En el tratamiento de la EP, cuando se presentan las etapas más avanzadas de ésta, es necesario el uso de la L-DOPA, la cual puede ser administrada periféricamente y cruzar la barrera hemato-encefálica (BHE) sin inconvenientes, para ser metabolizada en el parénquima cerebral y ejercer su función ya transformada en DA (Haddad, Sawalha, Khawaja, Najjar, & Karaman, 2018).

Esta molécula presenta los efectos terapéuticos más importantes y actualmente es la terapia más efectiva contra la EP (Raza, Anjum, & Ain Shakeel, 2019), sin embargo, debido a que genera resistencia con el tiempo y provoca efectos colaterales (Nonnekes, y otros, 2016), se trata de posponer el mayor tiempo posible su uso con la administración de otros fármacos menos agresivos como los inhibidores de la MAO (I-MAO) (Parkinson Study Group, 2004), bloqueadores de los receptores de NMDA y anticolinérgicos (Goetz & Pal, 2014). Respecto a la resistencia a la L-DOPA, se sabe que el 90% de pacientes con EP sí presentan una resistencia terapéutica real cuando los esquemas son mayores a 9 años de farmacoterapia, presentando complicaciones en las fluctuaciones motoras y movimientos involuntarios anormales, conocidas como “discinesias”, lo que se ha denominado como el fenómeno de “discinesia inducida por levodopa” (LID, por sus siglas en inglés). La LID incluye signos de movimiento repentino, involuntario e hiperkinético que no se presentan de forma habitual los pacientes de EP (Hagell & Cenci, 2005), son consecuencia a altos niveles plasmáticos o “picos séricos” de levodopa, en una sola respuesta (monofásica) o correspondiente a la fase de ascenso y descenso de estos niveles de catecolamina en sangre (bifásica) (Francardo & Cenci, 2014).

Es por este fenómeno que se buscan alternativas terapéuticas que retrasen la necesidad del uso de la levodopa y así evitar la aparición de este fenómeno farmacológico.

### 3.3.3. Búsqueda de alternativas terapéuticas

Como parte de las estrategias para la terapéutica de la EP, se busca retrasar la administración de L-DOPA los años de tratamiento que sean posibles, por los efectos colaterales que presenta tras su administración crónica, como se abordó en los apartados anteriores. Es por ello que se buscan alternativas para el control de este padecimiento en etapas tempranas con otras estrategias, por ejemplo, con el uso de agonistas dopaminérgicos como la bromocriptina, I-MAO como la selegilina e I-COMT como la entocapona, entre otros (Tabla 1). Sin embargo, una estrategia planteada más recientemente en las investigaciones preclínicas es el uso de neuroprotectores (Francardo, Schmitz, Sulzer, & Cenci, 2017), que son fármacos cuya finalidad es contener el ambiente disruptor de la homeostasis en etapas tempranas que se genera en la EP, como el estrés oxidante, la neuroinflamación y la agregación aberrante de proteínas (Reglodi, y otros, 2017; Hirsch & Hunot, 2009) o que son capaces de restablecer u optimizar los niveles de moléculas esenciales para el mantenimiento homeostático de las neuronas (Chaturvedi & Beal, 2008). Las moléculas que protagonizan esta estrategia suelen ser del tipo polifenólicas, con estructuras orgánicas con enlaces dobles y con capacidad captora de radicales libres con sustituyentes hidroxilo, que neutralicen el poder pro-oxidante y radicalaria de las especies generadas en estos ambientes desfavorables (Spagnuolo, Napolitano, Tedesco, Moccia, & Russo, 2016). Para ello, se utilizan modelos *in vitro* e *in vivo* que mimeticen estos microambientes bioquímicos para evaluar la posible acción terapéutica que presentan.

### 3.4. Modelos pre-clínicos de EP

Para el estudio de la EP en modelos *in vivo*, se reproducen algunas características bioquímicas similares a las que se presentan en esta enfermedad, basadas en la posible etiología que la genera. Como algunos de los mecanismos propuestos se basan en el aumento del estrés oxidante y la formación de productos radicalarios y/o la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, muchos modelos optan por el uso de neurotoxinas que logran dicho ambiente, provocando el mal funcionamiento mitocondrial, que desencadena una alta producción de especies deficientes de electrones (Figura 5). También existen otros modelos con diversas estrategias para conseguir una aproximación a la enfermedad, como el modelo de manganeso, con organofosforados, CO, radicales ionizantes e incluso con infecciones virales (Castañeda-Achutiguí, y otros, 2015).

En el caso de los modelos con neurotoxinas, los más estudiados son en roedores, como es el caso de la rata o más comúnmente ratón, ya que la inducción está bien estandarizada y es altamente reproducible (Alarcón-Aguilar, Santamaría del ángel, & Königsberg, 2010). Todos estos modelos actúan sobre el sistema nigroestriatal, depletando los niveles de dopamina y provocando la muerte neuronal debido a las altas concentraciones de radicales libres y especies reactivas (Blandini & Armentero, 2012), ingresando a SNC a través de su paso por BHE por difusión pasiva, como el caso del 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), el paraquat y la rotenona o por su aplicación *in situ* como la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y el metabolito activo del MPTP, el 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>) como se observa en la figura 5 (Alarcón-Aguilar, Santamaría del ángel, & Königsberg, 2010).

La 6-OHDA es un derivado de la dopamina y es la neurotoxina más utilizada para el desarrollo de Parkinson en ratas, sin embargo, debe ser aplicada directamente en los

núcleos neuronales, ya que al ser administrada sistémicamente es capaz de provocar la pérdida neuronal adrenérgica de ganglios simpáticos, pero carece de efecto directo en SNC por no poder cruzar BHE (Maasz, y otros, 2017). Una gran desventaja de este modelo es la necesidad del dominio de cirugía estereotáxica para replicarlo, además del tiempo que requiere para experimentos con grandes grupos experimentales.

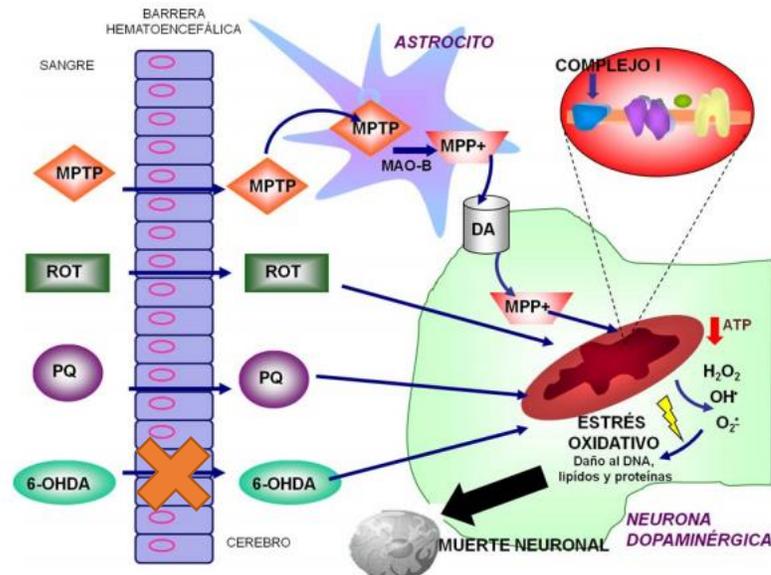
El 1,1-dimetil-4,4-dipiridinio o paraquat (PQ) es un compuesto que fue utilizado en la agricultura como pesticida y molécula de control herbicida para pasto y maleza, que a largo plazo generaba manifestaciones clínicas similares a un fenotipo parkinsonico (Antony, Diederich, & Balling, 2011; Thiruchelvam, Richfield, Baggs, Tank, & Cory-Slechta, 2000).

Tras investigaciones sobre este fenómeno, se determinó que tiene efectos neurotóxicos selectivamente en neuronas dopaminérgicas por su afinidad con los transportadores de dopamina (DAT) y se adaptó como modelo preclínico de EP por tener acción al ser administrada por vía sistémica, (Bobela, Zheng, & Schneider, 2014). Sin embargo, la mayor desventaja de este modelo es que debe ser administrado en muy repetidas ocasiones en bajas dosis para poder replicar una patología parkinsonica, lo que reduce mucho la reproducibilidad (Manning-Bog, y otros, 2002).

La ROT es una toxina de origen vegetal, que al igual que el PQ, se ha utilizado como plaguicida e insecticida, pero debido a su alta lipofiliidad, es capaz de atravesar BHE y provocar la inhibición del complejo I mitocondrial en las neuronas dopaminérgicas (Alarcón-Aguilar, Santamaría del ángel, & Königsberg, 2010), provocando un fenotipo parkinsonico. El modelo murino con esta toxina reproduce algunas características neuroquímicas, histopatológicas y conductuales de la EP, con degeneración en el sistema nigroestriatal, formación de cuerpos de Lewy y deficiencias motoras como hipocinesia (Betarbet, y otros, 2000), pero la inducción, además de implicar una repetida cantidad de administraciones

sistémicas, también tiene una muy alta variabilidad sintomática, lo que dificulta mucho la reproducibilidad e incluso la repetibilidad entre experimentos con esta toxina (Raza, Anjum, & Ain Shakeel, 2019).

Por último, el MPTP es un modelo ampliamente descrito y utilizado para estudiar la EP enfocado en la búsqueda de neuroprotectores asociados con altos niveles de estrés oxidante. Este compuesto es capaz de cruzar BHE por su carácter lipofílico, siendo capturado por los astrocitos y metabolizado a su forma activa  $MPP^+$ , como se describe en las figuras 5 y 6 (Bobela, Zheng, & Schneider, 2014). Justo por esta propiedad, se utiliza en la inducción murina de la EP en administración sistémica por vía intraperitoneal en un esquema de administración entre 5 y 10 días. (Zeng, Geng, & Jia, 2018). Una variante de este modelo es el uso directo de su forma activa, el  $MPP^+$ , pero al ser una molécula catiónica, no es capaz de cruzar BHE, por lo que debe ser administrada por vía intracraneal con cirugía estereotáxica (Antony, Diederich, & Balling, 2011).



**Figura 5. Modelos de la enfermedad de Parkinson basados en neurotoxinas.** Se describen 4 distintos modelos neurotóxicos que son capaces de alterar la integridad bioquímica del circuito nigroestriatal para mimetizar los daños por la EP. Las toxinas 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (**MPTP**), rotenona (**ROT**), paraquat (**PQ**) y 6-hidroxidopamina (**6-OHDA**). Tomado y modificado de Alarcón-Aguilar, et al. *REB* 29(3) 2010

## 3.5. Modelo del MPTP

El descubrimiento de la molécula de MPTP se produjo en 1982, en California, cuando un grupo de adictos a heroína desarrollaron un cuadro subagudo rígido-acinético, que mejoraba con L-DOPA, como ya fue descrito en el apartado anterior. Lo destacable de esta anécdota fue que encontraron que este síndrome era provocado por un análogo contaminante de la heroína, la 1-metil-4-fenil-propionoxipiperidina o MPPP, en mezcla con el MPTP (Castañeda-Achutiguí, y otros, 2015).

### 3.5.1. Mecanismo de acción del MPTP

Los mecanismos a los que se le atribuyen la etiopatología de la EP en el modelo murino inducido por MPTP, están descritos en la figura 6a, donde se muestra cómo la molécula es capaz de llegar por distribución sanguínea hasta los capilares cerebrales, cruzando libremente hacia el parénquima cerebral a través de la BHE (Smeyene & Jackson-Lewis, 2005). Una vez en el parénquima cerebral, llega al interior de los astrocitos por esta misma propiedad lipofílica, por difusión simple, donde por acción de la enzima cortico mitocondrial mono amino oxidasa isoforma B (MAO-B) se oxida hacia la forma catiónica 1-metil-4-fenil-dihidropiridinio (MPDP<sup>+</sup>) seguida de la oxidación espontánea y cuantitativa en presencia de oxígeno molecular, lo que la convierte en el metabolito más activo, el 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>), como se observa en la figura 6b (Castañeda-Achutiguí, y otros, 2015), el cual es expulsado nuevamente al parénquima cerebral por medio del transportador de cationes orgánicos 3 (OCT3) (Wimalasena, 2017).

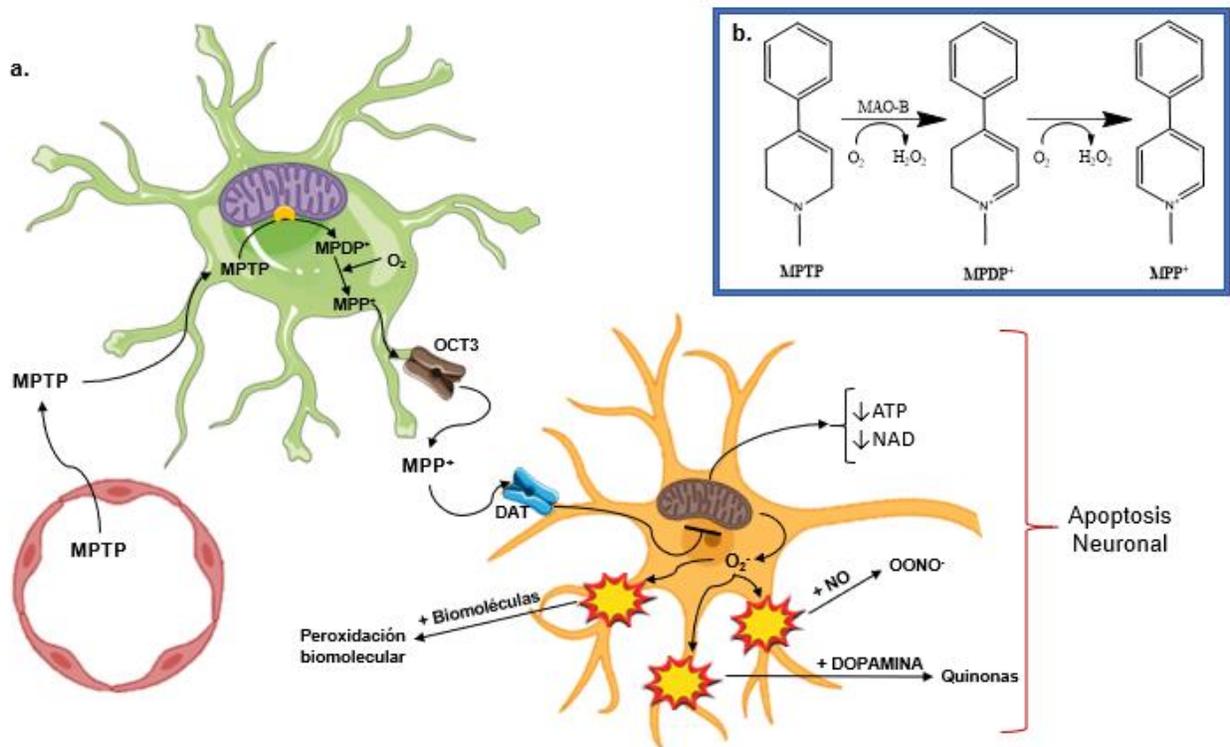
El MPP<sup>+</sup> es captado por las neuronas dopaminérgicas, ya sea por recaptura presináptica o postsináptica, a través del transportador de dopamina (DAT), llegando a la mitocondria

neuronal e inhibiendo la NADH deshidrogenasa o también conocido como el complejo I de la cadena transportadora de electrones (Raza, Anjum, & Ain Shakeel, 2019).

Esta inhibición provoca una disfunción mitocondrial, depletando ATP y NAD, lo que deja sin fuente energética inmediata a la neurona en cuestión, provocando apoptosis en los primeros minutos (Smeyene & Jackson-Lewis, 2005).

Además de la depleción energética, la inhibición del complejo I induce la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERONs), lo cual provoca daño biomolecular al oxidar lípidos, permitir la nitración de proteínas y formar productos finales de glicosilación avanzada, desestabilizando membranas y organelos de esta célula, además de inducir la formación de radicales libres de dopamina y quinonas derivadas, imponiendo un microambiente de extremo estrés oxidante, dañino no sólo para las neuronas blanco, si no todo el entorno celular en SN y CE (Castañeda-Achutiguí, y otros, 2015).

También se ha demostrado que el estrés oxidante y la estimulación directa del MPP<sup>+</sup>, inducen neuroinflamación al detectar el aumento en los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, por todos los efectos pro-inflamatorios generados por el alto estrés oxidante y la activación de la microglía (Smeyene & Jackson-Lewis, 2005).



**Figura 6. Mecanismo de acción del MPTP en el desarrollo del modelo de enfermedad de Parkinson (a.) y su activación química (b.).** Figura realizada con Adobe Photoshop CS6 v13.0 (x32) y CambridgeSoft ChemDraw Professional v15.0.

### 3.5.2. Modelo murino

El efecto neurotóxico del MPTP administrado para su distribución sistémica ha sido demostrada en diversas especies de animales, destacando macacos, gatos y ratones (C57BL/6J) de diferentes edades y en diversas dosis y vías de administración (Castañeda-Achutiguí, y otros, 2015).

Específicamente en ratones, se prefiere el uso de la cepa C57BL/6J ya que es más sensible y alcanza una degeneración en el sistema nigroestriatal relativamente rápido, siendo el modelo más utilizado la administración continua por vía intraperitoneal en una dosis de 30 mg/kg por cinco días consecutivos, como lo describen Pérez-H en 2014, Rezaee en 2018 y Guzman-Ruiz en 2019, entre otros (Guzman-Ruiz, y otros, 2019; Rezaee & Jahromy, 2018; Pérez-H, y otros, 2014). También existen otros esquemas con variantes que van

desde modelos agudos con 20 mg/kg por cuatro días a crónicos de bajas dosis (4 mg/kg) por 20 días de administración (Castañeda-Achutiguí, y otros, 2015).

En general, este modelo se utiliza para el estudio del ambiente bioquímico oxidante y evaluar el posible efecto terapéutico de neuroprotectores, como en el estudio de Pérez-H y colaboradores en 2014, donde se evaluó el efecto neuroprotector vía intraperitoneal de un extracto del cardo mariano, denominado silimarina, en una curva dosis-respuesta del modelo con MPTP de la EP (Pérez-H, y otros, 2014).

## 3.6. Silimarina y Silibina

### 3.6.1. Origen y composición

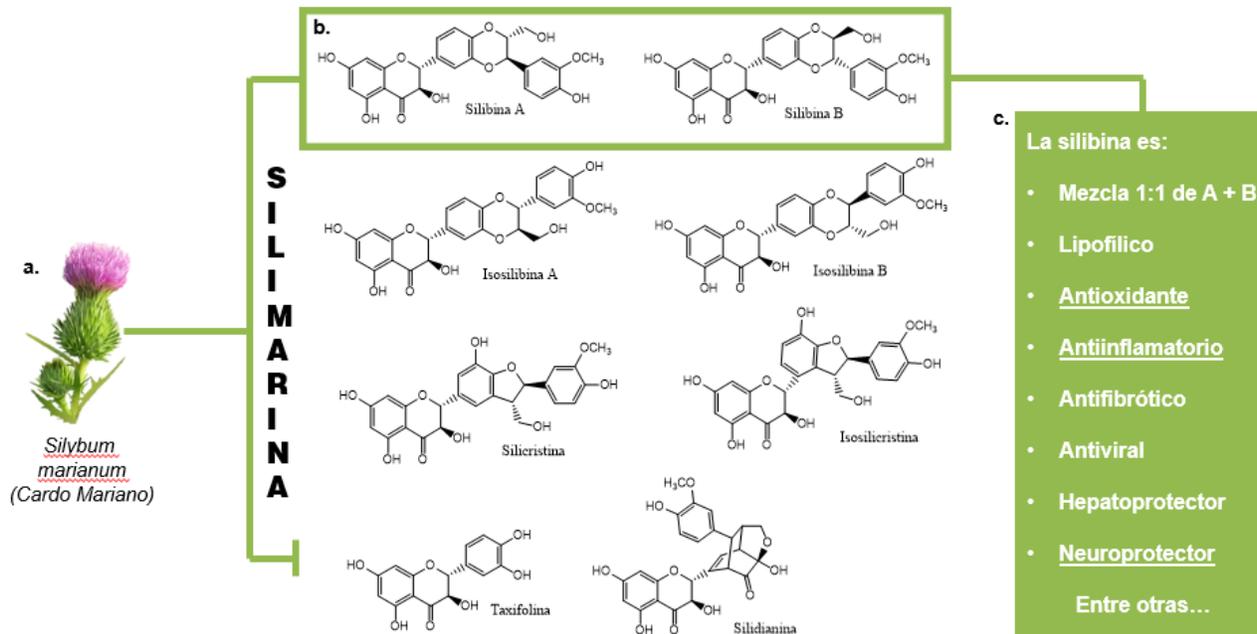
La silimarina es el extracto etanólico de la semilla del *Silybum marianum* o Cardo Mariano, planta originaria de países del mediterráneo y algunas regiones de Asia (Chambers, y otros, 2017; Biedermann, Vavriková, Cvak, & Kren, 2014; Wang, y otros, 2012) (Figura 7a). Se ha reportado en diversos artículos que la silimarina, que es una mezcla de diversos flavonolignanos, tiene numerosas actividades biológicas con posible aplicación terapéutica, como lo son: antioxidante (de Oliveira, y otros, 2015; Singhal, Srivastava, Patel, Jain, & Singh, 2011), antiinflamatorio (Gupta, y otros, 2000), antiapoptótico (Manna, Mukhopadhyay, Van, & Aggarwal, 1999), antifibrótico (Lieber, Leo, Cao, Ren, & DeCarli, 2003), antiviral (Polyak, y otros, 2007), inmunomodulador (Polyak, y otros, 2007), inhibidor de la mono amino oxidasa (I-MAO) en ensayos *in vitro* (de Oliveira, y otros, 2015), además de efectos neuroprotectores en modelos *in vivo* (Li, Sun, Liu, Zhao, & Shao, 2017; Pérez-H, y otros, 2014), entre otros. Originalmente fue descrita en investigaciones clínicas y posteriormente aprobada por la Food & Drug Administration (FDA) de Estados Unidos para su uso como hepatoprotector (U.S. National Institute of Health, 2019) ya que aprovecha

algunas de las propiedades antes mencionadas para restablecer la homeostasis del hígado en situaciones de infecciones virales (Polyak, y otros, 2010), cirrosis (Federico, Dallio, & Loguercio, 2017) y algunas otras hepatopatías (Loguercio & Festi, 2011).

Posteriormente, la investigación de las posibles aplicaciones clínicas de este extracto en otras enfermedades se ha expandido a otras áreas de interés como nefropatías (Loguercio & Festi, 2011), cáncer (Federico, Dallio, & Loguercio, 2017) y como agente neuroprotector en modelos de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (Lu, y otros, 2009) y EP (Pérez-H, y otros, 2014).

Sin embargo, no se tiene claro cómo es que ejerce muchos de los mecanismos de sus efectos ya descritos, ni cuales son específicamente las moléculas responsables de esto, debido a su altamente variada composición. Por otro lado, algunos estudios de identificación molecular en este extracto natural encontraron que el componente principal, que conserva la actividad biológica, es la silibina (Bijak, 2017; Hui-Hui, Yan, Shen, & Hong-Fang, 2016), una molécula con un núcleo de flavonoide y una sustitución de núcleo de lignano. También existen otras moléculas que, en menor proporción, pero por similitud de estructura, podrían estar ejerciendo el mismo efecto e incluso fungiendo como agentes sinérgicos, tal es el caso de la isosilibina, la silidianina y la silicristina, entre otros (Figura 7, Anexo II) (Polyak, y otros, 2010). Sin embargo, la silibina es la más estudiada y a la que se le han comprobado muchos de los mismos efectos que tiene la silimarina (Federico, Dallio, & Loguercio, 2017). La particularidad en la silibina es que existe en dos diastereoisómeros, denominados silibina A y silibina B en una mezcla racémica dentro de la silimarina, es decir, en una proporción 1:1 (Figura 7b) (Dewick, 2009; Merlini, Zanarotti, Pelter, Rochefort, & Hänsel, 1980). Dado que en la actualidad la silimarina está aprobada por la FDA (U.S. National Institute of Health, 2019) para su uso como hepatoprotector, y debido a que ya se

han establecido los parámetros de toxicidad y su margen terapéutico, es posible pensar en el uso de su molécula más bioactiva para su estudio como posible fármaco para su uso en diferentes enfermedades, en especial en las neurodegenerativas como la EP (Pérez-H, y otros, 2014).

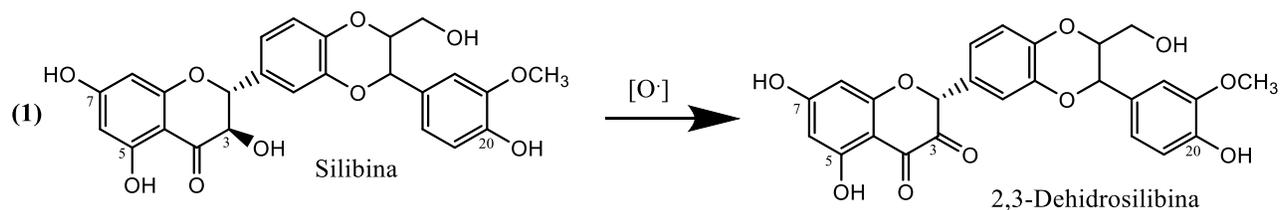


**Figura 7. Origen, estructura y funciones de la silibina.** De la planta *Silybum marianum* o cardo mariano (a.) se puede obtener el extracto etanólico, denominado silimarina, el cual es una mezcla de muchos polifenoles, flavonolignanos, terpenos, entre otros. La más estudiada es la silibina (b.), a la que se le adjudican muchas propiedades terapéuticas como antioxidante, anti-inflamatorio, neuroprotector, entre otras (c.). Figura realizada con Adobe Photoshop CS6 v13.0 (x32) y CambridgeSoft ChemDraw Professional v15.0.

### 3.6.2. Perfil químico

La silibina ( $C_{25}H_{22}O_{10}$ ) se encuentra en una mezcla equimolar de sus dos estereoisómeros silibina A y B (CAS no. 22888-70-6) en el extracto del cardo mariano (Figura 7b); es una molécula pequeña (482.441 g/mol) y funcionalizada con heterociclos y cicloalquenos (Biedermann, Vavriková, Cvak, & Kren, 2014; Bijak, 2017). Esta molécula es estable en soluciones ácidas, pero es susceptible a hidrolizarse en condiciones altamente alcalinas, también es resistente a la reducción, pero se oxida muy fácilmente a 2,3-dehidrosilibina (Ecuación 1), propiedad a la que se le atribuye su efecto biológico como antioxidante

(Trouillas, y otros, 2008), además el calentamiento a más de 100°C y bases fuertes pueden disrumpir la estructura de este compuesto (Biedermann, Vavriková, Cvak, & Kren, 2014).



**Ecuación 1.** Reacción de oxidación de la silibina para la formación de 2,3-Dehidrosilibina. Se marcan las posiciones de los alcoholes fenólicos y secundarios de cada estructura.

En su estructura, la silibina contiene cinco grupos hidroxilo, que pueden clasificarse en tres tipos diferentes: alcohol fenólico (3), alcohol primario (1) y alcohol secundario (1) (Biedermann, Vavriková, Cvak, & Kren, 2014). En el contexto de los 3 grupos hidroxilo fenólicos, se tienen uno en posición 5, otro en la posición 7 y uno más en la posición 20 (Ecuación 1). El grupo que se encuentra en la posición 5 en el anillo de taxifolina es el que tiene más fuerza de enlace, al estar al lado de un grupo oxo, lo que le da estabilidad por resonancia, mientras que el hidroxilo en posición meta a éste, es decir, el carbono con el OH en posición 7, es el más oxidable, capaz de retener las especies reactivas como radicales libres y EROS (Bijak, 2017). El hidroxilo en posición 20 también es capaz de ejercer funciones captoras de especies reactivas, pero lo hace en menor proporción (Biedermann, Vavriková, Cvak, & Kren, 2014). A diferencia del alcohol fenólico en posición 5, el alcohol secundario de la posición 3, al no estar en un sistema aromático, se ve poco influenciado por el grupo oxo que tiene al lado, por lo que éste sí es fácilmente oxidable, dando origen a la 2,3-Dihidrosilibina (2,3-DHS, Ecuación 1), que también tiene propiedades bioactivas y su formación es índice de la función de la silibina como antioxidante (Bijak, 2017).

A pesar de contener muchos grupos hidroxilos ionizables, su sistema flavonoide aromático le impide ser soluble en agua, por lo que es altamente lipofílico y tiene poca solubilidad en

solventes polares próticos como etanol y metanol, y en solventes no polares como el cloroformo, pero sí es soluble en solventes polares apróticos como acetona y DMF, además ésta propiedad mejora en valores de pH mayores a 5.5 y calentamiento mayor a 37°C (Biedermann, Vavriková, Cvak, & Kren, 2014).

### 3.6.3. Perfil farmacológico

Tras una administración por la vía oral, la silibina es capaz de llegar a la circulación enterohepática por absorción intestinal (Bijak, 2017). Tiene una vida media de eliminación de aproximadamente 6 horas (Saller, Brignolli, Melzer, & Meier, 2008), entre el 6-8% de la dosis oral es excretada sin metabolizar a través de la orina, el 80% se conjuga con las sales biliares en glucorónidos o sulfatados y entre el 20-40% del total es reabsorbida, el resto se excreta por vía fecal (Bijak, 2017; Saller, Brignolli, Melzer, & Meier, 2008; Wu, Lin, Hung, Chi, & Tsai, 2007). La cantidad de silibina que llega a hígado por la vía portal pasa por las fases I y II del metabolismo hepático, interactuando con algunos citocromos (CYP) como el CYP450 2C8 que la convierte en O-demetilsilibina en los hidroxilos 7 y 20 con la misma eficiencia, sin embargo, en ensayos in vitro se ha demostrado que es inhibidor de ciertos CYP como CYP450 1A2, 2D6 y 3A4 (Beckmann-Knopp, y otros, 2000).

Debido a que su biodisponibilidad cuando es administrada por vía oral es baja y a su alto grado de lipofilicidad, se hicieron estudios con acarreadores lipídicos como la fosfatidilcolina y  $\beta$ -ciclodextrinas (Javed, Kohli, & Ali, 2011), las cuales mejoraron considerablemente esta biodisponibilidad, por lo que, en la actualidad, se puede encontrar comercialmente conjugado con ambos acarreadores (Saller, Brignolli, Melzer, & Meier, 2008). Algunos otros solventes orgánicos no conjugados que se han probado y que funcionan como acarreadores son etanol, polisorbato 20, glicerol y mono oleato de glicerol (Javed, Kohli, & Ali, 2011).

### 3.6.4. Efecto neuroprotector de la silibina

Como ya se abordó en apartados anteriores, la silimarina tiene diversos efectos biológicos, además, los estudios con la silibina confirman la posibilidad terapéutica de este compuesto, ya que conserva muchos de los efectos de la silimarina, destacando su papel como antioxidante, anti-inflamatorio y su calidad de neuroprotector (Figura 7c). Si bien se atribuyen muchos otros posibles efectos para la molécula de silibina, el más destacado es como antioxidante, el cual está comprobado y que, por la patología de muchas enfermedades, funge como molécula protectora ante el ambiente generado por el estrés oxidante (Hui-Hui, Yan, Shen, & Hong-Fang, 2016; Surai, 2015). En el caso de las enfermedades neurodegenerativas, el estrés oxidante es un factor con gran impacto como etiología, por lo que el uso de la silibina para capturar las ERONs y radicales libres del medio en enfermedades como Alzheimer, EP o esclerosis múltiple se vuelve cada vez más viable, como lo han demostrado los ensayos pre-clínicos (Saller, Brignolli, Melzer, & Meier, 2008). Un estudio de Lu y colaboradores en 2009 demostró en ensayos in vivo, que la silibina es capaz de evitar la agregación de proteínas como el péptido  $\beta$ -amiloide, característico del Alzheimer, además de mejorar las disfunciones en memoria, aprendizaje y reduciendo niveles de estrés oxidante (Lu, y otros, 2009), esto último posiblemente por mecanismos como los propuestos por Trouillas y Groot en sus estudios de 2008 y 1998 respectivamente como antioxidante, captando radicales libres (Trouillas, y otros, 2008; De Groot & Rauen, 1998), o la activación de defensas antioxidantes, incrementando la síntesis de glutatión intracelular (Valenzuela, Aspillaga, Vial, & Guerra, 1989), y superóxido dismutasa (Müzes, y otros, 1991).

En el caso del estudio de Pérez-H de 2014, se evaluó a la silimarina como neuroprotector por vía intraperitoneal en un modelo murino con la toxina MPTP, destacando que en una

curva dosis dependiente, la cantidad de 100 mg/kg conserva los niveles de dopamina aproximadamente un 60%, además de demostrarse una disminución significativa en el número de células apoptóticas y la preservación de neuronas de la sustancia nigra (Pérez-H, y otros, 2014). También, en un estudio realizado por Molz en 2018 junto con sus colegas, demostraron que la silimarina mejoraba los déficits motores en ratas con modelo de EP inducidos con 6-OHDA, lo que da un antecedente terapéutico adicional (Molz, y otros, 2018). Por estas razones, es de interés la evaluación de la molécula más activa de la silimarina, la silibina, en otras vías de administración más efectivas y viables clínicamente que la intraperitoneal, propuesta en el artículo previamente mencionado.

### 3.7. Influencia de las vías de administración



**Figura 8. Vías de administración.** Representación gráfica de las rutas de administración usadas en el diseño experimental, empleadas sobre ratones C57BL/6J, donde la vía intraperitoneal (a.) es la utilizada para la administración de la pro-neurotoxina MPTP y la reportada con efecto neuroprotector para la silimarina por Pérez-H et al, en 2014; la vía oral (b.) y la vía intranasal (c.) son las rutas por las cuales se evalúa el potencial efecto neuroprotector de la silibina. Figura realizada con BioRender App.

La vía de administración y distribución de un fármaco es un factor muy importante que considerar para la terapéutica en cualquier enfermedad, ya que depende del tejido blanco y del perfil fisicoquímico del fármaco para la correcta elección de una vía de administración. Por ejemplo, una tableta en vía oral difícilmente llegará al oído, pero si es un órgano altamente irrigado, como el hígado, cualquier vía que tenga distribución sanguínea, como

la vía oral, intraperitoneal o intravenosa, será capaz de acarrear la sustancia activa y ejercer el efecto terapéutico (Sinko , 2011), mientras que la solución ante el tratamiento en el oído, es la aplicación *in situ*, o vía ótica. A pesar de que algunas vías de administración tienen acción local, terminarán en una distribución sistémica por el contacto con torrente sanguíneo, pero que llegarán a su efecto con diferentes cinéticas, como lo describe los ejemplos de la tabla 3 (Duquesnoy, Mamet, Summer, & Fuseau, 1998). En esta tabla se describe que el mismo fármaco, administrado en diferentes vías de administración en humanos, tiene diferentes tiempos de distribución y es capaz de llegar a concentraciones plasmáticas diferentes a tiempos diferentes, destacando que las vías Oral (VO) e intranasal (IN) son las que tienen mayor distribución prolongada del sumatriptan y con mejor biodisponibilidad relativa. Por otro lado, en la tabla 5 se hace un estudio similar, pero con un péptido sintético en un modelo de ratón (Novakovic, Leinung, Lee, & Grasso, 2009), destacando que la vía intranasal es óptima para la administración de moléculas grandes cuando se hace el comparativo a una misma dosis en todas las rutas (Subcutánea, IP, VO, Intramuscular e IN), ya que en IN se alcanzan mayores concentraciones en un menor tiempo, con un cambio mínimo en la velocidad de depuración y en el tiempo de distribución (Novakovic, Leinung, Lee, & Grasso, 2009).

Debido a que el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o la EP requieren de dosis crónica del fármaco, se requiere de una forma de administración cómoda a largo plazo que reduzca la posibilidad de deserción del tratamiento, es por ello que se desean evaluar dos vías que pueden ser de interés en la perspectiva clínica, con el uso de la silibina como lo describe Pérez-H en 2014 con la silimarina, pero cambiando la vía IP, por la VO e IN. De esta última, se tienen antecedentes como una buena alternativa para la administración crónica de fármacos como describen Chauhan & Chauhan en 2015,

donde hablan de las investigaciones recientes en moléculas orgánicas bioactivas, péptidos terapéuticos, hormonas y extractos bioactivos de plantas (Chauhan & Chauhan, 2015). Por otro lado, el acceso a SNC por la vía sanguínea tiene como impedimento el cruce de la BHE, la cual es muy selectiva para el cruce de las moléculas y retarda más el arribo del fármaco al órgano diana, que es el cerebro (Dhuria, Hanson, & Frey, 2010). Sin embargo, existen moléculas que por su naturaleza lipofílica, pueden cruzar por vía transcelular las células del endotelio y llegar sin impedimentos de la selectividad de la BHE, como es el caso de la silibina (Bijak, 2017), por lo cual es posible que la silibina sea capaz de llegar a SNC también cuando se administra por vía oral, ya que tras su distribución enterohepática, llegará a circulación sistémica y podrá llegar al cerebro, atravesando BHE sin inconvenientes de selectividad.

**Tabla 3.** Comparación en dosis y cinética de diferentes vías de administración de sumatriptan, tomado y modificado de *Duquesnoy, 1998*

Parámetro	Vía de administración			
	Subcutáneo 6 mg	Oral 25 mg	Supositorio 25 mg	Intranasal 20 mg
C <sub>max</sub> (ng/mL)	69.5	16.5	22.9	12.9
C <sub>max</sub> /AUC (h <sup>-1</sup> )	0.77	0.31	0.32	0.27
AUC (h.ng/mL)	9.0	8.7	14.6	7.4
T <sub>max</sub> (h)	0.17	1.5	1.0	1.5
F (% vs SC)	-	14.3	19.2	15.8
T <sub>1/2</sub> (h)	1.9	1.7	1.8	1.8
Cl <sub>r</sub> (min <sup>-1</sup> )	0.22	0.17	0.17	0.21

\* F = Biodisponibilidad relativa a subcutáneo, T<sub>max</sub> = tiempo en que se alcanza la concentración máxima de fármaco en sangre, C<sub>max</sub> = concentración máxima del fármaco en sangre, AUC = área bajo la curva de cada administración, t<sub>1/2</sub> = Tiempo de vida media, Cl<sub>r</sub> = Depuración renal.

**Tabla 4.** Comparación en dosis y cinética de diferentes vías de administración de un péptido sintético, tomado y modificado de *Novakovic et al, 2009*

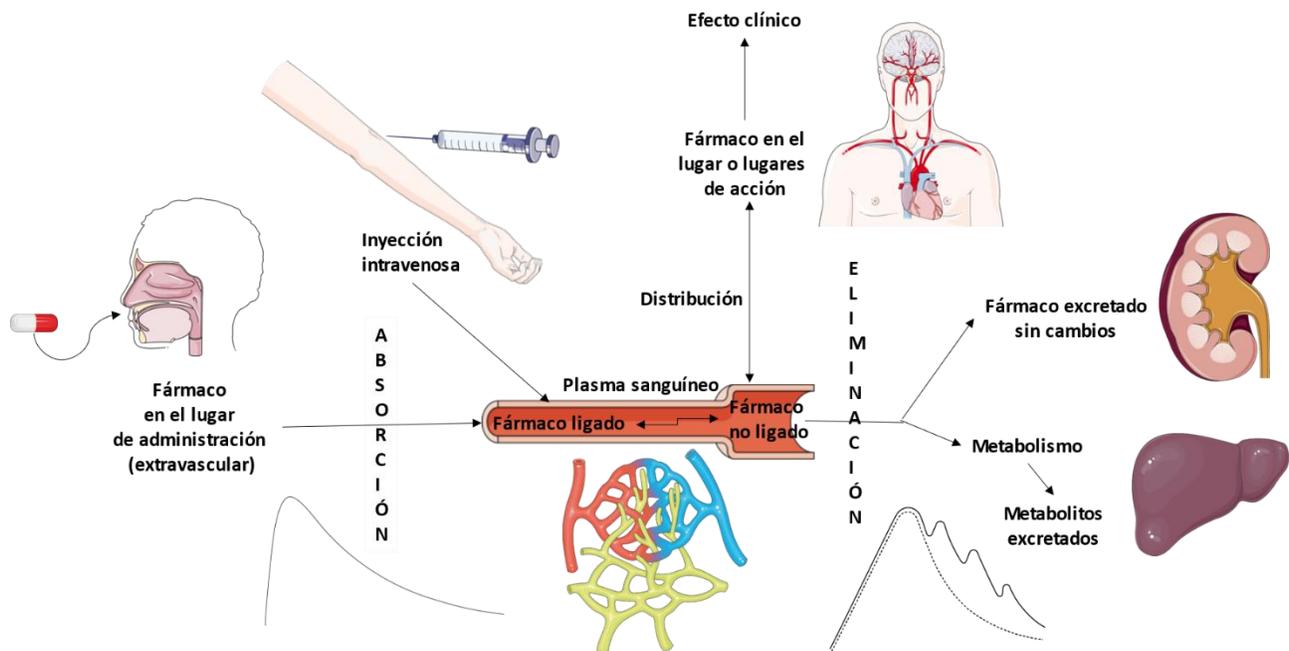
Parámetro	Vía de administración			
	Intraperitoneal 1 mg	Oral 1 mg	Intramuscular 1 mg	Intranasal 1 mg
C <sub>max</sub> (ng/mL)	22.51	35.06	46.57	91.73
C <sub>max</sub> /AUC (min <sup>-1</sup> )	0.021	0.030	0.031	0.099
AUC (min.ng/mL)	1072.27	1182.498	1481.060	923.95
T <sub>max</sub> (min)	5	5	5	10.0
F (% vs IP)	-	1.1	1.4	4.0
T <sub>1/2</sub> (min)	48.8	34.0	30.0	7.0
Cl <sub>r</sub> (min <sup>-1</sup> )	0.93	0.85	0.68	1.08

\* F = Biodisponibilidad relativa a subcutáneo, T<sub>max</sub> = tiempo en que se alcanza la concentración máxima de fármaco en sangre, C<sub>max</sub> = concentración máxima del fármaco en sangre, AUC = área bajo la curva de cada administración, t<sub>1/2</sub> = Tiempo de vida media, Cl<sub>r</sub> = Depuración renal.

### 3.7.1. Vía oral

Por años, la vía de administración oral ha sido la más utilizada para la terapéutica, ya que, como se ve en la tabla 5, ofrece bastantes ventajas que dan comodidad al paciente para tomar la dosis que le corresponde (Lozano, Córdoba , & Córdoba , 2012). Si bien, hay algunas que tiene como intención disolverse en la boca y aprovechar vías como la sublingual, la mayoría son engullidas para que sean absorbidas gástrica o intestinalmente y ejerzan efecto sistémico, mientras que, algunas otras como los antiácidos, provocarán efectos locales, pero no son dependientes de la absorción para lograr su objetivo (Ansel, 2011). Existen muchas formas farmacéuticas aplicables a la VO, dependiendo de la naturaleza y estabilidad de cada fármaco, desde tabletas con contenido granulado sólido, pasando por cápsulas con contenidos líquidos o sólidos, hasta la aplicación directa de soluciones, emulsiones o suspensiones (Ansel, 2011; Lozano, Córdoba , & Córdoba , 2012), sin embargo, también se tiene que considerar la biodisponibilidad, absorción, cinética y distribución fármaco, además del metabolismo que pueda sufrir por enzimas y ambientes ácidos u oxidantes en el tracto gastro intestinal (TGI) (Ansel, 2011). Para que el fármaco tenga éxito tiene que resistir el ácido estomacal ( $\text{pH} = 1 - 2$ ) y álcali intestinal ( $\text{pH} > 8$ ), las enzimas digestivas, el efecto de primer paso o metabolismo hepático y la quelación de la molécula por proteínas y biomoléculas como la albúmina o restos de comida (Aulton, 2004). Debido a que el ser humano cuenta hasta con 5 metros de intestino delgado, conformado por pliegues que aumentan el área de contacto, la absorción por este tejido puede ser una gran ventaja para aprovechar la dosis completa de un fármaco, el cual, si es de naturaleza lipofílica, será captado en mayor proporción (Lozano, Córdoba , & Córdoba , 2012)

Todo el proceso que pasa un fármaco desde su absorción, distribución, metabolismo y hasta su eliminación (ADME), es estudiado por la farmacocinética (Aulton, 2004) y están representadas en la figura 9. Ya se han reportado estos parámetros para la silimarina en humano (Sornsuvit, y otros, 2018), pero en el caso de la silibina sólo han sido descritos en ratas y ratones (Marhol, y otros, 2015) y se ha comprobado que en efecto la silibina tiene capacidad de ser absorbida y distribuida en su administración por la VO, concluyendo que es una vía válida para la administración en el estudio de su efecto neuroprotector.



**Figura 9. Fenómenos estudiados por la farmacocinética.** Representación esquemática de la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de los fármacos cuando son administrados por la vía del tracto gastro intestinal. Tomado y modificado del libro Aulton, *Farmacología, la ciencia del diseño de formas farmacéuticas*, Elsevier: 2004

### 3.7.2. Vía intranasal

En los últimos años, la vía de administración intranasal ha sido considerada como una alternativa viable para la administración de diversos agentes terapéuticos, debido a la facilidad que tiene en su acceso y por la efectividad que ha demostrado (Hernández-Ramírez, 2011; Taylor, 2004). Es una vía simple ya que la aplicación no resulta molesta ni invasiva para el paciente, como puede ser la administración subcutánea (SC), intramuscular

(IM) o IP, y se puede emplear tanto para acción local como para acciones sistémicas. También en investigaciones actuales se ha usado de forma dirigida en un eje conocido como sistema de entrega nariz a cerebro o “Nose to Brain Delivery System” en inglés (Musumeci, Pellitteri, Spatuzza, & Puglisi, 2014; Chhajed, Sangale, & Barhate, 2011). Este sistema de aplicación de fármacos evita la degradación provocada por los ambientes extremos de oxidación química e hidrólisis enzimática de la vía oral, además del metabolismo ejercido por el hígado, conocido como “efecto de primer paso” o “biotransformación hepática” (Mittal, y otros, 2014; Peeters & Córdoba Díaz, 2012).

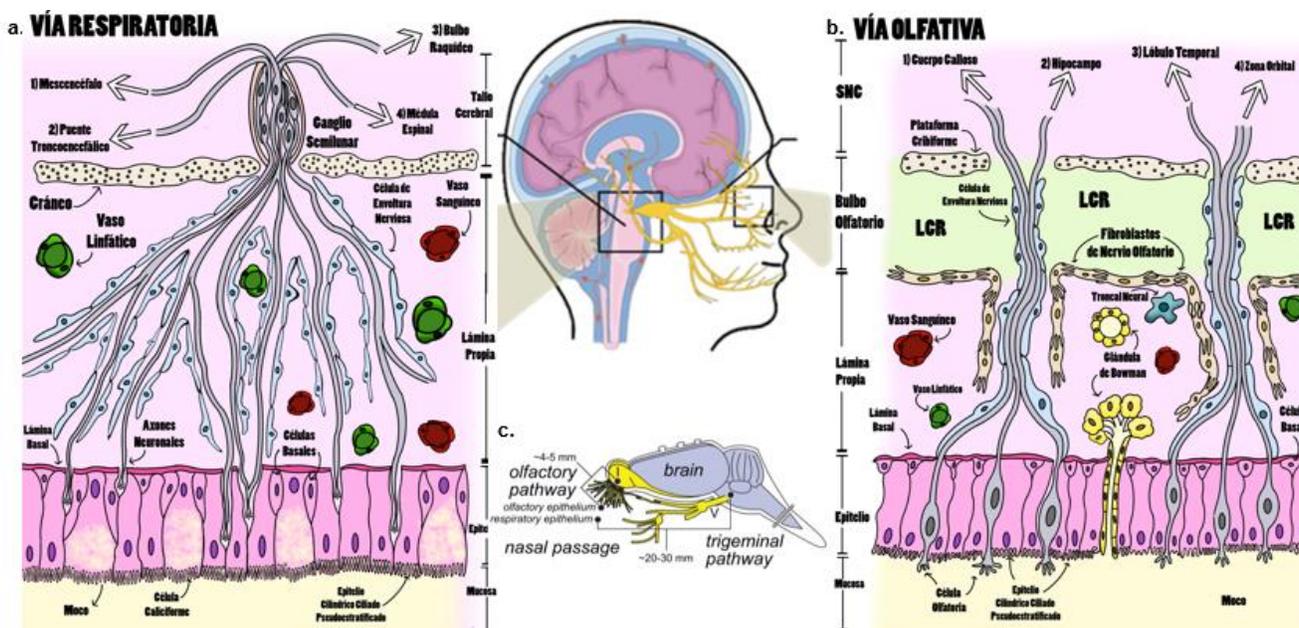
Las vías de ingreso desde el epitelio no han sido totalmente dilucidadas, sin embargo, una gran cantidad de información se ha reportado sobre los posibles mecanismos de ingreso y seguimiento hasta muchas de las áreas cerebrales que serían inaccesibles por moléculas que no atraviesan BHE, involucrando el transporte intra-axonal por parte de las neuronas de algunos nervios en la mucosa olfativa y respiratoria, la distribución por líquido cefalorraquídeo, microvasculatura del epitelio nasal y vías de distribución linfática hasta los conductos meníngeos (Dhuria, Hanson, & Frey, 2010; van Woesel, y otros, 2013).

La fosa nasal tiene dos zonas de interés en el estudio de esta vía de administración: la primera es la región respiratoria (Figura 10a), donde residen células cilíndricas ciliadas pseudoestratificadas y células caliciformes, encargadas de la producción de moco, que conforman el epitelio de esta región, así como pequeñas extensiones de los axones neuronales del nervio trigémino, que son las que se creen que captan las moléculas administradas y las transportan hacia el mesencéfalo y otras regiones cerebrales, pero también posee microvasculaturas y conexiones de vasos linfáticos que pueden drenar las moléculas que no hayan sido captadas por estas neuronas (Lochhead & Thorne, 2012). En esta región, los cilios son una barrera física que vencer, para evitar el drenado del sistema

administrado, además de la adhesividad provocada por los componentes del moco secretado por las células caliciformes (Musumeci, Pellitteri, Spatuzza, & Puglisi, 2014; Parvathi, 2012).

La segunda zona es la que tiene mayor impacto en el eje nariz a cerebro, la región olfatoria (Figura 10b), que tiene una capa de células cilíndricas pseudoestratificadas, intercaladas con extensiones de células olfatorias, que conforman los nervios olfatorios. Estas células son más receptivas y tienden a transportar las moléculas del ambiente, percibiendo los aromas del medio. Este mecanismo es aprovechado para una mayor captación de la molécula terapéutica, la cual es transportada tanto intracelularmente como en el perineuro, es decir, en la matriz extracelular que conforma el nervio olfatorio. El primer blanco de distribución es el bulbo olfatorio, pero subsecuentemente, es capaz de arribar a núcleos como el cuerpo caloso, el hipocampo, el lóbulo temporal y otras zonas de interés en enfermedades neurodegenerativas y otros campos de las neurociencias (Mittal, y otros, 2014; Lochhead & Thorne, 2012; Dhuria, Hanson, & Frey, 2010).

Entre los medicamentos aplicados por la vía intranasal que se han evaluado recientemente, se encuentran los antihistamínicos para el tratamiento de la rinitis alérgica, medicamentos como el fentanilo para una rápida y efectiva terapia analgésica, vacunas y fármacos para el tratamiento en desórdenes del SNC (Hernández-Ramírez, 2011).



**Figura 10. Mecanismos de entrada para la vía intranasal.** Se muestran la vía respiratoria (a.) y olfativa (b.) que se utilizan en la administración de fármacos por la vía intranasal en humanos, arribando a una mucosa, cruzando por sus respectivos epitelios y llegando a SNC tanto por vías intraneuronales como sanguíneos y por líquido cefalorraquídeo hasta SNC. Se muestra un esquema extraído del artículo de Lochhead en 2012 (c.), donde interpreta estas mismas vías de forma integral, pero en el modelo murino. Figuras a. y b. realizadas con Photoshop CS6 v13.0 (x32) y c. fue extraída de *Lochhead et al, Adv Drug Deliv Rev, 64 (2012)*.

Los ejemplos más destacables que reporta Mittal en su artículo de 2013, son la Bromocriptina, que es un agonista de los receptores D2, para el tratamiento en las fluctuaciones motoras por el LID, molécula que no es capaz de atravesar la BHE pero que aplicada por IN resulta efectiva para la terapia en la EP. El clorhidrato de bupiriona, utilizado como ansiolítico causado por síndrome de abstinencia por alcohol o tabaco, cuya formulación intranasal optimiza hasta en 2.5 veces la dosis empleada en VO y que tiene efectos neuroprotectores en eventos de isquemia o hemorragia cerebral, fungiendo como quelante de alta afinidad con el hierro, previniendo gran parte del daño postinfarto, con sólo el empleo de dosis cercanas a 6 mg e incluso de Rivastigmina, inhibidor de la acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Mittal, y otros, 2014). En conclusión, la vía intranasal es capaz de mejorar la

biodisponibilidad de los fármacos (Tabla 6), reducir la dosis respecto a otras vías como la oral y de arribar directamente hasta SNC (Mittal, y otros, 2014), ofreciendo una alternativa en el uso de moléculas con propiedades terapéuticas en diferentes enfermedades y patologías asociadas a SNC.

Con lo anterior, es de interés evaluar la capacidad neuroprotectora de la molécula de silibina por vías de administración escalables a la clínica, como las vía oral e intranasal para optimizar dosis, comparar efectos en la disminución de depleción de dopamina y plantear la mejora en el estado de estrés oxidante, función motora e incluso un abordaje a la neuroinflamación que se presenta en la EP, evaluándolo con un ensayo preclínico murino con la neurotoxina MPTP, siguiendo el mismo esquema reportado en el artículo de Pérez-H para tener una capacidad comparativa de las curvas dosis-respuesta.

**Tabla 5.** Ventajas y limitantes de las 3 vías de administración de fármacos en tratamientos crónicos.

<b>Factores para considerar</b>	<b>Intraperitoneal (IP)</b>	<b>Oral (VO)</b>	<b>Intranasal (IN)</b>
Absorción	Alta	Lenta	Rápida
Administración	Difícil	Sencilla	Sencilla
Autoadministración	No	Sí	Sí
Invasividad	Mucho	No	No
Biodisponibilidad	Alta	Variable	Alta
Área de contacto	Corta	Muy extensa	Corta
Cruce por epitelio intestinal	No	Sí	No
Efecto de primer paso	Sí	Sí	No
Cruce por BHE	Sí	Sí	No
Efecto terapéutico rápido	Sí	No	Sí
Riesgo a eventos adversos	Alta	Media	Baja
Forma de entrada a SNC	Sanguíneo	Sanguíneo	Transcelular
Interferencias por alergias o gripe	No	No	Sí
Dosis relativas de fármaco	Moderadas	Altas	Bajas
Dependencia del peso molecular	No	Sí	Sí
Irritan en administraciones crónicas	Sí	Sí	Sí
Administrable en neonatos y adultos mayores	Sí	No	Sí

## 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente en la etapa adulta. Se estima que mundialmente se presenta entre el 1 y 2% de la población mayor de 60 años y que en el 2040 más personas morirán con EP, Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica que de cáncer de riñón, colon, pulmón y melanoma maligno (Fernández, 2012). En México es el cuarto motivo de consulta en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía debido a la cronicidad del padecimiento y al manejo específico que requiere, ya que se considera una prevalencia de 40-50 casos por cada 100,000 habitantes (Secretaría de Salud, 2010). Las manifestaciones clínicas de la EP son causadas por un déficit de dopamina, el cual es secundario a la pérdida de las neuronas dopaminérgicas. Actualmente la terapia farmacológica de la EP está centrada en la restitución de los niveles de dopamina con levodopa, sin embargo, esta terapia sólo es efectiva durante los primeros años del tratamiento ya que la mayoría de los pacientes presentan resistencia a la levodopa (Thanvi & Lo, 2004), por lo que es necesario encontrar nuevas alternativas terapéuticas. La silimarina, un extracto estandarizado de las semillas y frutas de la planta *Silybium marianum*, contiene una mezcla de flavonolignanos con propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias, neuroprotectoras, entre otras (Wellington & Jarvis, 2001).

Previamente en el laboratorio se ha demostrado que la silimarina administrada por vía intraperitoneal disminuye la muerte celular apoptótica en la sustancia nigra, conserva las neuronas dopaminérgicas manteniendo los niveles de dopamina estriatal en un modelo murino de la EP (Pérez-H, y otros, 2014). De igual forma, se ha documentado que la silibina, el flavonolignano bioactivo más abundante de la silimarina, conserva sus efectos antioxidantes, anti-inflamatorios y antiapoptóticos (Trouillas, y otros, 2008), por lo cual es

de interés la evaluación de la molécula como posible fármaco, comparado con la mezcla de compuestos conocidos y desconocidos que conforman a la silimarina.

La vía de administración intraperitoneal planteada por Pérez-H, no es la más conveniente en una escala hacia la posible aplicación clínica, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas estrategias que puedan mejorar la administración y biodisponibilidad de la silibina como candidato para el tratamiento de la EP. Dos alternativas a la vía de administración intraperitoneal son, en primer lugar, la vía de administración oral, la cual se ocupa más recurrentemente para los tratamientos crónicos, considerando que se debe cumplir con ciertos requisitos para su uso, como la absorción intestinal, la baja degradación a enzimas y ambiente ácido estomacal, entre otras (Vila Jato, 2008). Y, en segundo lugar, la dosificación por vía intranasal, ya que presenta diversos mecanismos reportados de arribo directo de moléculas a SNC (Crowe, Greenlee, Kanthasamy, & Hsu, 2018), independientes de la barrera hemato encefálica (BHE) (Dhuria, Hanson, & Frey, 2010).

## 5. HIPÓTESIS

La silibina mantiene su efecto neuroprotector, por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, cuando es administrada tanto por vía oral como por vía intranasal, en un modelo murino de la EP inducida con la pro-neurotoxina MPTP.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. Objetivo general

Determinar el efecto neuroprotector de la silibina administrada por las vías oral e intranasal en un modelo murino de la enfermedad de Parkinson.

## 6.2. Objetivos particulares

Determinar:

- a. Los niveles de dopamina estriatales por la técnica de HPLC posterior a la administración de diferentes dosis de silibina por las vías intranasal (5, 10, 25 y 50 mg/Kg) y oral (100, 200, 300, 400 y 500 mg/Kg) en el modelo de EP con MPTP para la construcción de una curva dosis-respuesta.
- b. El estado funcional de la cadena respiratoria y función mitocondrial de la sustancia nigra y el cuerpo estriado con el ensayo de MTT para los ratones tratados con la dosis más efectiva de silibina por las vías intranasal y oral para el modelo de MPTP.
- c. El daño en membrana lipídica de la sustancia nigra y el cuerpo estriado provocado por el estrés oxidante generado por el modelo de EP con MPTP a través de la cuantificación de malondialdehído con el ensayo de TBARS en los ratones tratados con la dosis más efectiva de cada vía de administración.
- d. El ambiente pro-inflamatorio consecuente al daño neuronal en ambos núcleos neuroanatómicos, sustancia nigra y cuerpo estriado, estimado con la cuantificación de la citocina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$  por la técnica de ELISA en las fracciones solubles de ambas áreas cerebrales en los ratones tratados con la dosis más efectiva de ambas vías de administración en el modelo de EP con MPTP.
- e. La sobrevida neuronal indirectamente por medio de la cuantificación de niveles del factor neurotrófico BDNF en las fracciones solubles de sustancia nigra y cuerpo estriado, determinados por ELISA en los ratones tratados con la dosis más efectiva de ambas vías de administración en el modelo de EP con MPTP.

- f. La mejora motriz en los ratones tratados con la dosis más efectiva de ambas vías de administración en el modelo de EP con MPTP para las pruebas de:
- Bradicinesia y coordinación motora gruesa con la prueba de descenso en tubo.
  - Coordinación orofacial con la prueba de latencia de construcción de nido.
  - Coordinación motora fina con la prueba de caminata sobre rejilla.
  - Fuerza muscular, equilibrio y coordinación motora de agarre con la prueba de reflejo de tracción.
- g. El contraste de todos los resultados obtenidos para ambas vías y determinar cuál de ellas es la mejor ruta de administración para la silibina, así como contrastar con lo reportado por Pérez-H et al en 2014 sobre la vía intraperitoneal con la silimarina.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Animales

Los procedimientos fueron realizados en ratones macho de la cepa C57BL/6J (Harlan) de 20-25 gramos de peso, mantenidos en un ciclo de luz-obscuridad 14/10 horas, con agua y comida *ad libitum*, así como humedad relativa del 40% y temperatura de cuarto  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , en grupos de 3 con cajas de policarbonato y dieta comercial estandarizada (Laboratory rodent diet 5001, PMI Feed Inc., Richmond, IN). Los animales fueron proporcionados por el bioterio de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM.

## 7.2. Ética

Se dispuso de un seguimiento riguroso de los rubros planteados por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para el manejo de los animales. Este proyecto cuenta con registro FM/DI/127/2018 ante el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), fue revisado y aprobado por las Comisiones de Investigación y de Ética de la división de investigación de la Facultad de Medicina, UNAM. Oficio NO. FMED/CI/RGG/053/2019 (Anexo I).

## 7.3. Diseño experimental

Los grupos se diseñaron en tres esquemas de tratamiento de acuerdo con las pruebas que se realizaron:

- Curva dosis-respuesta para la determinación de dopamina estriatal de las rutas de administración oral e intranasal de la silibina (Figura 11a). Los grupos fueron divididos en control de vehículos (C), control de neurotoxina sin tratamiento (M), dosis respectivas de silibina por vía intranasal (MS5, MS10, MS25 y MS50) y por vía oral (MS100, MS200, MS300, MS400 y MS500).
- Cuantificación de marcadores de daño celular para las dosis más efectivas de ambas rutas de administración en los ensayos de MTT y TBARS en CE y SN). Los grupos fueron divididos en control de vehículos (C), control de neurotoxina sin tratamiento (M), control de silibina en la dosis efectiva sin neurotoxina\* (S100) y coadministración del fármaco con pre-tratamiento de la neurotoxina\* (MS100).
- Determinación de los niveles de los factores solubles para las dosis más efectivas de ambas rutas de administración en los ensayos de ELISA para TNF- $\alpha$  y BDNF en CE y SN, así como la medición de la conducta motora de los grupos experimentales

para las pruebas de descenso en tubo, construcción de nido, caminata por rejilla y reflejo de tracción. Los grupos fueron divididos en control de vehículos (C), control de neurotoxina sin tratamiento (M), control de silibina en la dosis efectiva sin neurotoxina\* (S100) y coadministración del fármaco con pre-tratamiento de la neurotoxina\* (MS100).

\*Algunas nomenclaturas fueron designadas a partir de la dosis con mayor conservación de dopamina por la administración de silibina tras la obtención de los resultados de la curva dosis respuesta.

Los resultados obtenidos de todos los experimentos fueron sometidos a pruebas de normalidad (Prueba de D'Agostino-Pearson basado en la oblicuidad y curtosis de los datos) y homocedasticidad (Prueba de Brown-Forsythe para el comportamiento de distribución basado en la mediana) para determinar si los datos se consideran paramétricos o no paramétricos, por lo que los ensayos que se determinen como paramétricos se analizan por análisis de varianza de un factor (ANADEVA, ANOVA en inglés) con posthoc de Bonferroni para comparativos contra grupos control. En el caso de las pruebas no paramétricas se analiza por medio de una prueba de Kruskal-Wallis con posthoc Dunn y así asegurar que se realiza el análisis estadístico más adecuado para cada caso. En todas se considera un nivel de confianza de  $p < 0.05$ .

## 7.4. Esquema de tratamiento

Para la inducción del síndrome parkinsonico, todos los animales (Figuras 11a-11c) fueron sometidos a la administración consecutiva de MPTP vía IP en dosis de 30 mg/Kg o vehículo (PBS) según corresponda por 5 días, como ha sido descrito previamente en otros estudios (Guzman-Ruiz, y otros, 2019; Rezaee & Jahromy, 2018; Pérez-H, y otros, 2014). La dosis

acumulativa es de 125 mg/Kg, menor a la que produce muerte celular necrótica (Tatton & Kish, 1997).

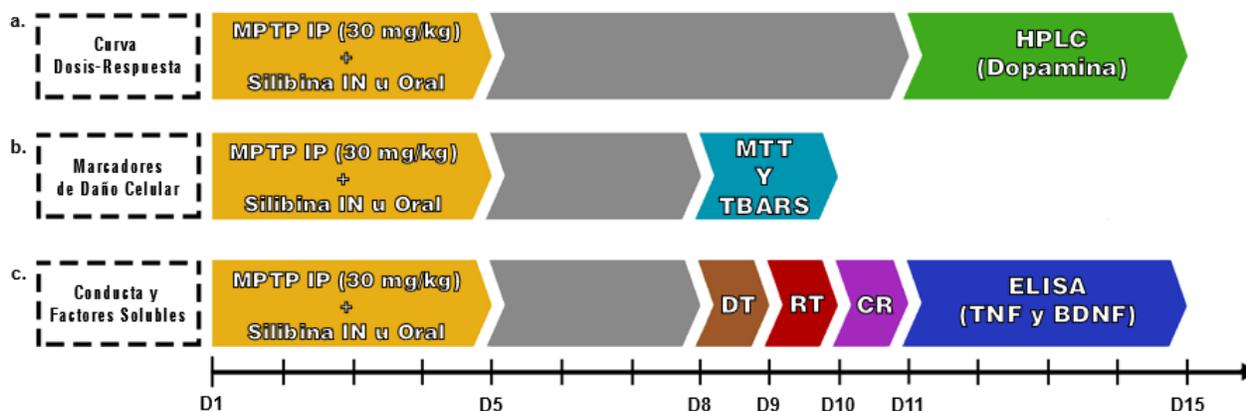
Posterior a la administración de la neurotoxina, tras una espera de 30 minutos, se administró la dosis correspondiente de silibina por sus respectivas vías de administración: intranasal u oral, en el caso de la vía oral (Figura 13a), se utilizó aceite vegetal comercial como vehículo, mientras que, por la vía IN, se utilizó glicerol como vehículo de prueba 1 (Figura 13b) y aceite oleico como vehículo de prueba 2 (Figura 13c).

La técnica empleada para la administración IN, corresponde a una modificación de la reportada por Hanson en 2013, con la variante de que existe un periodo de adaptación a la manipulación manual por parte del administrador del fármaco, reduciendo la variabilidad de aplicación de las microgotas de fármaco por el movimiento involuntario de los ratones (Hanson, Fine, Svitak, & Faltesek, 2013).

Las dosis utilizadas para la vía oral corresponden a equivalentes a las estudiadas por Pérez-H en la vía intraperitoneal con silimarina, sin embargo, las dosis correspondientes para la vía IN, son menores, ya que tanto Cady, como Chauhan y Chauhan reportan que los fármacos administrados por la vía IN requieren menor dosificación que la vía oral o intraperitoneal, reduciendo las dosis hasta en un 90% (Cady, 2015) (Chauhan & Chauhan, 2015).

En el caso de la curva dosis respuesta (Figura 11a) y la determinación de factores solubles (Figura 11c), el periodo de espera, tras la última administración consecutiva del MPTP, es de 7 días, mientras que en el caso de la estimación de marcadores de daño (Figura 11b) la espera es de sólo 3 días. Una vez cumplidos los plazos correspondientes, se da eutanasia por sobredosis de pentobarbital a los animales para la obtención del tejido cerebral fresco, para sus respectivos procesados. Para la evaluación de las conductas, se evaluaron los

últimos 3 días de espera del esquema de factores solubles, para determinar el estado fisiológico motor observable, previo a la eutanasia (Figura 11c).



**Figura 11. Diseño experimental.** Se muestra el esquema de trabajo para la evaluación del efecto neuroprotector de la silibina por las vías de administración oral e IN en el modelo murino de Enfermedad de Parkinson. Se observa el curso temporal de los grupos experimentales para la obtención de la curva dosis respuesta (a.), la cuantificación de marcadores de daño (b.) y la determinación de conducta y factores solubles (c.) del día 1 al 15 (D1-D15). En amarillo se representa el esquema de dosis de la pro neurotoxina MPTP, en verde el proceso de obtención de estriado para la cuantificación de DA por HPLC, en azul claro los ensayos de MTT y TBARS, en café la prueba conductual de descenso en tubo (DT), en rojo la prueba conductual de reflejo de tracción (RT), en magenta la prueba conductual de caminata en rejilla (CR) y en azul oscuro la cuantificación de TNF- $\alpha$  y BDNF por medio de la técnica de ELISA. Figura realizada con Photoshop CS6 v13.0 (x32).

## 7.5. Curva de conservación de dopamina

El contenido total de DA en cada tejido fue analizado por medio de una cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) con detección electroquímica, como lo describe García et al. 2008. Los estriados frescos, obtenidos de la disección del cerebro de los ratones, fueron sonicados en hielo con 300  $\mu$ L de una solución 0.4 N de HClO<sub>4</sub> y metabisulfito de sodio al 0.1% (V/V), seguido de centrifugar las muestras a 4000 x g 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron recuperados y filtrados. Se almacenaron a congelación a -70°C hasta el día de su uso. El análisis cromatográfico se realizó con un cromatógrafo de líquidos Perkin-Elmer LC-4C con un detector electroquímico BAS CC-5. El cromatograma se procesó por el software Perkin-Elmer Turbochrom Navigator 4.1 data

station. Las curvas de calibración se construyeron a partir de una concentración conocida del estándar de DA preparada en la misma solución HClO<sub>4</sub>: metabisulfito de sodio. Las concentraciones de DA en las muestras se obtuvieron con la interpolación con la curva de calibración que le corresponde. La columna utilizada fue la Alltech Adsorbosphere Catecholamine (100 x 4.6mm) con partículas de 3 µm. La fase móvil consiste en un amortiguador de fosfatos 0.1 M con pH 3.1 que contiene 0.9 mM de octil-sulfato de sodio, 0.1 mM de EDTA y metanol al 15% (v/v). La tasa de flujo fue de 1.4 mL/min. El potencial estuvo fijo a 0.8 V respecto a un electrodo de referencia Ag/AgCl. (García, y otros, 2008). Todas las muestras se analizaron por duplicado, se normalizaron por peso de tejido y los resultados se expresan como porcentaje de DA con respecto al valor de los controles (% vs C, figura 13).

## 7.6. MTT

El ensayo de reducción del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolio (MTT) fue realizado en las muestras de homogenizado de las áreas cerebrales de cada ratón, de acuerdo con la metodología descrita previamente (Pérez-De La Cruz, y otros, 2005). Los tejidos frescos, obtenidos de la disección de los cerebros de cada animal, se procesaron en 100µL de una solución de PBS 1x (NaCl 137mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1 mM y KCl 2.7 mM en agua desionizada), obteniendo un homogenizado por sonicación como en el descrito para la curva dosis-respuesta. Cada muestra de homogenizado se incubó con 10 µL de Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolio (MTT; 5 mg/mL) por 60 minutos a 37°C. Las muestras fueron centrifugadas a 15 300 x g por 3 minutos. El sobrenadante fue removido y los precipitados resultantes se disolvieron en 500 µL de isopropanol ácido (Isopropanol-HCl 96:4). La disolución fue analizada para la cuantificación

de formazán en un lector de placas EPOCH (BioTek, EU) a 570 nm. Todas las muestras se analizaron por duplicado, analizando los valores promedio de las densidades ópticas. Las muestras se normalizaron por peso de tejido. Los resultados se expresan en porcentaje de reducción de MTT con respecto al valor de los controles (% vs C, figuras 14a y 14b).

## 7.7. TBARS

El ensayo de cuantificación de especies reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) fue realizado en las muestras de homogenizado de las áreas cerebrales de cada ratón, de acuerdo con la metodología descrita previamente (García, y otros, 2008). Los tejidos frescos, obtenidos de la disección de los cerebros de cada animal, se procesaron en 100µL de una solución de PBS 1x (NaCl 137 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1 mM y KCl 2.7 mM en agua desionizada), obteniendo un homogenizado por sonicación como en el descrito para la curva dosis-respuesta. Los 100 µL de cada homogenizado se adicionaron a tubos con 200 µL de una solución de TBA (0.375 g TBA + 15 g de ácido tricloroacético + 2.54 mL de HCl) y se incubaron a 94°C por 30 minutos en baño de agua caliente. Se observa un cambio de tonalidad dirigida a rosáceo proporcional a la cantidad de productos oxidados. Las muestras se mantuvieron en hielo por 5 minutos y se centrifugaron a 3000 x g por 15 minutos. Se recuperaron los sobrenadantes y se determinó la densidad óptica de cada muestra con un lector de placas Epoch (BioTek, EU) a una longitud de onda de 532 nm. Todas las muestras se analizaron por duplicado, analizando los valores promedio de las densidades ópticas. Las muestras se normalizaron por peso de tejido. Los resultados se expresan en porcentaje de TBARS con respecto al valor de los controles (% vs C, figuras 14c y 14d).

## 7.8. TNF- $\alpha$ y BDNF

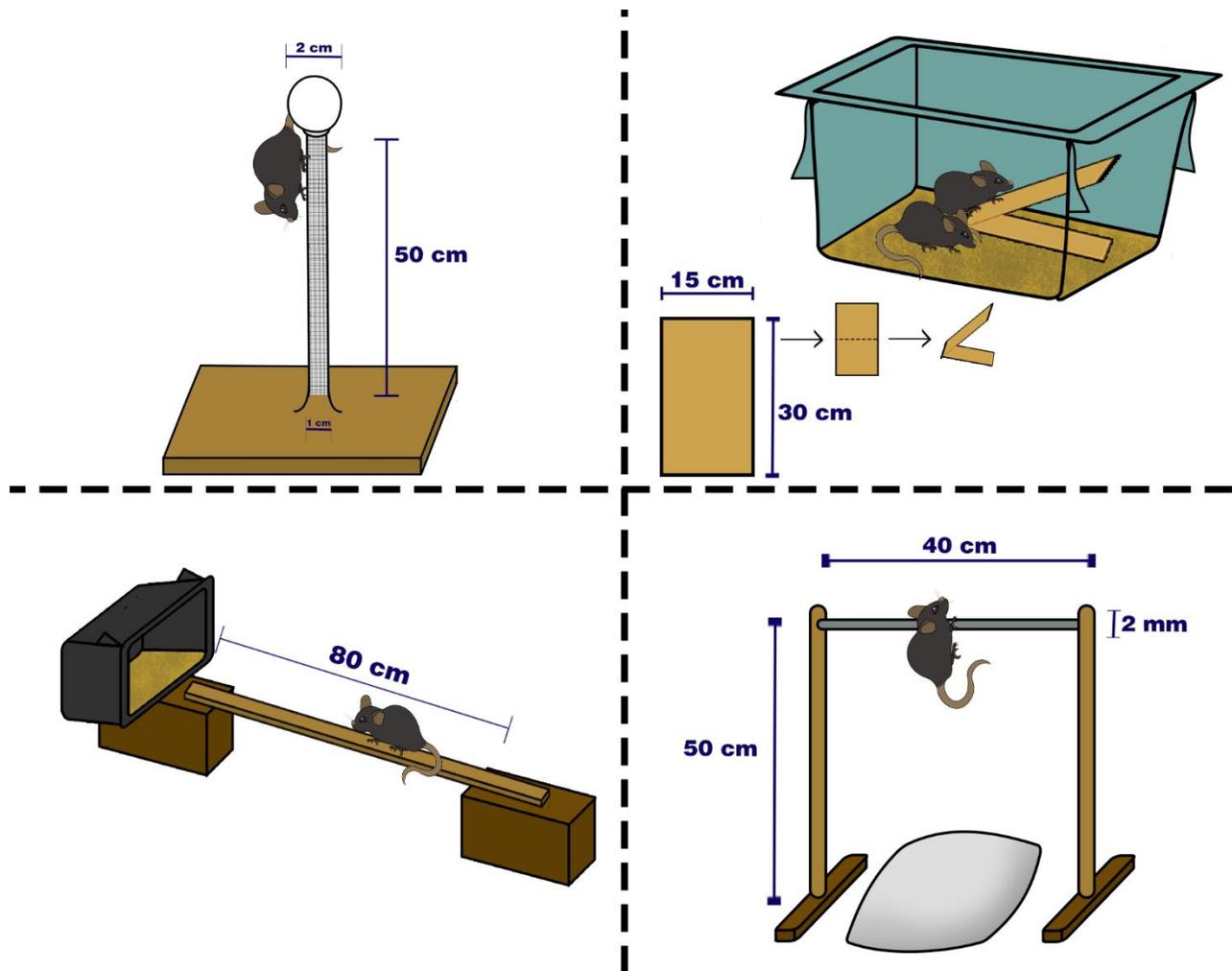
Se cuantificaron los niveles de la citocina proinflamatoria factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , por sus siglas en inglés) y los niveles del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) del cuerpo estriado y la sustancia nigra de los grupos experimentales por medio del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) de captura, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el proveedor. El tejido fresco, obtenido tras la eutanasia y disección de los animales, se procesó individualmente adicionando 300  $\mu$ L de solución amortiguadora de lisis (20 mM Tris, 0.25 M Sacarosa, 2mM EDTA, 10 mM EGTA, Triton X-100 al 1% (v/v) y un coctel de inhibidores de proteasas), homogenizándolas por sonicación. Posteriormente se centrifugaron a 4000 x g por 30 minutos a 4°C, se recuperaron los sobrenadantes y se almacenaron a -40°C hasta su uso. Las muestras se incubaron 24 horas a 4°C en placas de 96 pozos previamente sensibilizadas con anticuerpo de captura para TNF- $\alpha$  (DuoSer ELISA kit Mouse TNF $\alpha$  Dy510-05, R&D Systems, Minneapolis, EU) y para BDNF (DuoSet ELISA kit Human/Mouse BDNF Dy248, R&D Systems, Minneapolis, EU) según corresponda, como lo indica el proveedor; fueron lavadas por triplicado e incubadas con anticuerpo de detección por 2 horas a temperatura ambiente. Los sistemas antígeno-anticuerpo adheridos a la placa se detectaron utilizando TMB y deteniendo la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. Las densidades ópticas fueron obtenidas con lecturas a longitudes de onda de 450 nm y 570 nm en el lector de placas EPOCH (BioTek, EU). La corrección del valor real de las muestras se calculó como  $A_{450nm} - A_{570nm}$ . Las muestras se analizaron por duplicado y se reporta una sensibilidad de la curva de calibración de 9.38 pg/mL para ambos sistemas. Los resultados fueron normalizados respecto al peso del tejido y se expresan como pg de

TNF- $\alpha$ /mg de tejido (Figuras 15a y 15b) o como pg de BDNF/mg de tejido (Figuras 15c y 15d).

## 7.9. Evaluación conductual motora

En los modelos pre-clínicos de EP, una de las estrategias para la evaluación de nuevos fármacos o procedimientos para la mejora de la sintomatología es con la determinación del déficit motor, el cual puede ser un reflejo de la posibilidad de mejorar la calidad de vida en los pacientes con las manifestaciones clínicas de la EP. Para ello se realizan pruebas conductuales motoras cualitativas o cuantitativas, que comparan el efecto que ejerce el modelo y las diferentes terapéuticas aplicadas que desean comprobar su eficacia (Deacon, *Measuring Motor Coordination in Mice*, 2013).

Para determinar si la silibina tiene efectos neuroprotectores observables en el padecimiento de la EP a través del modelo murino, se evaluó la bradicinesia y la coordinación motora gruesa con la prueba de descenso en tubo (Figura 12a) (Sedelis, y otros, 2000); la coordinación orofacial con la prueba de latencia de construcción de nido (Figura 12b) (Fujita, y otros, 2018); la coordinación motora fina con la prueba de caminata sobre rejilla (Figura 12c) (Richter, y otros, 2017); y la fuerza muscular, el equilibrio y la coordinación motora de agarre con la prueba de reflejo de tracción (Figura 12d) (Hu, Li, & Wang, 2018).



**Figura 12. Pruebas para el perfil motriz.** Se muestran las 4 pruebas de conducta realizadas para evaluar la mejoría en el perfil motor de los grupos experimentales con un modelo de EP inducido con MPTP. La prueba de descenso en tubo (a.) evalúa la bradicinesia y la coordinación motora gruesa en un sistema de tubo vertical recubierto con gasa donde se reta al descenso de los animales; la prueba de construcción de nido (b.) evalúa la coordinación orofacial como parte de la coordinación motora fina a través de la observación del inicio de mordedura de un material de enriquecimiento con dimensiones y peso conocido; la prueba de caminata en rejilla (c.) que evalúa el rendimiento motor asociado con la CMF y el equilibrio con el reto de cruce de una regla recubierta con una rejilla metálica y la prueba de reflejo de tracción (d.) que evalúa la capacidad de mantener el equilibrio, el tono muscular y la coordinación motora fina. Figura realizada con Adobe Photoshop CS6 v13.0 (x32)

### 7.9.1. Prueba de descenso en tubo

La prueba de descenso en tubo (DT, Figura 12a) es una evaluación conductual motora utilizada en varios estudios para determinar la bradicinesia (Hu, Li, & Wang, 2018; Ju, y otros, 2010) y la coordinación motora gruesa (CMG) (Fleming, y otros, 2004; Sedelis, y otros, 2000). El sistema y método utilizado es una adaptación de los empleados por Sedelis

en el 2000, Fleming en 2004 y Ju en 2018 (Ju, y otros, 2010; Fleming, y otros, 2004; Sedelis, y otros, 2000). El aparato consta de una base superior esférica de 2 cm de diámetro que se encuentra adherida a un tubo de 50 cm de longitud y 10 mm de diámetro en posición vertical, recubierto con gaza para evitar deslices y fijado a una base sólida de madera (Figura 12a). Cada ratón se colocó sobre la base esférica con la cabeza direccionada a la base, éste descendió y se tomó el tiempo que tarda en llegar a 2 puntos diferentes: uno es el final del tubo de 50 cm, tiempo que se denomina “T-Descenso” (T-Turn, por *time for turning down* en inglés) por el tiempo que tarda en recorrer el tubo (Hu, Li, & Wang, 2018; Fortuna, y otros, 2017; Richter, y otros, 2017; Ju, y otros, 2010; Fleming, y otros, 2004); y el otro es desde que inicia su recorrido y hasta que posa sus 4 patas sobre la base de madera, tiempo denominado como “T-Pose” (T-LA, por *time landing* en inglés) (Zhu, y otros, 2018; Fortuna, y otros, 2017; Richter, y otros, 2017; Zhang, y otros, 2017; Ju, y otros, 2010; Fleming, y otros, 2004). Tal como lo describen Sedelis, Hu y Ju, la prueba no requiere de entrenamiento previo, por lo cual únicamente se da habituación en el entorno del cuarto de conducta (Hu, Li, & Wang, 2018; Ju, y otros, 2010; Sedelis, y otros, 2000). La prueba se realizó con 5 repeticiones por animal, en un tiempo límite de 30 segundos y con intervalos de espera de 30 minutos entre cada ensayo. Todos los ensayos fueron videograbados. Se analizó el promedio de los 5 ensayos como el valor de cada ratón.

### 7.9.2. Prueba de construcción de nido

Si bien, la prueba de Construcción de Nido (CN, Figura 12b) generalmente es utilizada en estudios de ansiedad (Gaskill, Karas, Garner, & Pritchett-Corning, 2013) o aclimatación reproductiva (Deacon, Assessing nest building in mice, 2006), se adaptó una variante de esta prueba, denominada “latencia de construcción de nido”, descrita en varios estudios como el de Greenberg en 2016 o Fleming en 2004, donde se evalúa el tiempo que tardan

los roedores en comenzar a roer un material de enriquecimiento con peso y naturaleza conocida como cartón (Greenberg, y otros, 2016) o algodón (Fleming, y otros, 2004) y se menciona que puede ser utilizada como indicador de la coordinación motora orofacial (CMO), en la comparación entre grupos con síndromes motores (Fujita, y otros, 2018; Greenberg, y otros, 2016; Gaskill, Karas, Garner, & Pritchett-Corning, 2013; Fleming, y otros, 2004). El sistema está basado en los reportados por Fleming y Sedelis pero con algunas modificaciones (Fleming, y otros, 2004; Sedelis, y otros, 2000). Se dejó como medio de enriquecimiento un rectángulo de cartón previamente pesado de 15x30 cm doblado a la mitad en las cajas de acrílico que fungen como casa de los ratones (Figura 12b), sólo deben convivir de 1 a 2 ratones por caja. La prueba no requiere de habituación o entrenamiento previo y se evaluó desde el último día de administración de la toxina hasta que todos los grupos obtengan su valor de latencia. Como propuesta, basado en el artículo de Bult en 1992, también se midieron los pesos diferenciales de los materiales de enriquecimiento, una vez terminado el experimento hasta el día de su eutanasia, para determinar si el valor obtenido puede ser un índice de coordinación motora a largo plazo (Bult, van der Zee, Compaan, & Lynch, 1992). Se analizó cada caja como valor individual comparativo entre grupos, es decir, el valor por cada 2 ratones.

### 7.9.3. Prueba de caminata en rejilla

Una de las pruebas más utilizadas en la evaluación del rendimiento motor en modelos de Huntington (Southwell, Ko, & Patterson, 2009) y EP (Fleming, Ekhtor, & Ghisays, Assessment of Sensorimotor Function in Mouse Models of Parkinson's Disease, 2013) es la prueba de la Caminata en Rejilla (CR, Figura 12c), que evalúa la coordinación motora fina (CMF) (Richter, y otros, 2017; Fleming, Ekhtor, & Ghisays, Assessment of Sensorimotor Function in Mouse Models of Parkinson's Disease, 2013; Luong, Carlisle,

Southwell, & Patterson, 2011; Gulinello, Chen, & Dobrenis, 2008; Stanley, y otros, 2005) y el equilibrio (Molz, y otros, 2018; Richter, y otros, 2017; Luong, Carlisle, Southwell, & Patterson, 2011; Fleming, y otros, 2004; Carter, y otros, 1999; Thullier, Lalonde, Mahler, Joyal, & Lestienne, 1996). El reto consiste en el cruce de un puente plano de madera o acrílico desde un punto inicial hasta el arribo a una caja oscura el cual se dificulta con la adición de una malla de metal el día de prueba. Está adaptada tanto para rata (Au, Weishaupt, Nell, Whitehead, & Cechetto, 2016; Albutt & Henderson, 2007) como para ratón (Richter, y otros, 2017; Gulinello, Chen, & Dobrenis, 2008). El sistema utilizado está basado en los descritos por Fleming en 2013 y Luong en 2011, pero con algunas modificaciones (Fleming, Ekhaton, & Ghisays, Assessment of Sensorimotor Function in Mouse Models of Parkinson's Disease, 2013; Luong, Carlisle, Southwell, & Patterson, 2011). El aparato consta de 2 bases de acrílico que elevan el sistema a 20 cm de la mesa de apoyo, en ellas reposa una regla de madera de 1 metro de largo por 6 cm de ancho, en el extremo final de la regla reposa una caja de acrílico con aserrín para la simulación de la caja hogar, con un ratón libre como motivante social. La prueba requiere de entrenamiento previo, por lo que se optó por 3 días de habituación previa basado en los resultados reportados por Albutt en 2007, donde realiza diferentes esquemas de habituación y observa que a partir del tercer día no existe una variación significativa en la fluidez de las pruebas en animales sanos (Albutt & Henderson, 2007). Durante estos días, 2 fueron utilizados para enseñarle al ratón a cruzar por el puente sin la adición de la rejilla, utilizando la mano para bloquear cualquier intento de deserción o sesgo en el cruce. Al tercer día de entrenamiento se dejó libre al ratón para observar si puede cruzar sin distracción, como está descrito previamente (Fleming, y otros, 2004). El día de la prueba se ocupa una malla o rejilla metálica de poro abierto para recubrir el puente y se retó al cruce libre de los animales con un tiempo límite

de 30 segundos en 5 repeticiones con intervalos de 30 minutos entre cada ensayo. Se cuantificó el tiempo que tarda en cruzar desde el punto de inicio y hasta el punto de arribo, parámetro que se denomina “Latencia de Cruce”, también el número de errores que comete cada ratón al cruzar, entendiendo como errores los deslices de las patas del animal y detenimientos bruscos repentinos. Todos los ensayos fueron videograbados. Se analizó el promedio de los 5 ensayos como el valor de cada ratón.

Como propuesta, en este trabajo también buscamos comparar la sensibilidad de la prueba cuando se calcula un índice del número de errores por segundo de recorrido para una mejor detección la detección de déficits en coordinación motora fina (Ecuación 2).

$$(2) \text{ Error Relativo (ER)} = \frac{\text{Número de Errores que comete el ratón}}{\text{Latencia de cruce (segundos)}} [=] \frac{\text{errores}}{\text{segundo}}$$

**Ecuación 2. Cálculo del Error Relativo (ER).** Se describe el cálculo del número de errores que comete el ratón por segundo de cruce, evitando el sesgo de menor número de errores por menor tiempo de recorrido. Sus unidades son errores por segundo.

Otra propuesta es el cálculo del % de cruce (Ecuación 3), para el cálculo de la deserción en los grupos experimentales, entendiendo la deserción como el cruce inconcluso de los animales por acicalarse, distraerse, inmovilizarse o cambiar de dirección, contabilizando los 5 ensayos de forma unitaria y con respecto a las deserciones del control como el 100% de cruce.

$$(3) \% \text{ de Cruce} = 100 - \left( \frac{(\# \text{ Ensayos totales} - \# \text{ Deserciones}) \text{ del grupo de prueba}}{(\# \text{ Ensayos totales} - \# \text{ Deserciones}) \text{ del grupo control}} \times 100 \right)$$

**Ecuación 3. Cálculo del porcentaje de Cruce.** Se describe el cálculo del porcentaje de cruce de los grupos experimentales respecto al grupo control para observar la deserción como indicador de capacidad de habituación. Sus unidades se encuentran en %.

#### 7.9.4. Prueba de reflejo de tracción

Complementando la CR, existe la prueba de reflejo de tracción (RT, Figura 12d) que evalúa la capacidad tanto en ratas (Blanco Lezcano, y otros, 2010) como en ratones (Lalonde & Strazielle, 2003) de mantener el equilibrio (Hu, Li, & Wang, 2018; Deacon, Measuring Motor

Coordination in Mice, 2013; Blanco Lezcano, y otros, 2010). También permite evaluar su fuerza o tono muscular (Hu, Li, & Wang, 2018; Zhu, y otros, 2018; Birhanie, Walle, & Rebba, 2016; Deacon, Measuring Motor Coordination in Mice, 2013; Blanco Lezcano, y otros, 2010), además de confirmar la CMF como complemento a la prueba de CR (Blanco Lezcano, y otros, 2010; Lalonde & Strazielle, 2003). La prueba consiste en colocar al animal sobre sus patas delanteras en la mitad de una barra metálica o cuerda tensa al aire, para evaluar que cada uno tenga la capacidad de mantenerse colgando del sistema sin caerse y que sea capaz de cruzar desde el punto de partida (mitad de la barra) hasta una de las dos plataformas de escape (Figura 12d). El sistema empleado es una adaptación del reportado por Blanco en 2010 el cual se considera más adecuado que el reportado por Deacon en 2013 como 3 barras horizontales, pero el protocolo que se sigue es el de este último con algunas modificaciones (Deacon, Measuring Motor Coordination in Mice, 2013; Blanco Lezcano, y otros, 2010). El aparato consta de una barra metálica de 40 cm de largo y 2 mm de diámetro sostenida por 2 pilares con base de madera que mantienen a la barra a 50 cm de altura, también se colocan batas o almohadas como soporte de protección a caídas (Figura 12d). La prueba no requiere de entrenamiento previo, así que en el día de evaluación se colocó al ratón a la mitad de la viga metálica con sus patas delanteras (Deacon, Measuring the Strength of Mice, 2013). La prueba tiene un tiempo límite de 30 segundos en 5 repeticiones por roedor con intervalos de 30 minutos entre cada ensayo. Se tomó el tiempo que tarda el roedor en cruzar desde el punto de inicio hasta una de las dos plataformas de escape, tiempo que se denomina como “Latencia de escape”. Con fines comparativos se consideró reportar también la escala de Deacon que considera puntuación por cruce, la asignación corresponde al tiempo de escape, donde 1-5 segundos = 1 punto,

6-10 segundos = 2 puntos, de 11-20 segundos = 3 puntos, 20-30 = 4 puntos y si pasa de los 30 segundos = 5 puntos (Deacon, Measuring Motor Coordination in Mice, 2013).

Debido a que se encuentran sucesos que no se consideran en la literatura como las caídas de los ratones, así como las deserciones, entendiéndose como deserción al balanceo sin avanzar, quedarse estático sostenido a la viga o forzar a pararse sobre la barra para acicalarse, tomamos 2 parámetros nuevos adicionales para el análisis de la prueba: el % de escape (Ecuación 4) que evalúa la deserción en los grupos experimentales y % de tracción (Ecuación 5) que evalúa la caída en los grupos experimentales, para ambos cálculos se contabilizan los 5 ensayos de forma unitaria en cada grupo y se compara con respecto a las deserciones o caídas del control, según corresponda, como el 100% de cruce o 100% de tracción muscular.

$$(4) \% \textit{ de Escape} = 100 - \left( \frac{(\# \textit{ Ensayos totales} - \# \textit{ Deserciones}) \textit{ del grupo de prueba}}{(\# \textit{ Ensayos totales} - \# \textit{ Deserciones}) \textit{ del grupo control}} \times 100 \right)$$

**Ecuación 4. Cálculo del porcentaje de Escape.** Se describe el cálculo del porcentaje de escape de los grupos experimentales respecto al grupo control para observar la deserción como indicador de falla motora. Sus unidades se encuentran en %.

$$(5) \% \textit{ de Tracción} = 100 - \left( \frac{(\# \textit{ Ensayos totales} - \# \textit{ Caídas}) \textit{ del grupo de prueba}}{(\# \textit{ Ensayos totales} - \# \textit{ Caídas}) \textit{ del grupo control}} \times 100 \right)$$

**Ecuación 5. Cálculo del porcentaje de Tracción.** Se describe el cálculo del porcentaje de no caídas de los grupos experimentales respecto al grupo control para observar la tracción como indicador de tono muscular. Sus unidades se encuentran en %.

## 7.10. Reactivos

Todos los reactivos empleados en este proyecto fueron obtenidos de marcas comerciales, por lo que se encuentran estandarizados según lo reportado por cada empresa. Tanto el MPTP (M0896), como el  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (795488), el NaCl (746398), el KCl (746436), el glicerol (G2025), el  $\text{HClO}_4$  (311421), el metabisulfito de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , 255556), el octil-sulfato de sodio (O4003), la silibina (S0417), el estándar de dopamina grado HPLC

(1225204), el Tris (RDD008), el Tween 20 (P1379), el 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB, T0440), la sacarosa (S1888), el ácido tiobarbitúrico (TBA, S564508), el malondialdehído (MDA, 36357), el HCl (320331) y el bromuro de azul tiazoliltetrazolio (MTT, M2128) fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (San Luis, EU) con grado analítico de pureza. El aceite oleico (E17110096) fue obtenido de Droguería Cosmopolita (CDMX, MX) con un 99.9% de pureza, el aceite vegetal (0000133361) de la marca comercial Del Marqués® (Monterrey, MX), el EDTA (130984) de Laboratorios Laitz (CDMX, MX), el metanol (15538524) y el ácido tricloroacético (15567834) de J.T. Baker (Madrid, Esp), el EGTA (3054B51) de Amresco (Quebec, Can). Las soluciones fueron preparadas con agua desionizada obtenida del equipo Milli-RQ System (Millipore, MA). Los kits de Human/Mouse BDNF DuoSet ELISA (DY248) y Mouse TNF- $\alpha$  DuoSet ELISA (DY410-05) fueron obtenidos de R&D Systems (Minneapolis, EU).

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La estrategia para la evaluación de la silibina como neuroprotectora en EP, administrada por dos vías de administración no reportadas, sigue un planteamiento que abarca desde la depleción de dopamina como parámetro central de daño en la EP, hasta aspectos bioquímicos y motores que comprueban y elucidan las posibles propiedades terapéuticas de esta molécula y sus actividades farmacológicas asociadas con las principales alteraciones involucradas en la EP (Figura 3).

### 8.1. Validación del modelo de MPTP

El modelo murino con la pro-neurotoxina MPTP, como ya se ha abordado (Castañeda-Achutiguí, y otros, 2015), provoca un ambiente bioquímico desfavorable asociado a la

sobreproducción de ERONs por la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial en neuronas selectivamente dopaminérgicas (Raza, Anjum, & Ain Shakeel, 2019), provocando la muerte neuronal y posteriormente una pérdida en los niveles de DA.

Como puede observarse en la figura 13, los niveles en la curva de conservación de dopamina se reducen entre un 50-70% en los grupos administrados con MPTP (*M*) respecto al grupo control (*C*), demostrando así que la toxina disminuye significativamente la presencia de este neurotransmisor con reproducibilidad, al depletarlo en los 3 ensayos de la curva de conservación de dopamina. La depleción de DA es secundaria a la muerte neuronal provocada por los altos niveles de estrés oxidante que genera el MPTP, como lo discuten en el artículo de Smeyene y sus colegas en 2005, ya que, a menor cantidad de neuronas, menor será la producción total de la molécula en el cuerpo estriado (Smeyene & Jackson-Lewis, 2005).

Los resultados del ensayo de MTT, tanto en CE (Figura 14a) como en SN (Figura 14b), mostraron que el MPTP disminuye la capacidad de reducción de la sal de tetrazolio a formazán en un aproximado de 37%, demostrando que altera la función de las mitocondrias y reduce la viabilidad de las neuronas al estar afectado este organelo (Castañeda-Achutiguí, y otros, 2015).

Una de las consecuencias principales de la alteración que se genera en las mitocondrias, es la sobreproducción de especies radicalarias reactivas, que interactúan con las biomoléculas presentes en el microambiente neuronal, siendo el mejor marcador de daño, la peroxidación de lípidos (Niki, 2008). En este trabajo se evaluó la lipoperoxidación a través de la cuantificación de TBARS y demostramos que en ambos núcleos neuroanatómicos (Figuras 14c y 14d) se incrementó hasta a un 200% la cantidad de malondialdehído cuando

se administra la neurotoxina sin ningún tipo de tratamiento adicional. Es probable, que la cantidad de ERONs producida por la disfunción mitocondrial estén oxidando lípidos de la membrana celular, dañando así a las neuronas y alterando la integridad de éstas (Niki, 2008; Smeyene & Jackson-Lewis, 2005). Con ambos experimentos se puede corroborar que en efecto la administración de MPTP mimetiza el daño provocado por el estrés oxidante en CE y SN, por lo que evaluar a la silibina con esta estrategia puede elucidar si el fármaco tiene efectos antioxidantes benéficos en el contexto de la EP.

El estado neuroinflamatorio es provocado por el daño neuronal asociado al MPTP como consecuencia del estrés oxidante (Castañeda-Achutiguí, y otros, 2015) y se ve reflejado tanto en CE (Figura 15a) como en SN (Figura 15b), ya que los niveles de la citocina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$  se ven incrementados muy significativamente en los grupos *M* de ambos experimentos, aumentando más del doble que el nivel basal obtenido de los grupos *C*, por lo que la evaluación de la silibina coadministrada con la neurotoxina es una evaluación representativa de sus efectos antiinflamatorios a nivel de SNC en el contexto del modelo murino de EP, ya que el TNF- $\alpha$  es una de las citocinas pro-inflamatorias más abundantes en la vía nigroestriatal (Tansey, McCoy, & Frank-Cannon, 2007). La activación de células como la microglía o los macrófagos derivados de monocitos que se encuentren en ambos núcleos neuronales hacia un perfil pro-inflamatorio (M1) se da por las señales de daño que se producen por la alteración bioquímica y la muerte apoptótica o necrótica de las neuronas (Orihuela, McPherson, & Harry, 2015), además de perderse la regulación tripartita entre astrocitos, neuronas y la misma microglía (Charron, y otros, 2014). Por lo que este estado neuroinflamatorio es dependiente de la administración de la toxina, ya que actúa como reacción en cadena, provocando estrés oxidante y posteriormente la neuroinflamación.

En la misma figura 15, pero en los apartados 15c y 15d, se observan los niveles del factor neurotrófico BDNF en CE y SN, el cual es esencial para mantener la homeostasis de las neuronas de SNC (Mercado, Collier, Sortwell, & Steece-Collier, 2017), evitando la apoptosis por vía intrínseca (Ueda & Fujita, 2004) y como un requisito para su mantenimiento metabólico (Hernández-Baltazar, y otros, 2018). En este experimento, se mostró que la administración del MPTP reduce los niveles de BDNF hasta 2.5 veces por debajo de los grupos control, por lo que la evaluación del fármaco con este modelo demostraría indirectamente la capacidad terapéutica que tiene para el mantenimiento metabólico neuronal en la vía nigroestriatal. Sin embargo, no se ha reportado si además de la muerte neuronal, el MPTP también pudiese ser ligando inhibidor de la producción de este factor soluble, lo que podría estar afectando la sobrevivencia de las neuronas y favoreciendo la sintomatología de la EP. Con esto, la evaluación de la silibina como neuroprotector en el modelo de EP tiene un abordaje también como posible conservador de niveles de BDNF.

Las pruebas conductuales motoras, son un reflejo físico del daño provocado por la neurotoxina en diferentes contextos: coordinación motora, equilibrio, tono muscular, entre otros, como ya se ha abordado previamente (Sedelis, y otros, 2000).

Con la prueba de DT claramente se observó cómo la aplicación del MPTP aumenta significativamente entre 3 y 4 veces el tiempo que tarda en descender (Figura 16a) y en posar las 4 patas (Figura 16b) el grupo *M* respecto al grupo *C*, provocando bradicinesia y fallas en la coordinación motora gruesa.

La latencia de construcción de nido en la prueba de CN reta la coordinación orofacial de los roedores, que también se vió modificada con la administración de MPTP, ya que tardaron

más tiempo en comenzar a roer el material de enriquecimiento, aproximadamente 2 veces más lentos respecto a los controles (Figura 16c).

En adición a esto, la prueba de CR también mostró que se observan cambios en la actividad motora fina y el equilibrio de los animales, si bien, en la latencia de cruce no hay diferencia significativa (Figura 16d,  $p = 0.1575$ ), sí se observó una tendencia que se confirma al aumentar la resolución de la prueba con la adición de los errores como el factor de error relativo (Figura 16f). Los errores por segundo que cometió cada ratón con MPTP fue casi 4 veces mayor que los controles, demostrando una falla en la coordinación motora fina de agarre a la maya metálica, así mismo incrementó la deserción de los animales cuando se les administró la pro-neurotoxina, ya que, como se observa en el porcentaje de cruce (Figura 16g) el grupo *M* tiene un porcentaje de cruce significativamente menor que los controles ( $p = 0.0008$ ), mostrando que el equilibrio y la capacidad de concentración para lograr la habituación y concluir la prueba satisfactoriamente se ven alteradas.

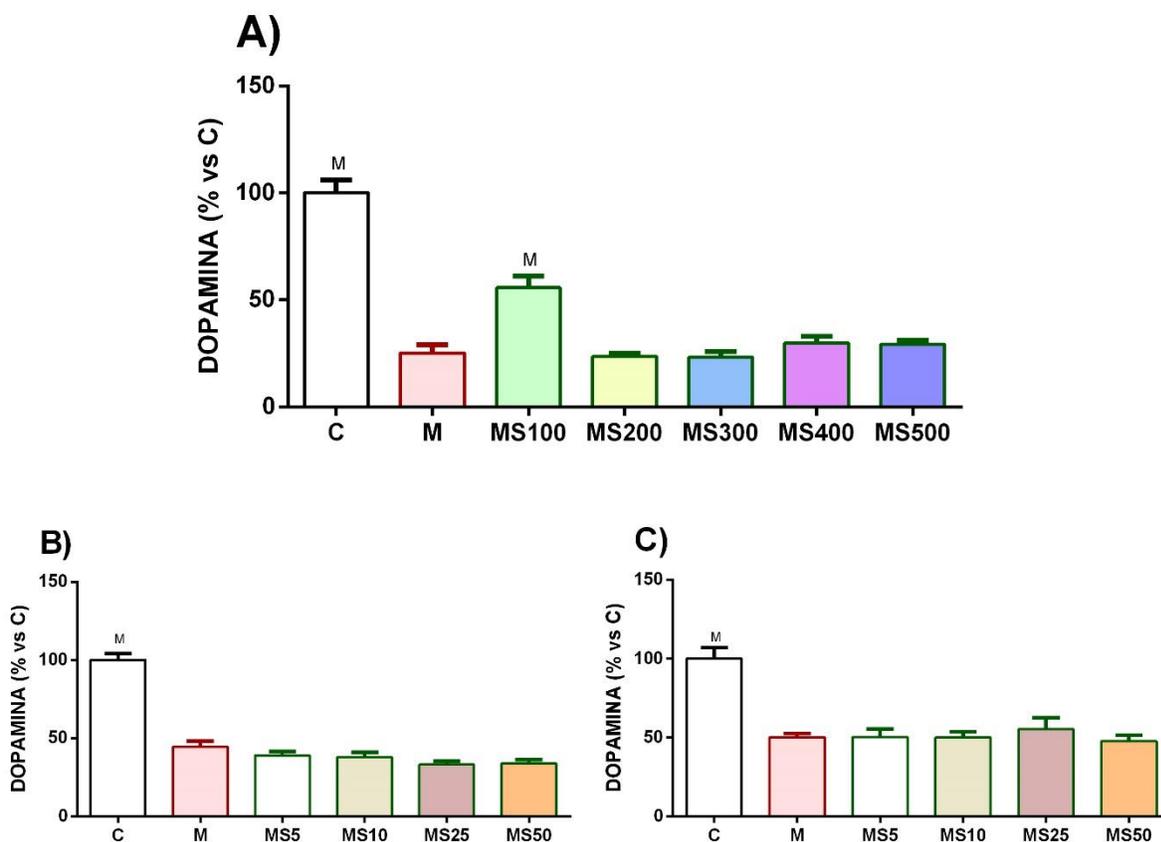
Por último, y complementando con las pruebas anteriores, en la prueba de RT los roedores con administración de MPTP sin tratamientos adicionales mostraron un incremento en la latencia de escape (Figura 16h) y la escala de escape (figura 16i) ya que, al presentar fallas en la coordinación motora, tienen dificultades para cruzar la barra y como se observa en ambas gráficas, el tiempo es mayor en un 50% aproximadamente. También se vio una alteración en el equilibrio al reducirse el porcentaje de Escape (Figura 16j) por deserción en el contexto de no arribar por quedarse estático o posado sobre la barra sin poder concretar la prueba. El porcentaje de tracción disminuyó, ya que fueron pocos los ratones que lograron mantenerse tomados de la barra horizontal sin caerse, demostrando una falla en la fuerza muscular (Figura 16k). Sin embargo, este último parámetro, aunque tiene diferencia estadística, parece requerir un aumento en el número de individuos evaluados

para mejorar su poder analítico predictivo. Así, la evaluación de la silibina coadministrada con la neurotoxina MPTP puede ser evaluada en función de la mejora en las habilidades motoras que evalúan estas cuatro pruebas, denotando su capacidad terapéutica escalada a la sintomatología motora asociada a la EP.

Con estos resultados se demuestra que el modelo de MPTP fue reproducido exitosamente, por lo que es óptimo para la evaluación de un fármaco neuroprotector.

## **8.2. La silibina administrada por vía oral conserva los niveles de dopamina estriatal, por vía intranasal no.**

La silibina es la molécula más abundante en la silimarina que conserva sus propiedades bioactivas (Bijak, 2017; Federico, Dallio, & Loguercio, 2017), es por ello que, en la búsqueda de evaluar su capacidad como neuroprotector en la EP, en este trabajo se realizó una coadministración de la toxina MPTP con diferentes dosis de silibina por VO e IN. Se partió de la dosis 100 mg/Kg de peso de silimarina previamente reportada por Pérez-H y colaboradores (2014), evaluando dosis mayores para la vía oral (100 a 500 mg/kg) y menores en la vía IN (5 a 50 mg/Kg), ya que la vía IN mejora de biodisponibilidad y requiere de dosis reducidas con respecto a otras vías de administración (Mittal, y otros, 2014).



**Figura 13. Curva de conservación de dopamina estriatal por el efecto de la silibina.** La técnica fue evaluada con HPLC ( $n = 10$  ratones por grupo, excepto C,  $n = 5$  ratones por grupo). Se muestran los datos correspondientes a la administración de silibina por: vía oral con vehículo de aceite vegetal (**A**) y vía intranasal con vehículos de glicerol (**B**) y aceite vegetal (**C**). Los datos se presentan como media del porcentaje con respecto al control  $\pm$  EEM. C representa diferencia significativa ( $P < 0.005$ ) respecto al control y M representa diferencia significativa ( $P < 0.0005$ ) respecto al grupo de MPTP. Para el análisis estadístico se realizaron ANOVA de una vía con post hoc de Bonferroni (B) y Prueba de Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn (A, C).

En la figura 13 se observa que la administración de silibina por vía oral en la dosis de 100 mg/Kg VO revirtió parcialmente la depleción inducida con la toxina MPTP (Figura 13a). Esta dosis de silibina asemeja a la reportada por Pérez-H y colaboradores (2014). Sin embargo, no se observó que las demás dosis conservaran los niveles de DA, además no se observó que la curva fuera monótonica dependiente de la dosis, como previamente se había reportado (Pérez-H, y otros, 2014). Esta ausencia de efecto neuroprotector de la silibina en dosis orales mayores a 100 mg/Kg pudiera deberse a que cuando se encuentra en exceso, los antioxidantes como la silibina favorecen la peroxidación de lípidos y la síntesis de

mediadores pro-inflamatorios como la IL-1 $\beta$  y el óxido nítrico (Malekinejad, Rahmani, Valivande-Azar, Taheri-Broujerdi, & Bazargani-Gilani, 2012; Johnson, Osuchowski, He, & Sharma, 2002), debido a que en ausencia de radicales libres las moléculas antioxidantes tienden a la auto-oxidación por la desestabilización de sus estructuras, obteniendo actividad como pro-oxidantes, que en consecuencia inducen un fenómeno pro-inflamatorio. A este fenómeno se le conoce como la paradoja antioxidante (Halliwell, 2013).

La dosis oral de 100 mg/Kg presentó niveles estriatales de dopamina 30% más elevados que el grupo de MPTP, lo que indica que tiene actividad neuroprotectora, posiblemente por sus propiedades antioxidantes, evitando el daño causado por el MPTP vía ERONs, funcionando como captor de estas especies, impidiendo el daño neuronal y posterior muerte celular. Esta vía de neuroprotección se evalúa con el ensayo de TBARS que se discute más adelante. Otra actividad importante que puede estar ejerciendo la silibina es como anti-inflamatorio, ya que anteriormente se ha documentado que tiene la capacidad de disminuir la inflamación en enfermedades como artritis reumatoide (Gupta, y otros, 2000), por lo que más adelante en este trabajo se evaluó la modificación en los niveles de TNF- $\alpha$  en CE y SN tras la administración de la silibina.

Se sabe que la silibina, al ser una molécula con características lipofílicas, con un peso molecular menor a 500 g/mol, bajo grado de toxicidad, sin reportes de efectos adversos de consideración clínica (Biedermann, Vavriková, Cvak, & Kren, 2014) y que es soluble en vehículos inocuos para las mucosas nasales como el glicerol y los componentes del aceite vegetal, como el ácido oleico (Javed, Kohli, & Ali, 2011), es candidata para su aplicación por la vía IN, disuelto en un vehículo de prueba como los anteriormente mencionados (Mittal, y otros, 2014). Sin embargo, en contraste con el hallazgo para la VO, observamos que la silibina administrada por la vía IN no conserva los niveles de DA independientemente

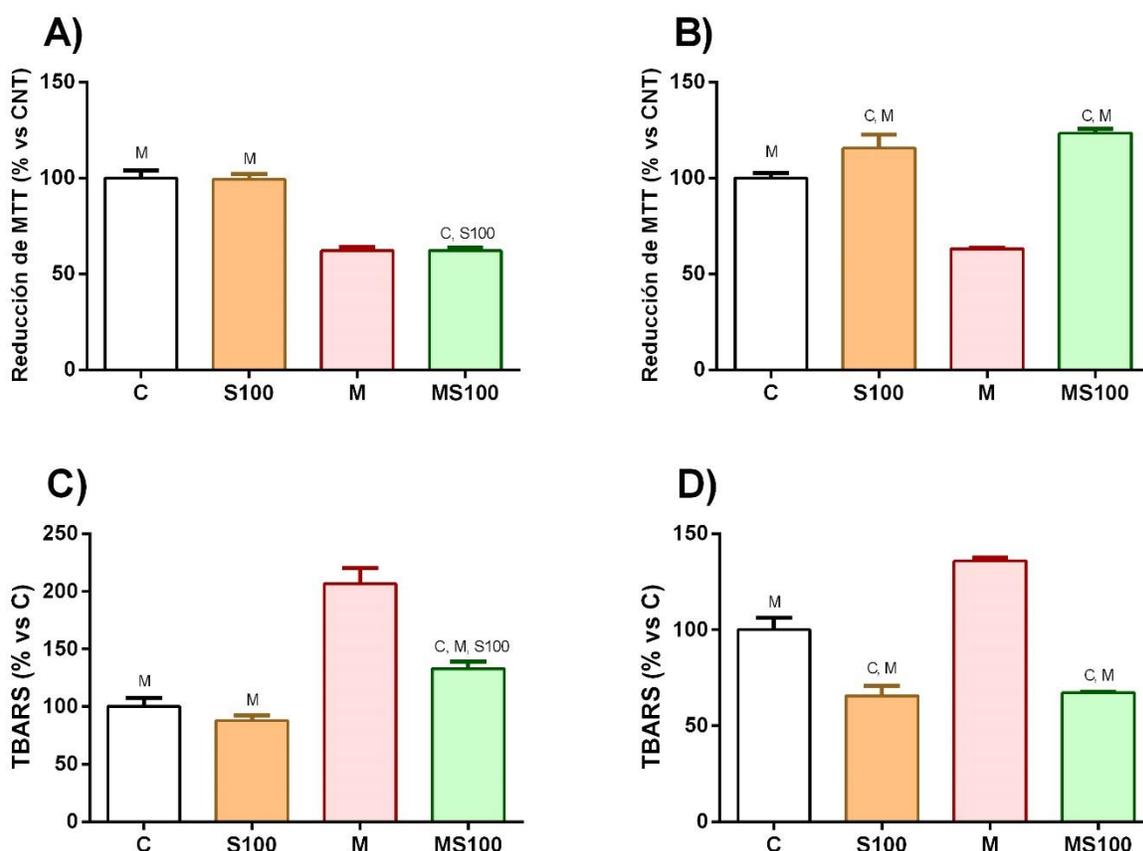
del vehículo empleado (glicerol y ácido oleico) y los diferentes grupos experimentales se comportan igual que el grupo de MPTP (Figuras 13b y 13c). Por estas observaciones inferimos que la silibina administrada por esta vía no es capaz de ejercer efectos potencialmente neuroprotectores. Algunos de los mecanismos de depuración en el epitelio nasal como la sobreproducción de moco, que tiene un alto efecto adhesivo, o el movimiento ciliar, que pudiera estar depurando la cavidad nasal mecánicamente, pudieran impedir el contacto de la silibina con el epitelio nasal, evitando así su ingreso por cualquiera de las vías mencionadas en la figura 10 (Illum, 2006). Otra posibilidad es que la molécula no sea capaz de atravesar el epitelio nasal, pues depende del cruce transcelular o paracelular en las células epiteliales y dada su naturaleza polifenólica, podría no ser lo suficientemente lipofílica para actuar por esta vía de cruce (Biedermann, Vavriková, Cvak, & Kren, 2014). Adicionalmente puede ser que la silibina esté siendo metabolizada por las enzimas que se encuentran en la mucosa nasal, ya que tienen actividades hidrolíticas y pudieran estar modificando la estructura molecular, quitándole sus propiedades bioactivas o también oxidándola a 2,3-DHS u otro metabolito al entrar en contacto con los componentes del moco como la mucina, secretado en toda la fosa nasal, provocando que se pierda la capacidad de cruce en el epitelio. Finalmente, el problema podría radicar en la vía de ingreso a SNC, ya que en caso de que la molécula sí cruzara la barrera epitelial, podría estar llegando a núcleos neuronales no estudiados en este trabajo, ajenos a la vía nigroestriatal, por lo que no se observó neuroprotección en el contexto de la EP, pero en la evaluación de otras áreas neuronales sí podría estar ejerciendo algún efecto, como en bulbo olfatorio, uno de los primeros tejidos blancos de las neuronas de los nervios olfatorios (Dhuria, Hanson, & Frey, 2010). Por todo lo anterior, queda como perspectiva el seguimiento de la molécula de silibina en la administración por vía IN y su posible interacción con los componentes del

microambiente nasal, además de estudios de formulación para lograr optimizar el uso de esta vía para la silibina con alternativas de formulación como bioadherentes para la formación de geles o micro emulsiones que evitarían el contacto con el microambiente nasal y permitan la entrada de la molécula (Illum, 2006).

Por los resultados obtenidos en la VO y la falta de neuroprotección de la IN, a partir de este punto se hicieron las posteriores evaluaciones de los mecanismos responsables del efecto protector de la silibina únicamente con la dosis de 100 mg/Kg por vía oral, al ser la única dosis que demostró potencial neuroprotector. Así mismo, se introdujo un grupo experimental adicional al control de vehículos y al control con MPTP, que sólo recibió silibina en la dosis oral elegida, para comparar los posibles efectos que pueda ejercer la silibina en ausencia de un modelo de alto estrés oxidante, denominado S100.

### **8.3. La silibina oral restablece la eficiencia respiratoria mitocondrial y reduce la peroxidación lipídica causada por MPTP**

La propiedad antioxidante de la silibina ha sido ampliamente demostrada tanto en modelos *in vitro* (Hui-Hui, Yan, Shen, & Hong-Fang, 2016) como *in vivo* (Wellington & Jarvis, 2001). Su sistema aromático, en conjunto con algunos grupos hidroxilo, como el situado en el carbono 20 o el del carbono 7, le permiten capturar las especies reactivas tanto del grupo de ERONs como de radicales libres, impidiendo que produzcan daño celular por alterar las biomoléculas que se encuentran en dicho microambiente (Bijak, 2017; Biedermann, Vavriková, Cvak, & Kren, 2014).



**Figura 14. Ensayos de marcadores de daño por estrés oxidante.** Se presentan los valores correspondientes a la viabilidad celular por capacidad mitocondrial de reducción de MTT en cuerpo estriado (A,  $n = 8$ ) y sustancia nigra (B,  $n = 4$ ), así como la cuantificación de lipoperoxidación por la formación de TBARS en cuerpo estriado (C,  $n = 8$ ) y sustancia nigra (D,  $n = 4$ ). Los datos se presentan como media del porcentaje con respecto al control  $\pm$  EEM. C representa diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) respecto al control, M representa diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) respecto al grupo de MPTP y S100 representa diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) respecto al grupo de sólo silibina. Para el análisis estadístico se realizaron pruebas de Kruskal-Wallis con post-hoc de Dunn.

En este trabajo se evaluó el efecto antioxidante de la silibina en el modelo tóxico de MPTP a través del funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial a través del ensayo de reducción del bromuro de azul metil-tiazolil-tetrazolio (MTT) (García, y otros, 2008; Pérez-De La Cruz, y otros, 2005).

El ensayo de MTT se basa en la capacidad de las fracciones mitocondriales de reducir una molécula cromógena, las sales de tetrazolio, que cambian de color al reducirse a formazán y pueden ser cuantificadas por espectrofotometría.

Adicionalmente se evaluó la disminución en el ambiente oxidante asociado con la neurotoxina activa, con la cuantificación de TBARS demostrando la actividad *in situ* de la silibina como antioxidante.

El ensayo de cuantificación de lípidos oxidados (LP) por identificación de especies reactivas con el ácido tiobarbitúrico es un método certero para caracterizar el daño membranar que es consecuencia de la exposición a estrés oxidante o medios altamente oxidantes, y se basa en la identificación mayoritariamente de MDA por su reacción con el TBA, formando especies coordinadas coloridas que son identificadas por medio de espectrofotometría (García, y otros, 2008).

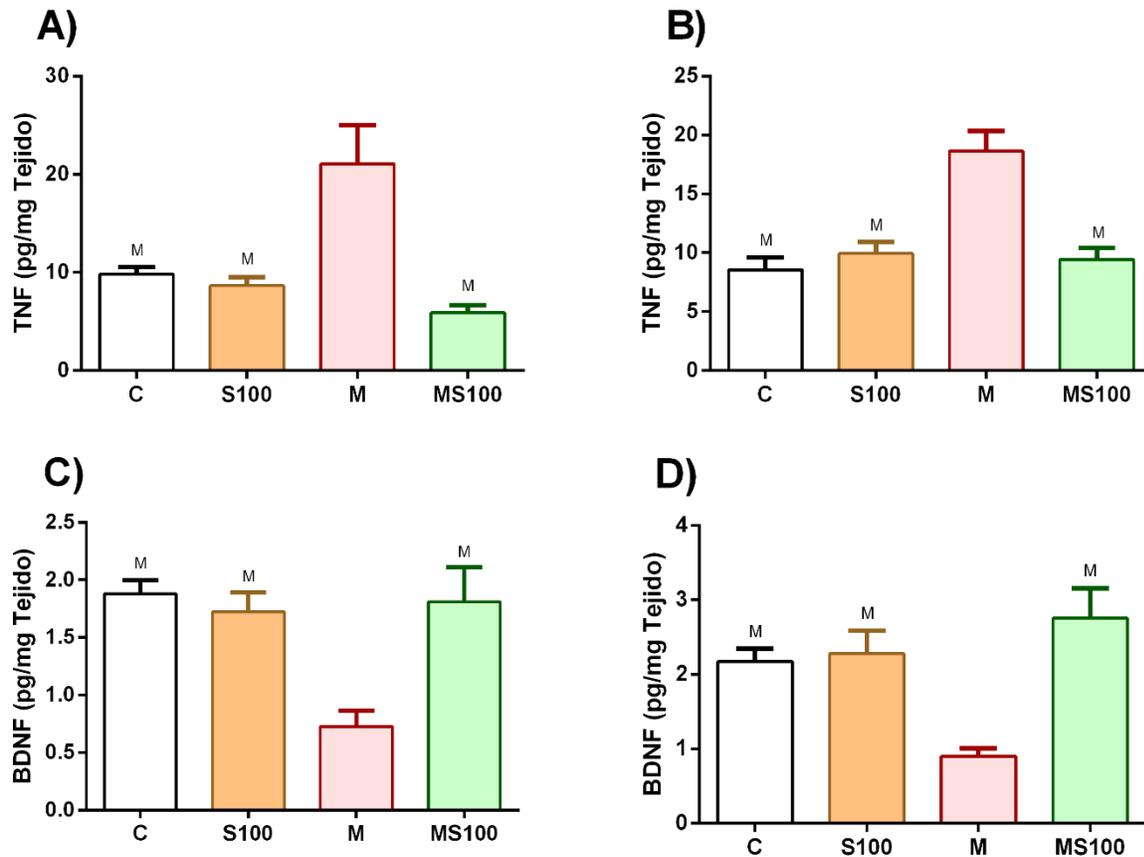
Nuestros datos muestran que en el CE la administración de silibina sola no modifica la función mitocondrial con respecto a los controles, sin embargo, en SN aumentó significativamente comparado con los controles (Figuras 14a y 14b).

Interesantemente la administración de silibina en el modelo de MPTP recuperó la función mitocondrial en la SN, incluso superó significativamente los niveles de los controles (Figura 14b); sin embargo en el CE no se observó este efecto (Figura 14a). Estos resultados apuntan a que el arribo de la silibina a SNC podría estar favorecido más a SN que CE, ya que se observa que la silibina sí revierte la disminución de la eficiencia respiratoria mitocondrial en SN. El efecto protector mostrado en el ensayo de MTT posiblemente se debe a que la silibina reduzca las ERONs, mejorando así la sobrevivencia neuronal (Dias, Junn, & Mouradian, 2013; Murphy, 2009).

A continuación, se comprobó el efecto antioxidante de la silibina a través de la cuantificación de TBARS en CE y SN. En las figuras 14c y 14d se observa que el MPTP incrementó significativamente las especies peroxidadas en las fracciones mitocondriales de ambas áreas evaluadas, lo que obedece a un incremento proporcional en la cantidad de especies

reactivas de oxígeno y nitrógeno que están en el medio por consecuencia del MPTP (Segura-Aguilar & Huenchuguala, 2018). A diferencia de los resultados de MTT, la silibina sí mostró efecto en el CE del grupo MS100 y disminuyó la cantidad cuantificada de especies reactivas respecto al grupo *M*, cabe destacar que no restableció al nivel basal de los controles. Asimismo, en el grupo S100 se observa una ligera tendencia de disminución de las especies reactivas basales sin la influencia del modelo de EP, pero no es estadísticamente significativo ( $p = 0.06$ ). Por otro lado, en SN la coadministración de silibina y MPTP sí redujo la lipoperoxidación, incluso respecto al grupo control, lo cual es consistente con el grupo que sólo recibió silibina, el cual también presentó una reducción de los niveles basales con respecto al control. Como se puede observar, los efectos que ejerce la silibina como antioxidante se ve más acentuada en SN que en CE, lo que refuerza la hipótesis del arribo de la silibina más favorecido en SN que en CE, pero demostrando que tiene efecto antioxidante en ambas áreas.

## 8.4. La silibina administrada oralmente disminuye los niveles de neuroinflamación por TNF- $\alpha$ e incrementa los niveles de BDNF asociados al MPTP



**Figura 15. Determinación de factores solubles.** Los valores presentados se obtuvieron por ELISA de captura ( $n = 8$  ratones por grupo) para la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$  en CE (A) y SN (B), además de la cuantificación del factor neurotrófico BDNF también en cuerpo estriado (C) y sustancia nigra (D). Los datos se presentan como media del porcentaje con respecto al control  $\pm$  EEM. M representa con diferencia significativa ( $P < 0.005$ ) respecto al grupo de MPTP. Para el análisis estadístico se empleó ANOVA de una vía con post hoc de Bonferroni.

Otro de los puntos importantes en la evaluación de la silibina como potencial agente neuroprotector es la disminución en los niveles de moléculas inflamatorias asociadas al daño causado por el estrés oxidante que genera el MPTP (Tansey, McCoy, & Frank-Cannon, 2007). Como se mencionó previamente, el daño provocado por las especies reactivas, genera ambientes con alarminas o patrones moleculares asociadas al daño

celular (DAMPs), que activan a las células inmunológicas presentes en el parénquima cerebral de las áreas afectadas (Ikezu & Gendelmann, 2017) y las polariza hacia perfiles proinflamatorios M1, secretando moléculas con funciones de quimiotaxis de células inmunitarias y activación de mecanismos de defensa (Orihuela, McPherson, & Harry, 2015). Por medio de la cuantificación de los niveles de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$  se evaluó la función anti-inflamatoria de la silibina.

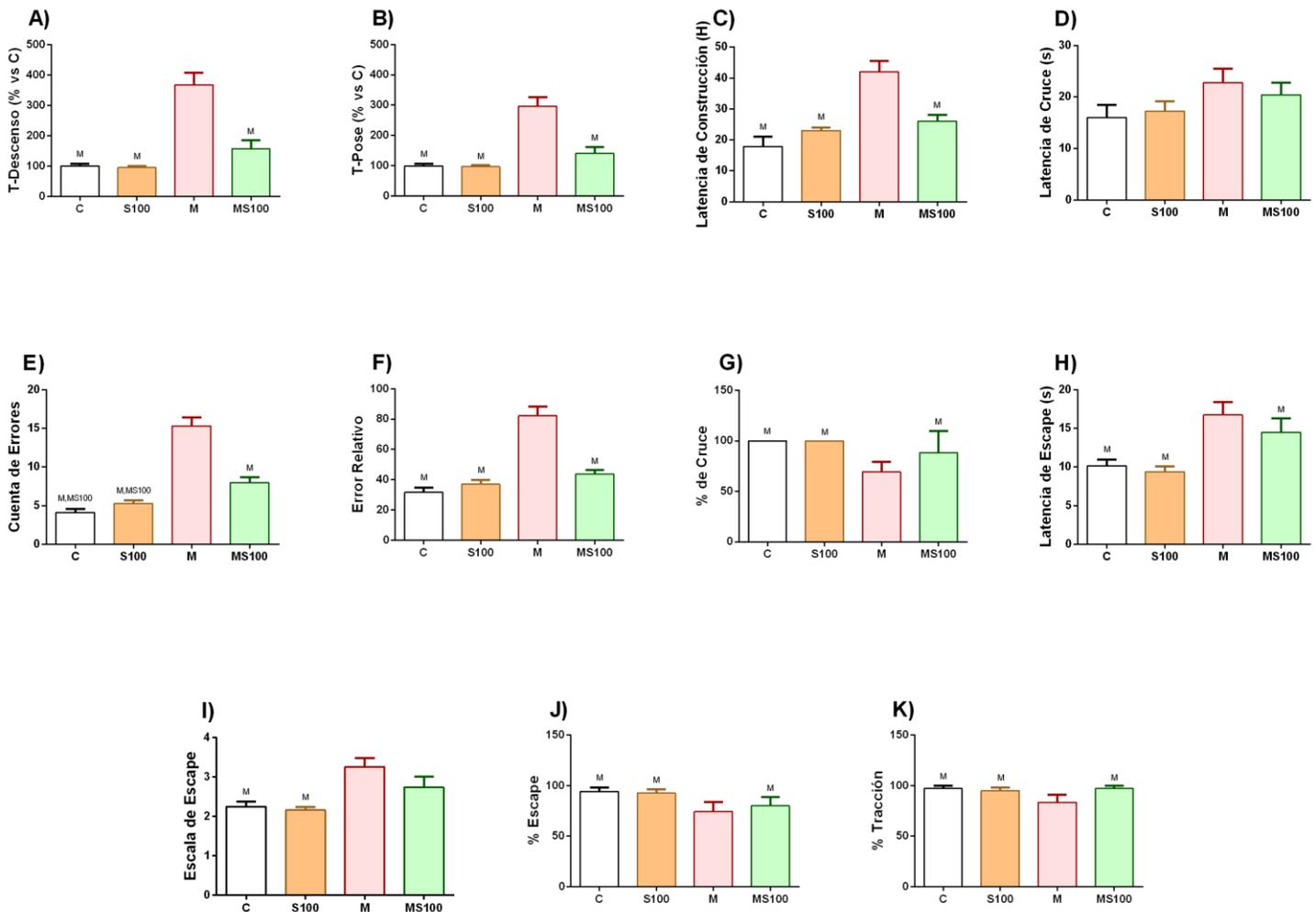
El factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) es una molécula de gran importancia en el mantenimiento metabólico de las neuronas dopaminérgicas (Hernández-Baltazar, y otros, 2018), forma parte de la familia de factores de crecimiento y sus vías de señalización están asociadas a la supervivencia neuronal relacionada a la síntesis de proteínas y la transcripción de genes vitales (Mercado, Collier, Sortwell, & Steece-Collier, 2017), así como la inhibición de la apoptosis por vía intrínseca (Ueda & Fujita, 2004). El BDNF también es fundamental para la plasticidad sináptica y estabilidad de la morfología neuronal (Gibon & Barker, 2017). Por estos motivos se evaluó el efecto de la silibina sobre los niveles de BDNF en el contexto del modelo de MPTP, lo cual nos pudiera indicar un potencial mecanismo de neuroprotección asociado a un impacto sobre la supervivencia neuronal mediado por BDNF.

En cuanto a los niveles de TNF- $\alpha$  en CE (figura 15a) y SN (Figura 15b) se observó un comportamiento similar, en ambas regiones cerebrales, ya que la administración del MPTP incrementó el TNF- $\alpha$  de 1.5 a 2 veces. La coadministración de silibina y MPTP, MS100, disminuyó muy significativamente los niveles de TNF- $\alpha$  restableciéndolos a los niveles basales de los controles, sin modificar los niveles de TNF- $\alpha$  en los grupos que sólo recibieron silibina. Es posible que la silibina esté actuando como anti-inflamatorio, al inhibir las cascadas de señalización pro-inflamatorias como el NF- $\kappa$ B, lo que ya se ha observado

en otras enfermedades (Esmail, Anarki, Gharagozloo, & Moayedi, 2017). La silibina evita que este factor de transcripción se trasloque al núcleo de la microglía o macrófagos y que por ende se sinteticen citocinas proinflamatorias, como el TNF- $\alpha$  (Ikezu & Gendelmann, 2017). El efecto de la silibina sobre los niveles de TNF- $\alpha$  también pudiera ser consecuencia de su efecto antioxidante, ya que, al disminuir el daño provocado por las ERONs y el estrés oxidante, se reducen los DAMPs en el microambiente, y la polarización a M1 estaría menos favorecida, disminuyendo así los niveles de TNF- $\alpha$  (Yao, y otros, 2017).

En cuanto a los niveles de BDNF, el modelo de EP con el MPTP presentó niveles reducidos de esta neurotrofina (Figura 15c y 15d), la administración de silibina revirtió este fenómeno en ambos núcleos neuroanatómicos, restableciendo los niveles del BDNF a los basales de los grupos controles. La acción de la silibina específicamente asociado a los niveles de BDNF es aún desconocida, pero con los resultados obtenidos, se puede inferir que tiene una acción protectora al restablecer los niveles de esta molécula, necesaria para la supervivencia neuronal (Hernández-Baltazar, y otros, 2018). Una posible explicación es que la microglía tanto en estado de quiescente como en el perfil M2, es productora de BDNF, ayudando al mantenimiento metabólico neuronal junto a los astrocitos, en la comunicación tripartita (Subramaniam & Federoff, 2017; Charron, y otros, 2014). La silibina al fungir como anti-inflamatorio, la silibina pudiera promover que la microglía continúe con sus funciones homeostáticas y se produzca correctamente este factor neurotrófico. Otra alternativa es que la silibina pueda ser ligando de algún receptor o enzima asociada a la producción o señalización del BDNF, estimulando que se restablezcan los niveles de este factor de crecimiento, sin embargo, no se observan modificaciones de los niveles basales de BDNF en los grupos de administración de silibina sin MPTP, por lo que esta posibilidad es menos viable.

## 8.5. La administración de la silibina VO mejora las deficiencias motoras en el modelo de MPTP: Bradicinesia, coordinación motora, equilibrio y tono muscular.



**Figura 16. Pruebas conductuales para la evaluación motora.** Evaluación de la coordinación motora de los grupos experimentales ( $n = 8$  ratones por grupo, excepto C). Descenso en tubo: Tiempo de descenso “T-Descenso” (A) y Tiempo de pose de las 4 patas sobre la base “T-Pose” (B) para evaluar bradicinesia y coordinación motora gruesa. Prueba de Construcción de nido: Latencia de Construcción (C,  $n = 3$ ) para evaluar la coordinación orofacial. Caminata sobre rejilla: Latencia de cruce (D), Cuenta de errores cometidos por los ratones (E), Error Relativo (F) y % Cruce (G) para evaluar coordinación motora fina. Prueba de Reflejo de tracción: Latencia de escape (H), Escala de escape (I), % Escape (J) y % Tracción (K) para la evaluación de la fuerza muscular, equilibrio y coordinación motora. Los datos se presentan como la media de cada unidad correspondiente  $\pm$  EEM. M representa diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo de MPTP y MS100 representa diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo de coadministración MPTP-Silibina. Para el análisis estadístico se realizaron pruebas de Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn con un poder estadístico de  $P < 0.05$ .

Para demostrar que los beneficios de la silibina como neuroprotector son perceptibles a nivel de signos motores, se realizaron 4 pruebas conductuales y así poder mostrar que, como parte de su efecto terapéutico, la silibina funge restableciendo las actividades motoras de los ratones con MPTP.

Se aplicaron 4 pruebas físicas: la prueba de descenso en tubo, que evalúa la bradicinesia y la CMG (Sedelis, y otros, 2000); la prueba de construcción de nido que tiene como objetivo evaluar la coordinación orofacial, como indicador de la CMF (Fujita, y otros, 2018); la prueba de caminata en rejilla, cuya aplicación evalúa el rendimiento motor asociado a la CMF y el equilibrio (Richter, y otros, 2017); y la prueba de reflejo de tracción que evalúa el equilibrio y la fuerza o tono muscular (Hu, Li, & Wang, 2018), además de ser una confirmación complementaria a CR para la estimación de alteraciones en la CMF (Blanco Lezcano, y otros, 2010).

Respecto a la prueba de DT, en la figura 16a se muestran los resultados del T-descenso, que indica cuánto tiempo tardó en promedio el grupo de ratones en descender el tubo hasta su base sin tocar el piso. En la figura 16b se muestran los resultados del T-pose, que hace referencia al tiempo que le toma a cada grupo experimental descender por el tubo del sistema desde la punta hasta que posa las 4 patas sobre el piso de la base. En esta prueba la administración de MPTP ralentizó la bajada de los animales por el sistema, demostrando que existe un fenómeno de bradicinesia y fallas en la CMG al implementarse el modelo de EP. Ambos parámetros que reporta la literatura presentan el mismo comportamiento, por lo que se puede concluir que sólo es necesario la elección de uno de los dos para el análisis como parte de un perfil de evaluación de mejora motriz, ya que no se aportan información complementaria entre ellos y describen exactamente lo mismo. Cabe destacar que la tendencia indica que el poder predictivo del T-descenso es mayor al que presenta el T-pose

ya que las diferencias entre los grupos fueron más notorias. La coadministración de la silibina con el modelo de MPTP mejoró significativamente en el tiempo de descenso y el tiempo de pose, mejorándolos hasta lo que aparentan ser los valores de los controles en ambas pruebas. Sin embargo, la tendencia indica que el tiempo que tarda el grupo MS100 es ligeramente mayor a los grupos *C* y *S100*, esta diferencia podría observarse mejor al incrementar la población experimental. Podemos concluir con esta prueba, que la silibina sí tiene efectos benéficos sobre la bradicinesia y la CMG.

Con respecto a la prueba de CN, se puede observar en la figura 16c que los animales del grupo con MPTP tardan más del doble de tiempo en comenzar a roer el material de enriquecimiento que los controles *C* y *S100*, situación que se revirtió parcialmente en la coadministración con la silibina, reduciendo el tiempo de inicio de mordedura al cartón. Estos datos muestran que la silibina mejora la CMO, que forma parte de la coordinación motora fina, demostrando que tiene efecto en ambos niveles de coordinación motora.

Así mismo, para la prueba de CR, se puede observar que la gráfica 16d, que presenta la latencia de cruce de los ratones sobre el sistema de rejilla, no tiene diferencias significativas entre los grupos, pero la tendencia indica que el grupo con MPTP sí incrementa el tiempo que tarda en cruzar. En la figura 16e se muestran los errores totales promedio de los animales de cada grupo experimental, obteniendo diferencias estadísticas con el grupo de MPTP, que comete casi el triple de errores que los controles y que se reduce muy notoriamente con la coadministración con silibina. Sin embargo, existe un sesgo de información ya que, si las tendencias de 16d indican que los grupos con MPTP tardan más en cruzar el sistema, entonces tendrían más tiempo de cometer errores y se pudiera estar sobreestimando el parámetro, por ello normalizamos la cantidad de errores por segundo que cometen los animales con el cálculo del error relativo como se describe en la ecuación

2, de manera que se normalicen estos valores y se pueda observar las fallas en la CMG. En la gráfica 16f, el grupo *M* tiene una mayor cantidad de errores por segundo que los grupos control, mientras que el grupo MS100 con la coadministración de silibina muestra una significativa reducción de los errores por segundo, lo cual es comparable con los controles. De la misma forma, al comparar las tendencias, se observa que el resultado del error relativo tiene un parecido con los errores totales, pero al hacer la normalización de los valores se aumenta la resolución y se elimina la sobreestimación de los controles respecto al grupo con la coadministración, en conjunto demostrando que la silibina mejora la CMF y el equilibrio producidos por el MPTP. El parámetro de porcentaje de cruce (Figura 16g) evalúa la cantidad de animales que completaron satisfactoriamente la prueba de CR. En este rubro, el grupo *M* tiene una mayor deserción que los grupos controles, lo que se revierte parcialmente en la coadministración de silibina, indicando que existe una mejora de las fallas en CMF, correspondiente con los resultados de 16e y 16f.

La última prueba motora es el RT, donde se evalúa complementariamente la CMF, el equilibrio y la fuerza o tono muscular, como ya se ha discutido en apartados anteriores. Como se observa en la figura 16h, la latencia de escape de los animales hacia alguno de los extremos del sistema está ralentizado en los grupos con MPTP y se revierte en los grupos con MPTP y silibina coadministrada, situación que no se refleja con el uso de la escala de Deacon, ya que la puntuación arbitraria, permite ver la misma tendencia que la latencia, pero tiene menor resolución estadística, por lo que es mejor el uso del parámetro de latencia en horas. Por otro lado, en la figura 16j se evalúa el porcentaje de escape de los grupos experimentales como propuesta de un nuevo parámetro para esta prueba (Ecuación 4). Lo que se busca evaluar es la cantidad de animales que logran completar la prueba satisfactoriamente, pues en la escala de Deacon, se consideran los tiempos largos,

las caídas y la falla de movimiento por igual, sin aprovechar la información que puede dar el sistema con esos criterios. Al analizar la gráfica, se observa que, los grupos administrados con la toxina presentan un menor porcentaje de escapes, debido a que presentan una mayor cantidad de fallas en la coordinación motora y equilibrio, evitando que completen el reto. En contraste, el grupo MS100 tiene una menor cantidad de deserciones equiparable a los controles, pero con la tendencia de ser menores a ellos. Como último punto de la prueba de RT, en la gráfica 16k se muestran los porcentajes de tracción obtenidos del cálculo propuesto en la ecuación 5, donde se evalúa el tono muscular derivado de la cantidad de ratones que son capaces de permanecer sin caer del sistema, independientemente si son capaces o no de concluir el reto principal. En este contexto, se observó que el grupo M tiene un menor porcentaje de tracción que los demás grupos, siendo revertido con la coadministración de silibina, por lo que se muestra que la silibina también tiene un efecto terapéutico sobre la mejora en el tono muscular.

En conjunto, sobre todas las pruebas motoras, se consideran las tendencias con relevancia para el análisis del comportamiento pues se ha reportado en varios artículos la necesidad de una población alta de animales en las pruebas de este tipo para detectar correctamente los cambios en el comportamiento (Teegarden, 2012), sin embargo, por razones bioéticas, se prefiere evaluar este proyecto con la silibina utilizando grupos experimentales de modesta población. Con base en esto, se demuestra que con poblaciones de alrededor de 8 roedores es suficiente para detectar los cambios necesarios para asegurar que la silibina tiene efectos benéficos sobre la deficiencia en el perfil motriz del modelo de EP.

En el contexto de los resultados de todas las pruebas motoras, se demuestra que la silibina mejora la habilidad motriz de los animales sometidos al tratamiento con MPTP, mostrando una mayor capacidad de coordinación, tanto motora gruesa con la prueba de DT, como

motora fina, con las pruebas de CN, CR y RT. También ayuda a reducir la bradicinesia, demostrado en la prueba de DT y a mejorar el equilibrio como se ve reflejado en las pruebas de CR y RT, así como la mejora en el tono muscular como lo revela la prueba de RT. El principal motivo por el cual la silibina puede estar ejerciendo estos efectos terapéuticos es que la mejora de los aspectos bioquímicos asociados a neuroinflamación y estrés oxidante, evitan la pérdida de conexiones neuronales, densidad celular y concentración de neurotransmisor, que son necesarias para ejecutar las funciones del sistema motor correctamente, corroborando la actividad neuroprotectora a nivel de SNC en la EP. Así, se comprueba que la silibina además de mejorar los aspectos bioquímicos relacionados con la EP en el modelo murino, también es capaz de corregir significativamente los signos motores asociados.

Analizando en conjunto los resultados de todos los experimentos, se puede observar que la silibina, al tener efectos antioxidantes y anti-inflamatorios, evita que la exposición al elevado estrés oxidante provocado por el MPTP, genere daños importantes en las neuronas, ya que disminuye los niveles de lipoperoxidación y mejora la función respiratoria de las mitocondrias. También disminuye los niveles de TNF- $\alpha$ . Gracias a estos efectos, se observa un restablecimiento de niveles de BDNF y de niveles de DA, lo que pudiera explicar las mejorías en los signos motores, validando en conjunto los resultados de la silibina como molécula neuroprotectora en una dosis de 100 mg/Kg administrada por la vía oral.

## **8.6. La silibina VO oral tiene efecto neuroprotector en la misma dosis que la silimarina IP ¿Una alternativa con mayor potencial farmacológico?**

Como ya se ha abordado previamente, un estudio realizado en 2014 por Pérez-H y colaboradores mostró que la administración de silimarina por vía IP, conservaba los niveles

de DA estriatal, siendo la dosis más efectiva la de 100 mg/Kg, seguida de la dosis de 50 mg/Kg, ambas con una conservación casi 70% respecto a los controles. Por otro lado, los resultados obtenidos con la silibina VO, muestran que la silibina sola también tiene un efecto neuroprotector, conservando el 55% del contenido de DA que presentan los controles. La silibina al parecer tiene menor efecto terapéutico que la silimarina, sin embargo, hay que recordar que la silimarina tiene más moléculas con propiedades bioactivas a parte de la silibina (Polyak, y otros, 2007), por lo que es posible que todas estas moléculas pudieran actuar sinérgicamente en el modelo de MPTP. Otra posible explicación, es que probablemente esté influyendo también la vía de administración, pues Pérez-H y colaboradores abordaron la administración de la silimarina por la vía intraperitoneal, disminuyendo así la baja absorción por vía oral de la silimarina. A pesar de haber empleado la vía oral para la administración de la silibina, nuestros datos mostraron que si se administra en un vehículo como el aceite vegetal igual presenta efectos neuroprotectores, conservando los niveles de DA, disminuyendo la lipoperoxidación, los niveles de TNF- $\alpha$  y conservando así la función mitocondrial, los niveles de BDNF, lo cual se ve reflejado además en la conducta motora. Por lo que podemos concluir que la vía oral es viable para la administración de la silibina.

## 9. CONCLUSIÓN

La silibina conservó su efecto neuroprotector al ser administrada por la vía oral al preservar los niveles de dopamina en el cuerpo estriado de ratones con un fenotipo parkinsónico, no así al ser administrado por la vía intranasal. Así mismo, confirmó su poder neuroprotector tanto en CE como en SN al ser administrada por vía oral, ya que presentó características antioxidantes con la reducción de lipoperóxidos, antiinflamatorias al reducir el TNF- $\alpha$  cerebral, así también, preservando los niveles de BDNF, reestableciendo la función mitocondrial y por lo tanto los niveles de dopamina, lo que se ve reflejado en la mejoría de las características motoras. Por la vía intranasal, la silibina no mostró los efectos esperados en SNC, por lo que se deben realizar más estudios al respecto para elucidar si la vía no es viable o si se requiere optimizar la formulación.

## 10. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos respecto a la administración de la silibina por la IN dejan la incógnita de elucidar por qué esta molécula no fue capaz de ejercer una función neuroprotectora cuando se administró por la mucosa nasal. Por lo que queda como perspectiva determinar puntos importantes en el seguimiento del fármaco como: 1) si la silibina está ingresando al epitelio nasal hacia cualquiera de las vías de conexión con SNC, 2) o es drenada o metabolizada cuando se encuentra en la mucosa nasal. 3) Es la silibina capaz de llegar a cualquiera de los núcleos importantes en el estudio de la EP (cuerpo estriado y sustancia nigra). 4) Se administró la silibina en dosis que son insuficientes, exceden o saturan las vías de entrada para tener un efecto benéfico.

Por otro lado, los estudios de la molécula con la vía de administración oral corresponden a un exitoso abordaje con proyección terapéutica, por lo que se proyecta una continuación en los estudios de mecanismo de acción, abordaje clínico y optimización en la formulación.

Como último punto, en este trabajo se discute el papel del modelo de MPTP para la evaluación de fármacos con actividad neuroprotectora y se plantea la posibilidad del trabajo sobre el MPTP para complementar los mecanismos de acción en los que ejerce efecto sobre la vía nigroestriatal, como ligando pro-inflamatorio, inhibidor de la síntesis de DA en algún punto de señalización metabólica o enzimática e incluso como inhibidor de la producción de factores neurotróficos como BDNF, que son posibilidades de investigación a futuro.

## 11. REFERENCIAS

- Aarsland, D., & Kurz, M. W. (10 de Abril de 2010). The Epidemiology of Dementia Associated with Parkinson's Disease. *Brain Pathol.*, 20(3), 633-639. doi:10.1111/j.1750-3639.2009.00369.x
- Alarcón-Aguilar, A., Santamaría del ángel, A., & Königsberg, M. (2010). Modelos Neurotóxicos de la Enfermedad de Parkinson y Disfunción Mitocondrial. *REB*, 29(3), 92-100. Obtenido de <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=49015072004>
- Albutt, H. N., & Henderson, J. M. (2007). Use of the narrow beam in the rat, 6-hydroxidopamine model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Methods*, 159, 195-202. doi:10.1016/j.jneumeth.2006.07.006
- Ansel, H. (2011). Chapter 5: Biopharmaceutical and Pharmacokinetic Considerations. En L. V. Allen, N. G. Popovich, & H. C. Ansel, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (9 ed.). Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins.

- Antony, P. M., Diederich, N. J., & Balling, R. (2011). Parkinson's disease mouse models in translational research. *Mamm Genome*, 22, 401-419. doi:10.1007/s00335-011-9330-x
- Arvanitakis, Z., Shah, R. C., & Bennett, D. A. (2019). Diagnosis and Management of Dementia: Review. *Clin. Rev. Educ.*, 322(16), 1589-1600. doi:10.1001/jama.2019.4782
- Au, J. L., Weishaupt, N., Nell, H. J., Whitehead, S. N., & Cechetto, D. F. (2016). Motor and Hippocampal Dependent Spatial Learning and Reference Memory Assessment in Transgenic Rat Model of Alzheimer's Disease with Stroke. *Journal of Visualized Experiments*, 109, e53089. doi:10.3791/53089
- Aulton, M. E. (2004). *Farmacía, la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas* (2° ed.). Madrid, España: Elsevier.
- Avila, A., Cardona, X., Martin-Baranera, M., Leon, L., Caballol, N., Millet, P., & Bello, J. (2015). Agomelatine for Depression in Parkinson Disease: Additional Effect on Sleep and Motor Dysfunction. *J Clin. Psychopharm.*, 35(6), 719-723. doi:10.1097/JCP.0000000000000404
- Beaulieu, J., Espinoza, S., & Gainetdinov, R. R. (2015). Dopamine receptors - IUPHARM Review 13. *Br. J. Pharmacol*, 172, 1-23. doi:10.1111/bph.12906
- Beckmann-Knopp, S., Rietbrock, S., Weyhenmeyer, R., Böcker, R., Beckurts, K. T., Lang, W., . . . Fuhr, U. (2000). Inhibitory effects of silibinin on cytochrome p-450 enzymes in human liver microsomes. *Pharmacol Toxicol*, 86(6), 250-256. doi:10.1111/j.0901-9928.2000.860602.x
- Berardelli, A., Rothwell, J. C., Thompson, P. D., & Hallett, M. (Noviembre de 2001). Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. *Brain*, 124(11), 2131-2146. doi:10.1093/brain/124.11.2131
- Berganzo, K., Tijero, B., González-Eizaguirre, A., Somme, J., Lezcano, E., Gabilondo, I., . . . Gómez-Esteban, J. C. (2016). Motor and Non-motor symptoms of Parkinson's disease and their impact on quality of life and on different clinical subgroups. *Neurología*, 31(9), 585-591. doi:10.1016/j.nrleng.2014.10.016
- Betarbet, R., Sherer, T., MacKenzie, G., García-Osuna, M., Panov, A., & Greenamyre, J. (2000). Chronic Systemic Pesticide Exposure Reproduces Features of Parkinson's Disease. *Nature Neuroscience*, 3, 1301-1306. doi:10.1038/81834

- Biedermann, D., Vavriková, E., Cvak, L., & Kren, V. (2014). Chemistry of silybin. *Nat.Prod. Rep.*, 31, 1138. doi:10.1039/c3np70122k
- Bijak, M. (2017). Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.)- Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. *Molecules*, 22, E1942. doi:10.3390/molecules22111942
- Birhanie, M. W., Walle, B., & Rebba, K. (2016). Hypnotic effect of the essential oil from the leaves of *Myrtus communis* on mice. *Nature and Science of Sleep*, 8, 267-275. doi:10.2147/NSS.S101493
- Blanco Lezcano, L., Lorigados, P., Fernández, C. I., Serrano, T., Pavón, N., & Francis, L. (2010). Aplicación del Test de la Barra Transversal Modificado para Evaluar Ratas Hemiparkinsonizadas. *Acta Biológica Colombiana*, 15(2), 189-202. Obtenido de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/11998>
- Blandini, F., & Armentero, M.-T. (2012). Animal Models of Parkinson's disease. *FEBS Journal*, 279, 1156-1166. doi:10.1111/j.1742-4658-2012.08491.x
- Bobela, W., Zheng, L., & Schneider, B. L. (2014). Overview of Mouse Models of Parkinson's Disease. *Current Protocols in Mouse Biology*, 4, 121-139. doi:10.1002/9780470942390.mo140092
- Braak, H., de Vos, R. A., Bohl, J., & Del Tredici, K. (2006). Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci. Letters*, 396, 67-72. doi:10.1016/j.neulet.2005.11.012
- Buhlman, L. M. (2016). *Mitochondrial Mechanisms of Degeneration and Repair in Parkinson's Disease*. (L. M. Buhlman, Ed.) Cham, Suiza: Springer International Publishing AG. doi:10.1007/978-3-319-42139-1
- Bult, A., van der Zee, E., Compaan, J. C., & Lynch, C. B. (1992). Differences in the number of arginine-vasopressin-immunoreactive neurons exist in the suprachiasmatic nuclei of house mice selected for differences in nest building behavior. *Brain Research*, 578, 335-338. doi:10.1016/0006-8993(92)90266-c

- Cady, R. (2015). A novel intranasal breath-powered delivery system for sumatriptan: a review of technology and clinical application of the investigational product AVP-825 in the treatment of migraine. *Expert Opin Drug Deliv*, 12(9), 1565–1577. doi:10.1517/17425247.2015.1060959
- Calleo, J. S., Amspoker, A. B., Sarwar, A. L., Kunik, M. E., Jankovic, J., Marsh, L., . . . Stanley, M. A. (2015). A Pilot-study of a Cognitive-Behavioral Treatment for Anxiety and Depression in Patients with Parkinson Disease. *J Geriatric Psych. and Neurol.*, 28(3), 210-217. doi:10.1177/0891988715588831
- Carter, R. J., Lione, L. A., Humby, T., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G. P., . . . Morton, J. A. (1999). Characterization of Progressive Motor Deficits in Mice Transgenic for the Human Huntington's Disease Mutation. *The Journal of Neuroscience*, 19(8), 3248-3257. doi:10.1523/JNEUROSCI.0270-64.1999
- Castañeda-Achutigui, F., Tejeda-Martínez, A., Escalante-Castañeda, A., Sucre-Bernes, H. A., Monterrubio-Ledezma, E., & García-Lemus, R. (2015). Modelos Clásicos de Inducción de Parkinson. *Revista eNeurobiología*, 6(13), 020915. Obtenido de [www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2015/13/13.html](http://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2015/13/13.html)
- Chadhuri, K. R., & Schapira, A. H. (Mayo de 2009). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *The Lancet Neurol.*, 8, 464-474. doi:10.1016/S1474-4422(09)70068-7
- Chambers, C. S., Holecková, V., Petrásková, L., Biedermann, D., Valentová, K., Buchta, M., & Kren, V. (2017). The silymarin composition... and why does it matter??? *Food Research International*, 100, 339-353. doi:10.1016/j.foodres.2017.07.017
- Charron, G., Doudnikoff, E., Canron, M., Li, Q., Véga, C., Marals, S., . . . Erwan, B. (2014). Astrocytosis in parkinsonism: considering tripartite striatal synapses in physiopathology? *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, e258. doi:10.3389/fnagi.2014.00258
- Chaturvedi, R. K., & Beal, M. F. (2008). Mitochondrial Approaches for Neuroprotection. *Mitochond. and Oxid. Stress in Neurodeg. Dis.*, 1147, 395-412. doi:10.1196/annals.1427.027

- Chauhan, M. B., & Chauhan, N. B. (2015). Brain Uptake of Neurotherapeutics after Intranasal Versus Intraperitoneal Delivery in Mice. *J Neurol Neurosurg*, 2(1), 1-20. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26366437>
- Chen, J., Song, J., Yuan, P., Tian, Q., Ji, Y., Ren-Patterson, R., . . . Weinberger, D. R. (2011). Orientation and cellular distribution of membrane-bound catechol-O-methyltransferase in cortical neurons: implications for drug development. *J. Biol. Chem.*, 286(40), 34752-34760. doi:10.1074/jbc.M111.262790
- Chhajed, S., Sangale, S., & Barhate, S. D. (2011). Advantageous Nasal Drug Delivery System: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(6), 1322-1336. doi:[http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2\(6\).1322-36](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2(6).1322-36)
- Cohen, A. I., Todd, R. D., Harmon, S., & O'Malley, K. L. (1992). Photoreceptors of mouse retinas possess D4 receptors coupled to adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, 12093-12097. doi:10.1073/pnas.89.24.12093
- Cookson, M. R. (Febrero de 2009). Alpha-Synuclein and Neuronal Cell Death. *Molec. Neurodegen.*, 4(9), 1-17. doi:10.1186/1750-1326-4-9
- Crowe, T. P., Greenlee, M. W., Kanthasamy, A. G., & Hsu, W. H. (2018). Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sciences*, 195, 44–52. doi:10.1016/j.lfs.2017.12.025
- Damier, P., Kastner, A., Agid, Y., & Hirsch, E. C. (1996). Does monoamine oxidase type B play a role in dopaminergic nerve cell death in Parkinson's Disease? *Neurology*, 46(5), 1262-1267. doi:10.1212/wnl.46.5.1262
- De Groot, H., & Rauen, U. (1998). Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol*, 12, 249-255. doi:10.1111/j.1472-8206.1998.tb00951.x
- de Oliveira, D. R., Schaffer, L. F., Busanello, A., Barbosa, C. P., Peroza, L. R., de Freitas, C. M., . . . Fachinetto, R. (29 de Marzo de 2015). Silymarin has antioxidant potential and changes the activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and monoamine oxidase in vitro. *Industrial Crops and Products*, 70, 347-355. doi:10.1016/j.indcrop.2015.03.060

- Deacon, R. M. (2006). Assessing nest building in mice. *Nature Protocols*, 1(3), 1117-1119. doi:10.1038/nprot.2006.170
- Deacon, R. M. (2013). Measuring Motor Coordination in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, 75, e2609. doi:10.3791/2609
- Deacon, R. M. (2013). Measuring the Strength of Mice. *Journal of Visualized Experiments*, 76, e2610. doi:10.3791/2610
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal natural products - A biosynthetic approach* (Tercera ed.). Ltd: John Wiley & Sons.
- Dexter, D. T., & Jenner, P. (4 de Febrero de 2013). Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 132-144. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.018
- Dhuria, S. V., Hanson, L. R., & Frey, W. H. (2010). Intranasal Delivery to the Central Nervous System: Mechanisms and Experimental Considerations. *J Pharm Sci*, 99, 1654–1673. doi:10.1002/jps.21924
- Dias, V., Junn, E., & Mouradian, M. M. (2013). The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *J. Parkins. Dis.*, 3, 461-491. doi:10.3233/JPD-130230
- Dorsey, E. R., Constantinescu, R., Thompson, J. P., Biglan, K. M., Holloway, R. G., Kieburtz, K., . . . Tanner, C. M. (30 de Enero de 2007). Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*, 68, 384-386. doi:10.1212/01.wnl.0000247740.47667.03
- Duquesnoy, C., Mamet, J., Summer, D., & Fuseau, E. (1998). Comparative clinical pharmacokinetics of single doses of sumatriptan following subcutaneous, oral, rectal and intranasal administration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 99-104. doi:10.1016/s0928-0987(97)00073-0
- Eleopra, R., Rinaldo, S., Devigili, G., Lettieri, C., Mondani, M., D'Auria, S., . . . Pilleri, M. (2019). Brain impedance variation of directional leads implanted in subthalamic nuclei of Parkinsonian patients. *Clinical Neurophysiology*, 130, 1562-1569. doi:10.1016/j.clinph.2019.06.001

- Esmail, N., Anarki, S. B., Gharagozloo, M., & Moayedi, B. (2017). Silymarin impacts on immune system as an immunomodulator: One key for many locks. *International Immunopharmacology*, 50, 194-201. doi:10.1016/j.intimp.2017.06.030
- Evans, J. J., Greenfield, E., Wilson, B. A., & Bateman, A. (2009). Walking and talking therapy: Improving cognitive-motor dual-tasking in neurological illness. *J Internat. Neuropsych. Soc.*, 15(1), 112-120. doi:10.1017/s1355617708090152
- Federico, A., Dallio, M., & Loguercio, C. (2017). Silymarin/Silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years. *Molecules*, 22(2), E191. doi:10.3390/molecules22020191
- Fernández, H. H. (2012). Updates in the medical management of Parkinson disease. *Cleve Clin J Med*, 79(1), 28-35. doi:10.3949/ccjm.78gr.11005
- Fleming, S. M., Ekhtor, O. R., & Ghisays, V. (2013). Assessment of Sensorimotor Function in Mouse Models of Parkinson's Disease. *Journal of Visualized Experiments*, 76, e50303. doi:10.3791/50303
- Fleming, S. M., Salcedo, J., Fernagut, P., Rockenstein, E., Masliah, E., Levine, M. S., & Chesselet, M. (2004). Early and Progressive Sensorimotor Anomalies in Mice Overexpressing Wild-Type Human Alpha-Synuclein. *Neurobiology of Disease*, 24(42), 9434-9440. doi:10.1523/JNEUROSCI.3080-04.2004
- Fortuna, J. T., Gralle, M., Beckmann, D., Neves, F. S., Diniz, L. P., Frost, P. S., . . . Figueiredo, C. P. (2017). Brain infusion of alpha-synuclein oligomers induces motor and non-motor Parkinson's disease-like symptoms in mice. *Behavioural Brain Research*, 333, 150-160. doi:10.1016/j.bbr.2017.06.047
- Fox, S. I. (2016). *Human Physiology* (14 ed.). New York, USA: McGraw-Hill Education.
- Francardo, V., & Cenci, M. A. (2014). Investigating the molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia in the mouse. *Parkinsonism and Related Disorders*, 20S1, S20-22.
- Francardo, V., Schmitz, Y., Sulzer, D., & Cenci, M. A. (2017). Neuroprotection and neurorestoration as experimental therapeutics for Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 298, 137-147. doi:10.1016/j.expneurol.2017.10.001

- Fujita, M., Hagino, Y., Takamatsu, Y., Shimizu, Y., Takamatsu, Y., Ikeda, K., & Hashimoto, M. (2018). Early manifestation of depressive-like behavior in transgenic mice that express dementia with Lewybody-linked mutant Beta-synuclein. *Neuropsychopharmacology Reports*, 38, 95-97. doi:10.1002/npr2.12009
- García, E., Limon, D., Perez-De la Cruz, V., Giordano, M., Diaz-Muñoz, M., Maldonado, P. D., . . . Santamaría, A. (2008). Lipid peroxidation, mitochondrial dysfunction and neurochemical and behavioural deficits in different neurotoxic models: Protective role of S-allylcysteine. *Free Radical Research*, 42(10), 892-902. doi:10.1080/10715760802506356
- Gaskill, B. N., Karas, A. Z., Garner, J. P., & Pritchett-Corning, K. R. (2013). Nest Building as an indicator of Health and Welfare in Laboratory Mice. *Journal of Visualized Experiments*, 82, e51012. doi:10.3791/51012
- Gibon, J., & Barker, P. A. (2017). Neurotrophins and Proneurotrophins: Focus on Synaptic Activity and Plasticity in the Brain. *Neuroscientist*, 23(6), 587-604. doi:10.1177/1073858417697037
- Girault, J., & Greengard, P. (2004). The Neurobiology of Dopamine Signaling. *Arch. Neurol.*, 66, 641-646. doi:10.1001/archneur.61.5.641
- Goetz, C. G., & Pal, G. (2014). Initial management of Parkinson's disease. *BMJ*, 349, g6258. doi:10.1136/bmj.g6258
- Gorbatyuk, O. S., Li, S., Sullivan, L. F., Chen, W., Kondrikova, G., Manfredsson, F. P., . . . Muzyczka, N. (15 de Enero de 2008). The phosphorylation state of Ser-129 in human alpha-synuclein determines neurodegeneration in a rat model of Parkinson Disease. *PNAS*, 105(2), 763-768. doi:10.1073/pnas.0711053105
- Greenberg, G. D., Huang, L. C., Spence, S. E., Schlumbohm, J. P., Metten, P., Ozburn, A. R., & Crabbe, J. C. (2016). Nest building is a novel method for indexing severity of alcohol withdrawal in mice. *Behav Brain Res*, 302, 182-190. doi:10.1016/j.bbr.2016.01.023.

- Gulinello, M., Chen, F., & Dobrenis, K. (2008). Early deficits in motor coordination and cognitive dysfunction in a mouse model of the neurodegenerative lysosomal storage disorder, Sandhoff disease. *Behav Brain Res*, *193*(2), 315-319. doi:10.1016/j.bbr.2008.06.016
- Gupta, O. P., Sing, S., Bani, S., Sharma, N., Malhotra, S., Gupta, B. D., . . . Handa, S. S. (2000). Anti-inflammatory and anti-arthritic activities of silymarin acting through inhibition of 5-lipoxygenase. *Phytomedicine*, *7*(1), 21-24. doi:10.1016/S0944-7113(00)80017-3
- Guzman-Ruiz, M. A., de la Mora, M. B., Torres, X., Meza, C., García, E., & Chavarría, A. (2019). Oral Silica Nanoparticles Lack of Neurotoxic Effects in a Parkinson's Disease Model: A Possible Nanocarrier? *IEEE Trans Nanobioscience*, *18*(4), 535-541. doi:10.1109/TNB.2019.2934074
- Haddad, F., Sawalha, M., Khawaja, Y., Najjar, A., & Karaman, R. (2018). Dopamine and Levodopa Prodrugs for the Treatment of Parkinson's Disease. *Molecules*, *23*(40), e100. doi:10.3390/molecules23010040
- Hagell, P., & Cenci, M. A. (2005). Dyskinesias and dopamine cell replacement in Parkinson's disease: a clinical perspective. *Brain Research Bulletin*, *68*(1), 4-15. doi:10.1016/j.brainresbull.2004.10.013
- Halliwell, B. (2013). The antioxidant paradox: less paradoxical now? *British Journal of Clinical Pharmacology*, *75*(3), 637-644. doi:10.1111/j.1365-2125.2012.04272.x
- Hanson, L. R., Fine, J. M., Svitak, A. L., & Faltese, K. A. (2013). Intranasal Administration of CNS Therapeutics to Awake Mice. *Journal of Visualized Experiments*, *74*, e4440. doi:10.3791/4440
- Helmich, R. C., Hallett, M., Deuschl, G., Toni, I., & Bloem, B. R. (Noviembre de 2012). Cerebral causes and consequences of parkinsonian resting tremor: a tale of two circuits? *Brain*, *135*(11), 3206-3226. doi:10.1093/brain/aww023
- Hernández-Baltazar, D., Nadella, R., Cibrian-Llenderal, T., Puga-Olguín, A., Barrientos-Bonilla, A. A., Zavala-Flores, L. M., . . . Rembao-Bojorquez, J. D. (8 de 11 de 2018). *IntechOpen- Parkinson's Disease and Beyond*. (IntechOpen, Ed.) doi:10.5772/intechopen.81215

- Hernández-Ramírez, P. (2011). La mucosa nasal como vía y fuente para la medicina regenerativa. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 27(3), 297-308. Obtenido de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-02892011000300005&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892011000300005&lng=es&nrm=iso)
- Hindle, J. V., Petrelli, A., Clare, L., & Kalbe, E. (2013). Nonpharmacological Enhancement of Cognitive Function in Parkinson's Disease: A Systematic Review. *Mov. Dis.*, 00(00), 1-16. doi:10.1002/mds.25377
- Hirsch, E., & Hunot, S. (2009). Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurology*, 8, 382-397. doi:10.1016/S1474-4422(09)70062-6
- Hu, M., Li, F., & Wang, W. (2018). Vitexin protects dopaminergic neurons in MPTP-induced Parkinson's disease through PI3K/Akt signaling pathway. *Drug Design, Development and Therapy*, 12, 565-573. doi:10.2147/DDDT.S156920
- Hui-Hui, J., Yan, F., Shen, L., & Hong-Fang, J. (2016). Silymarin versus Silibinin: Differential Antioxidant and Neuroprotective Effects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Oxidative Stress in PC12 Cells. *Nat. Prod. Commun.*, 11(5), 633-636. doi:<https://doi.org/10.1177/1934578X1601100520>
- Iacono, R. P., Henderson, J. M., & Lonser, R. R. (1995). Combined stereotactic thalamotomy and posteroventral pallidotomy for Parkinson's disease. *J ImageGuid Surg*, 1(3), 133-140. doi:10.1002/(SICI)1522-712X(1995)1:3<133::AID-IGS2>3.0.CO;2-B
- Ikezu, T., & Gendelmann, H. E. (2017). *Neuroimmune Pharmacology* (2 ed.). Cham, Switzerland: Springer International Publishing Switzerland. doi:10.1007/978-3-319-44022-4
- Illum, L. (2006). Nasal Clearance in Health and Disease. *Journal of Aerosol Medicine*, 19(1), 92-99. doi:10.1089/jam.2006.19.92
- Isobe, C., Abe, T., & Terayama, Y. (2010). Levels of reduced and oxidized coenzyme Q-10 and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the cerebrospinal fluid of patients with living Parkinson's disease demonstrate that mitochondrial oxidative DNA damage contributes to the neurodegenerative process. *Neurosci. Letters*, 469, 159-163. doi:10.1016/j.neulet.2009.11.065

- Jankovic, J. (Abril de 2008). Parkinson's disease: Clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 79(4), 368-376. doi:10.1136/jnnp.2007.131045
- Javed, S., Kohli, K., & Ali, M. (2011). Reassessing bioavailability of silymarin. *Atern Med Rev*, 16(3), 239-249. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21951025/#:~:text=Although%20clinical%20trials%20have%20shown,and%20ultimately%20poor%20oral%20bioavailability.>
- Johnson , M. D., Miocinovic, S., McIntyre, C. C., & Vitek, J. L. (2008). Mechanisms and Targets of Deep Brain Stimulation in Movement Disorders. *Neurotherapeutics*, 5(2), 294-308. doi:10.1016/j.nurt.2008.01.010
- Johnson, V. J., Osuchowski, M. F., He, Q., & Sharma, R. P. (2002). Physiological Responses to a Natural Antioxidant Flavonoid Mixture, Silymarin, in BALB/c Mice: II. Alterations in Thymic Differentiation Correlate with Changes in c-myc Gene Expression. *Planta Medica*, 68(11), 961-965. doi:10.1055/s-2002-35663
- Ju, M. S., Kim, H. G., Choi, J. G., Ryu, J. H., Hur, J., Kim, Y. J., & Oh, M. S. (2010). Cassiae semen, a seed of *Cassia obtusifolia*, has neuroprotective effects in Parkinson's disease models. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2037-2044. doi:10.1016/j.fct.2010.05.002
- Keeney, P. M., Xie, J., Capaldi, A., & Bennett Jr, J. P. (10 de Mayo de 2006). Parkinson's Disease Brain Mitochondrial Complex I Has Oxidatively Damaged Subunits and Is Functionally Impaired and Misassembled. *J. of Neurosci.*, 26(19), 5256-5264. doi:10.1523/JNEUROSCI.0984-06.2006
- Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., & Correa, R. G. (2019). Dopamine: Functions, Signalling, and Association with Neurological Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 39, 31-59. doi:10.1007/s10571-018-0632-3
- Lalonde, R., & Strazielle, C. (2003). Motor Coordination, Exploration, and Spatial Learning in a Natural Mouse Mutation (nervous) with Purkinje Cell Degeneration. *Behavior Genetics*, 33(1), 59-67. doi:<https://doi.org/10.1023/A:1021003600900>

- Li, L., Sun, H., Liu, W., Zhao, H., & Shao, M. (2017). Silymarin protects against acrylamide-induced neurotoxicity via Nrf2 signalling in PC12 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 102(1), 93-101. doi:10.1016/j.fct.2017.01.021
- Lieber, C. S., Leo, M. A., Cao, Q., Ren, C., & DeCarli, L. M. (2003). Silymarin retards the progression of alcohol-induced hepatic fibrosis in baboons. *J Clin Gastroenterol*, 96, 336-339. doi:10.1111/j.1742-7843.2005.pto\_06.x
- Lim, K., & Zhang, C. (08 de Abril de 2013). Molecular events underlying Parkinson's disease - an interwoven tapestry. *Front. Neurol.*, 4(33), 1-10. doi:10.3389/fneur.2013.00033
- Litvan, I., Bhatia, K. P., Burn, D. J., Goetz, C. G., Lang, A. E., McKeith, I., . . . Wenning, G. K. (Octubre de 2003). SIC Task Force Appraisal of Clinical Diagnostic Criteria for Parkinsonian Disorders. *Movement Disorders*, 18(5), 467-486. doi:10.1002/mds.10459
- Lochhead, J. J., & Thorne, R. G. (2012). Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 614-628. doi:10.1016/j.addr.2011.11.002
- Loguercio, C., & Festi, D. (2011). Silybin and the liver: From basic research to clinical practice. *World J Gastroenterol*, 17(18), 2288-2301. doi:10.3748/wjg.v17.i18.2288
- Lozano, M. C., Córdoba, D., & Córdoba, M. (2012). *Manual de Tecnología Farmacéutica*. Barcelona, España: Elsevier.
- Lu, P., Mamiya, T., Lu, L., Mouri, A., Zou, L. B., Nagai, T., . . . Nabeshima, T. (2009). Silibinin prevents amyloid beta peptide-induced memory impairment and oxidative stress in mice. *British Journal of Pharmacology*, 157(1), 1270-1277. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00295.x
- Luong, T. N., Carlisle, H. J., Southwell, A., & Patterson, P. H. (2011). Assessment of Motor Balance and Coordination in Mice using the Balance Beam. *Journal of Visualized Experiments*, 49, e2376. doi:10.3791/2376
- Maasz, G., Zrinyi, Z., Reglodi, D., Petrovics, D., Rivnyak, A., Kiss, T., . . . Zsolt, P. (2017). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) has a neuroprotective function in dopamine-based

- neurodegeneration in rat and snail parkinsonian models. *Disease Models & Mechanisms*, 10, 127-139. doi:10.1242/dmm.027185
- Malekinejad, H., Rahmani, F., Valivande-Azar, S., Taheri-Broujerdi, M., & Bazargani-Gilani, B. (2012). Long-Term administration of Silymarin augments proinflammatory mediators in the hippocampus of rats: Evidence for antioxidant and pro-oxidant effects. *Human and Experimental Toxicology*, 31(9), 921-930. doi:10.1177/0960327112436405
- Manna, S. K., Mukhopadhyay, A., Van, N. T., & Aggarwal, B. B. (1999). Silymarin Suppresses TNF-Induced Activation of NF- $\kappa$ B, c-Jun N-Terminal Kinase and Apoptosis. *The Journal of Immunology*, 163, 6800-6809. Obtenido de <https://www.jimmunol.org/content/163/12/6800.long>
- Manning-Bog, A., McCormack, A., Li, J., Uversky, V., Fink, A. L., & Di Monte, A. (2002). The Herbicide Paraquat Causes Up-regulation and aggregation of Alpha-Synuclein in Mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(3), 1641-1644. doi:10.1074/jbc.C100560200
- Marhol, P., Bednár, P., Kolárová, P., Vecera, R., Ulrichová, J., Tesarová, E., . . . Kren, V. (2015). Pharmacokinetics of pure silybin diastereoisomer and identification of their metabolites in rat plasma. *Journal of Functional Foods*, 14, 570-580. doi:10.1016/j.jff.2015.02.031
- McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (2008). The Alpha-synuclein burden hypothesis of Parkinson disease and its relationship to Alzheimer disease. *Experimental Neurology*, 212, 235-238. doi:10.1016/j.expneurol.2008.04.008
- Mercado, N. M., Collier, T. J., Sortwell, C. E., & Steece-Collier, K. (2017). BDNF in the Aged Brain: Translational Implications for Parkinson's Disease. *Austin Neurology and Neuroscience*, 2(2), e1021. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5929154/>
- Merlini, L., Zanarotti, A., Pelter, A., Rochefort, M. P., & Hänsel, R. (1980). Benzodioxans by Oxidative Phenol Coupling. Synthesis of Silybin. *J. Chem. Soc.*, 1(0), 775-778. doi:10.1039/p19800000775
- Mittal, D., Ali, A., Md, S., Baboota, S., Sahni, J. K., & Ali, J. (2014). Insights into direct nose to brain delivery: current status and future perspective. *Drug Delivery*, 21(2), 75-86. doi:10.3109/10717544.2013.838713

- Molz, C., Nunes, B., Chiapinotto, A. P., Finger, L., de Moraes, E., Paola, J., . . . Fachinetto, R. (2018). Silymarin recovers 6-hidroxydopamine-induced motor deficits in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 549-556. doi:10.1016/j.fct.2018.05.062
- Murphy, M. P. (2009). How Mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 417, 1-13. doi:10.1042/BJ20081386
- Musumeci, T., Pellitteri, R., Spatuzza, M., & Puglisi, G. (2014). Nose-to-Brain Delivery: Evaluation of Polymeric Nanoparticles on Olfactory Ensheathing Cells Uptake. *Journal of Pharmacy Sciences*, 103, 628-635. doi:10.1002/jps.23836
- Müzes, G., Deák, G., Láng, I., Nékám, K., Gergely, P., & Fehér, J. (1991). Effect of the bioflavonoid silymarin on the in vitro activity and expression of superoxide dismutase (SOD) enzyme. *Acta PhysiolHung*, 78, 3-9. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1763650/>
- National Center for Biotechnology Information. (15 de Febrero de 2010). *PubChem Database*. Recuperado el 11 de Noviembre de 2019, de Dopamine, CID=681: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dopamine>
- National Center for Biotechnology Information. (25 de Febrero de 2010). *PubChem Database*. Recuperado el 15 de Noviembre de 2019, de Levodopa, CID=6047: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Levodopa>
- Niki, E. (2008). Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *BioFactors*, 34(1), 171-180. doi:10.1002/biof.5520340208
- Nonnekes, J., Timmer, M. H., de Vries, N. M., Rascol, O., Helmich, R. C., & Bloem, B. R. (2016). Unmasking Levodopa Resistance in Parkinson's Disease. *Movement Disorders*, 00(00), 1-8. doi:10.1002/mds.26712
- Novakovic, Z. M., Leinung, M. C., Lee, D. W., & Grasso, P. (2009). Intranasal administration of mouse [D-Leu-4]OB3, a synthetic peptide amide with leptin-like activity, enhances total uptake and bioavailability in Swiss Webster mice when compared to intraperitoneal, subcutaneous and intramuscular delivery systems. *Regulatory peptides*, 154, 107-111. doi:10.1016/j.regpep.2009.01.002

- Orihuela, R., McPherson, C. A., & Harry, G. J. (2015). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *British Journal of Pharmacology*, 173, 649-665. doi:10.1111/bph.13139
- Parkinson Study Group. (2004). A Controlled, Randomized, Delayed-Start Study of Rasagiline in Early Parkinson Disease. *Arch. Neurol.*, 61(4), 561-566. doi:10.1001/archneur.61.4.561
- Parvathi, M. (2012). Intranasal Drug Delivery To Brain: An Overview. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 2(3), 889-895. doi:10.2174/1574885512666170921145204
- Peeters, E., & Córdoba Díaz, D. (2012). Capítulo 37: Formas de Administración Ótica y Nasal. En M. C. Lozano, D. Córdoba, & M. Córdoba, *Manual de Tecnología Farmacéutica* (págs. 401-411). Barcelona, España: Elsevier.
- Pérez-De La Cruz, V., González-Cortés, C., Galván-Arzate, S., Medina-Campos, O. N., Pérez-Severiano, F., Ali, S. F., . . . Santamaría, A. (2005). Excitotoxic brain damage involves early peroxynitrite formation in a model of Huntington's disease in rats: protective role of iron porphyrinate 5,10,15,20-tetrakis (4-sulfonatophanyl)porphyrinate iron (III). *Neuroscience*, 135, 463-474. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.06.027
- Pérez-H, J., Carrillo-S, C., García, E., Ruiz-Mar, G., Pérez-Tamayo, R., & Chavarría, A. (2014). Neuroprotective effect of silymarin in a MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Toxicology*, 319(1), 38-43. doi:10.1016/j.tox.2014.02.009
- Pfeiffer, R. (2016). Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 22, S119-S122. doi:10.1016/j.parkreldis.2015.09.004
- Polyak, S. J., Morishima, C., Lohmann, V., Pal, S., Lee, D., Liu, Y., . . . Oberlies, N. H. (2010). Identification of hepatoprotective flavonolignans from silymarin. *Proceedings of the national Academy Sciences*, 107(13), 5995-5999. doi:10.1073/pnas.0910009107
- Polyak, S. J., Morishima, C., Shuhart, M. C., Wang, C. C., Liu, Y., & Lee, D. Y. (2007). Inhibition of T-cell inflammatory cytokines, hepatocyte NF- $\kappa$ B signalling, and HCV infection by standardized Silymarin. *Gastroenterology*, 132(5), 1925-1936. doi:10.1053/j.gastro.2007.08.038

- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., Mooney, R. D., . . . White, L. E. (2018). *Neuroscience* (6 ed.). New York, USA: Oxford University Press.
- Raza, C., Anjum, R., & Ain Shakeel, N. u. (10 de Abril de 2019). Parkinson's disease: Mechanisms, traslational models and management strategies. *Life Sciences*, 226, 77-90. doi:10.1016/j.lfs.2019.03.057
- Reglodi, D., Renaud, J., Tamas, A., Tizabi, Y., Socías, S. B., Del-Bel, E., & Raisman-Vozari, R. (2017). Novel tactics for neuroprotection in Parkinson's Disease: Role of antibiotics, polyphenols and neuropeptides. *Progress in Neurobiology*, 155, 120-148. doi:10.1016/j.pneurobio.2015.10.004
- Rezaee, S., & Jahromy, M. H. (2018). Potential Effects of Pomegranate Juice in Attenuating LID in Mice Model of Parkinson Disease. *The Journal Of Pharmacognosy*, 10(4), 700-704. doi:10.5530/pj.2018.4.116
- Richter, F., Subramaniam, S. R., Magen, I., Lee, P., Hayes, J., Attar, A., . . . Bitan, G. (2017). A Molecular Tweezer Ameliorates Motor Deficits in Mice Overexpressing Alfa-Synuclein. *Neurotherapeutics*, 14, 1107-1119. doi:10.1007/s13311-017-0544-9
- Rodríguez-Violante, M., Velásquez-Pérez, L., & Cervantes-Arriaga, A. (18 de Junio de 2019). Incidence rates of Parkinson's disease in Mexico: Analysis of 2014-2017 statistics. *Rev. Mex. Neurosci.*, 20(3), 136-140. doi:10.24875/RMN.M19000043
- Saller, R., Brignolli, R., Melzer, J., & Meier, R. (2008). An updated systematic review with meta-analysis for the clinical evidence of silymarin. *Forsch Komplementmed*, 15(1), 9-20. doi:10.1159/000113648
- Schapira, A. H., Chaudhuri, K. R., & Jenner, P. (Julio de 2017). Non-motor features of Parkinson disease. *Nat. Revs. Neurosci.* , 18, 435-450. doi:10.1038/nrn.2017.62
- Schrag, A., Ben-Sholmo, Y., & Quinn, N. P. (1 de Julio de 2000). Cross sectional prevalence survey of idiopathic Parkinson's disease and parkinsonism in London. *The British Medical Journal*, 321(7252), 21-22. doi:10.1136/bmj.321.7252.21
- Secretaría de Salud. (2010). *Diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Parkinson inicial y avanzada en el tercer nivel de atención*. (CENETEC, Ed.) Ciudad de México, México: Centro Nacionalde Excelencia Tecnológica en Salud. Obtenido de

- [http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/305\\_SSA\\_10\\_PARKINSON\\_3ER\\_NVL/EyR\\_Parkinson.pdf](http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/305_SSA_10_PARKINSON_3ER_NVL/EyR_Parkinson.pdf)
- Sedelis, M., Hofele, K., Auburger, G. W., Morgan, S., Huston, J. P., & Schwarting, K. W. (2000). MPTP Susceptibility in the Mouse: Behavioral, Neurochemical, and Histological Analysis of Gender and Strain Differences. *Behavior Genetics*, 30(3), 171-182. doi:10.1023/a:1001958023096
- Segura-Aguilar, J., & Huenchuguala, S. (2018). Aminochrome induces irreversible mitochondrial dysfunction by inducing autophagy dysfunction in Parkinson's disease. *Front. Neurosci.*, 12, e106. doi:10.3389/fnins.2018.00106
- Singhal, N. K., Srivastava, G., Patel, D. K., Jain, S. K., & Singh, M. P. (2011). Melatonin or silymarin reduces maneb- and paraquat-induced Parkinson's disease phenotype in the mouse. *Journal of Pineal Research*, 50, 97-109. doi:10.1111/j.1600-079x.2010.00819.x
- Sinko, P. J. (2011). Chapter 23: Drug Delivery And Targeting. En P. J. Sinko, & Y. Singh, *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* (6 ed., págs. 602-620). Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins.
- Smeyene, R. J., & Jackson-Lewis, V. (2005). The MPTP model of Parkinson's disease. *Molecular Brain Research*, 134, 57-66. doi:10.1016/j.molbrainres.2004.09.017
- Sornsuvit, C., Hongwiset, D., Yotsawimonwat, S., Toonkum, M., Thongsawat, S., & Taesotikul, W. (2018). The Bioavailability and Pharmacokinetics of Silymarin SMEDDS Formulation Study in Healthy Thai Volunteers. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, e1507834. doi:10.1155/2018/1507834
- Southwell, A. L., Ko, J., & Patterson, P. H. (2009). Intrabody Gene Therapy Ameliorates Motor, Cognitive, and Neuropathological symptoms in Multiple Mouse Models of Huntington's Disease. *The Journal of Neuroscience*, 29(43), 13589-13602. doi:10.1523/JNEUROSCI.4286-09.2009
- Spagnuolo, C., Napolitano, M., Tedesco, I., Moccia, S., & Russo, G. (2016). Neuroprotective Role of Natural Polyphenols. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(17), 1943-1950. doi:10.2174/1568026616666160204122449

- Stanley , J. L., Lincoln, R. J., Brown, T. A., McDonald, L. M., Dawson, G. R., & Reynolds, D. S. (2005). The mousebeam walking assay offers improved sensitivity over the mouse rotarod in determining motor coordination deficits induced by benzodiazepines. *Journal of Psychopharmacology*, *19*(3), 221-227. doi:10.1177/0269881105051524
- Subramaniam, S. R., & Federoff, H. J. (Junio de 2017). Targeting Microglial Activation States as a Therapeutic Avenue in Parkinson's Disease. *Front. Aging Neurosci.*, *9*, 176. doi:10.3389/fnagi.2017.00176
- Surai, P. F. (2015). Silymarin as a Natural Antioxidant: An Overview of the Current Evidence and Perspectives. *Antioxidants*, *4*, 204-247. doi:10.3390/antiox4010204
- Tansey, M. G., McCoy, M. K., & Frank-Cannon, T. C. (2007). Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: Potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Experimental Neurology*, *208*(1), 1-25. doi:10.1016/j.expneurol.2007.07.004
- Tatton, N. A., & Kish, S. J. (1997). In Situ Detection of Apoptotic Nuclei in the Substantia Nigra Compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated Mice Using Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Labelling and Acridine Orange Staining. *Neuroscience*, *77*(4), 1037-1048. doi:10.1016/s0306-4522(96)00545-3
- Taylor, P. (2004). 32: Administración de Fármacos por Vía Intranasal. En M. E. Aulton, *Farmacología, La Ciencia del Diseño de las Formas Farmacéuticas* (F. Cano Caro, Trad., Segunda ed., págs. 489-498). Madrid, España: Elsevier.
- Teegarden, S. (2012). Behavioral Phenotyping in Rats and Mice. *MATER METHODS*, *2*(1), e122. doi:10.13070/mm.en.2.122
- Thanvi, B. R., & Lo, T. C. (2004). Long term motor complications of levodopa: clinical features, mechanisms, and management strategies. *Postgrad Med J*, *80*(946), 452-458. doi:10.1136/pgmj.2003.013912
- Thiruchelvam, M., Richfield, E., Baggs, R., Tank, A., & Cory-Slechta, D. A. (2000). The Nigrostriatal Dopaminergic System as a Preferential Target of Repeated Exposures to Combined Paraquat and

- Maneb: Implications for Parkinson's Disease. *The Journal of Neuroscience*, 20(24), 9207-9214. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-24-09207.2000
- Thullier, F., Lalonde, R., Mahler, P., Joyal, C. C., & Lestienne, F. (1996). Dorsal Striatal Lesions in Rats. 1: Effects on Exploration and Motor Coordination. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 104(3), 300-306. doi:10.1076/apab.104.3.300.12902
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2017). *Principles of Anatomy & Physiology* (15 ed.). Danvers, USA: John Wiley & Sons. Recuperado el Septiembre de 2019
- Trouillas, P., Marsal, P., Svobodová, A., Vostálová, J., Gazák, R., Hrbác, J., . . . Walterová, D. (2008). Mechanisms of the Antioxidant Action of Silybin and 2,3-Dehydrosilybin Flavonolignans: A Joint Experimental and Theoretical Study. *J Phys Chem A*, 112, 1054-1063. doi:10.1021/jp075814h
- U.S. National Institute of Health. (Octubre de 31 de 2019). *Silymarin*. (U. N. Medicine, Editor) Obtenido de Drug Information Portal: [druginfo.nlm.nih.gov/drugportal/name/Silymarin](http://druginfo.nlm.nih.gov/drugportal/name/Silymarin)
- Ueda, H., & Fujita, R. (2004). Cell Death Mode Switch from Necrosis to Apoptosis in Brain. *Biol Pharm Bull*, 27(7), 950-955. doi:10.1248/bpd.27.950
- Ullah, H., & Khan, H. (2018). Anti-Parkinson Potential of Silymarin: Mechanistic Insight and Therapeutic Standing. *Front. Pharm.*, 9(1), 422. doi:10.3389/fphar.2018.00422
- Valenzuela, A., Aspillaga, M., Vial, S., & Guerra, R. (1989). Selectivity of silymarin on the increase of the glutathione content in different tissues of the rat. *Planta med*, 5, 420-422. doi:10.1055/s-2006-962056
- van der Kolk, N. M., & King, L. A. (2013). Effects of Exercise on Mobility in People with Parkinson's Disease. *Movement Disorders*, 28(11), 1587-1597. doi:10.1002/mds.25658
- van Woesel, M., Wauthoz, N., Rosiere, R., Amighi, K., Mathieu, V., Lefranc, F., . . . de Vleeschouwer, S. (2013). Formulations for Intranasal Delivery of Pharmaceutical Agents to Combat Brain Disease: A New Opportunity to tackle GBM? *Cancers*(5), 1020-1048. doi:10.3390/cancers5031020

- Veiga Ochoa, M. D., Gil Alegre, M. E., & Torrado Durán, J. (2008). Capítulo I: Preformulación. En J. L. Vila Jato, *Tecnología Farmacéutica Volumen I: Aspectos Fundamentales de los Sistemas Farmacéuticos y Operaciones Básicas*. (1 ed., págs. 27-73). Madrid, España: Síntesis.
- Vila Jato, J. L. (2008). *Tecnología Farmacéutica Vol I: Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y las operaciones básicas* (Vol. I). Madrid: Síntesis S.A.
- Volpicelli-Daley, L. A., Luk, K. C., & Lee, V. M.-Y. (1 de Septiembre de 2016). Addition of exogenous alpha-synuclein preformed fibrils to primary neuronal cultures to seed recruitment of endogenous alpha-synuclein to Lewy body and Lewy neurite-like aggregates. *Nat. Protocols*, 9(9), 2135-2147. doi:10.1038/nprot.2014.143
- von Campenhausen, S., Bornschein, B., Wick, R., Bötzel, K., Sampaio, C., Poewe, W., . . . Dodel, R. (Abril de 2005). Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Europ. Neuropsychopharm.*, 15, 473-490. doi:10.1016/j.euroneuro.2005.04.007
- Wakabayashi, K., Takahashi, H., Takeda, S., Ohama, E., & Ikuta, F. (1989). Lewy Bodies in the Enteric Nervous System in Parkinson's Disease. *Arch. Histol. Cytol.* , 52, 191-194. doi:10.1679/aohc.52.Suppl\_191
- Wang, C., Wang, Z., Zhang, X., Zhang, X., Dong, L., Xing, Y., . . . Zhu, C. (2012). Protection by silibinin against experimental ischemic stroke: Up-regulated pAkt, pmTOR, HIF-1a and Bcl-2, down-regulated Bax, Nf-kB expression. *Neuroscience Letters*, 529, 45-50. doi:10.1016/j.neulet.2012.08.078
- Wellington, K., & Jarvis, T. C. (2001). Silymarin: a reviews of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *BioDrugs*, 15(7), 465-489. doi:10.2165/00063030-200115070-00005
- Willis, A. W., Evanoff, B. A., Lian, M., & Criswell, S. R. (15 de Enero de 2010). Geographic and Thnic Variation in Parkinson Disease: A Population-Based Study of US Medicare Beneficiaries. *Neuroepidemiology*, 34, 143-151. doi:10.1159/000275491
- Wimalasena, K. (2017). Current Status, Gaps, and Weaknesses of the Mechanisms of Selective Dopaminergic Toxicity of MPTP/MPP+. En J. C. Fishbein, *Advances in Molecular Toxicology* (Vol. 11, págs. 82-110). Londres: Elsevier. Obtenido de

<https://books.google.com.mx/books?id=xuxGDgAAQBAJ&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>

- Witt, K., Kalbe, E., Erasmi, R., & Ebersbach, G. (1 de Marzo de 2017). Nichtmedikamentöse Therapieverfahren beim Morbus Parkinson. *Nervenarzt*, *88*, 383-390. doi:10.1007/s00115-017-0298-y
- Wu, J. W., Lin, L. C., Hung, S. C., Chi, C. W., & Tsai, T. H. (2007). Analysis of silibinin in rat plasma and bile for hepatobiliary excretion and oral bioavailability application. *J Pharm Biomed Anal*, *45*(4), 635–641. doi:10.1016/j.jpba.2007.06.026
- Yao, X., Liu, S., Ding, W., Yue, P., Jiang, Q., Zhao, M., . . . Zhang, H. (2017). TLR4 signal ablation attenuated neurological deficits by regulating microglial M1/M2 phenotype after traumatic brain injury in mice. *Journal of Neuroimmunology*, *310*(1), 38-45. doi:10.1016/j.jneuroim.2017.06.006
- Zeng, X., Geng, W., & Jia, J. (2018). Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. *ASN Neuro*, *10*, 1-15. doi:10.1177/1759091418777438
- Zhang, Q., Heng, Y., Mou, Z., Huang, J., Yuan, Y., & Chen, N. (2017). Reassessment of subacute MPTP-treated mice as animal model of Parkinson's disease. *Acta Pharmacologica Sinica*, *38*, 1317-1328. doi:10.1038/aps.2017.49
- Zhu, Y., Sun, M., Jia, X., Zhang, P., Xu, Y., Zhou, Z., . . . Shen, Y. (2018). Aucubin alleviates glial cell activation and preserves dopaminergic neurons in 1-methyl-4-phenyl-1.2.3.6-tetrahydropyridine-induced parkinsonian mice. *NeuroReport*, *29*, 1075-1083. doi:10.1097/WNR.0000000000001075

## 12. ANEXOS

Anexo I: Copia del oficio de aprobación del proyecto por las comisiones de investigación y de ética (CICUAL)

Anexo II: Cromatogramas de HPLC para la identificación de los componentes de la silimarina. Tomado del material suplementario de Polyak et al, 2010



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO



COMISIONES DE INVESTIGACIÓN Y DE ÉTICA

OFICIO NO. FMED/CI/RGG/053/2019

ASUNTO: Dictamen Proyecto FM/DI/127/2018

**Dra. Anahí Chavarría Krauser**

Profesor Titular "A" T.C.

Unidad de Investigación en Medicina Experimental

Presente.

Estimada doctora Chavarría Krauser:

Me complace informarle que su proyecto **FM/DI/127/2018** de título **“Evaluación comparativa del efecto neuroprotector de la silibina en diferentes dosis por la vía de administración intranasal respecto a la vía oral en un modelo murino de enfermedad de Parkinson inducido con MPTP”** ha sido revisado y **APROBADO** por las Comisiones de Investigación y de Ética en su sesión ordinaria de fecha **07 de mayo de 2019**, con una vigencia de 3 años a partir de la fecha de la sesión. Registro CICUAL 001-CIC-2019, aprobado el 25 de abril de 2019.

Deberá ejecutar el proyecto de acuerdo a lo especificado en el protocolo, tanto en los aspectos metodológicos como en los aspectos éticos y notificar cualquier modificación o enmienda al mismo. Por otro lado para conocer el seguimiento de esta investigación, es necesario que entregue un informe anual en la División de Investigación de esta Facultad, tomando en cuenta esta fecha de elaboración del dictamen. Asimismo le solicitamos nos envíe una copia del o los artículos y/o copia de la carátula y resumen de las tesis que pudieran generarse relacionadas con el proyecto.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 07 de mayo de 2019.

LA SECRETARIA TÉCNICA

  
DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN

\*RGG/ETF.



Comité de Investigación de la Facultad de Medicina-UNAM, con fecha 01 de Junio de 2015, se expide Registro COFEPRIS  
Número: 15 CI 09 003 021

## Supporting Information

Polyak et al. 10.1073/pnas.0914009107

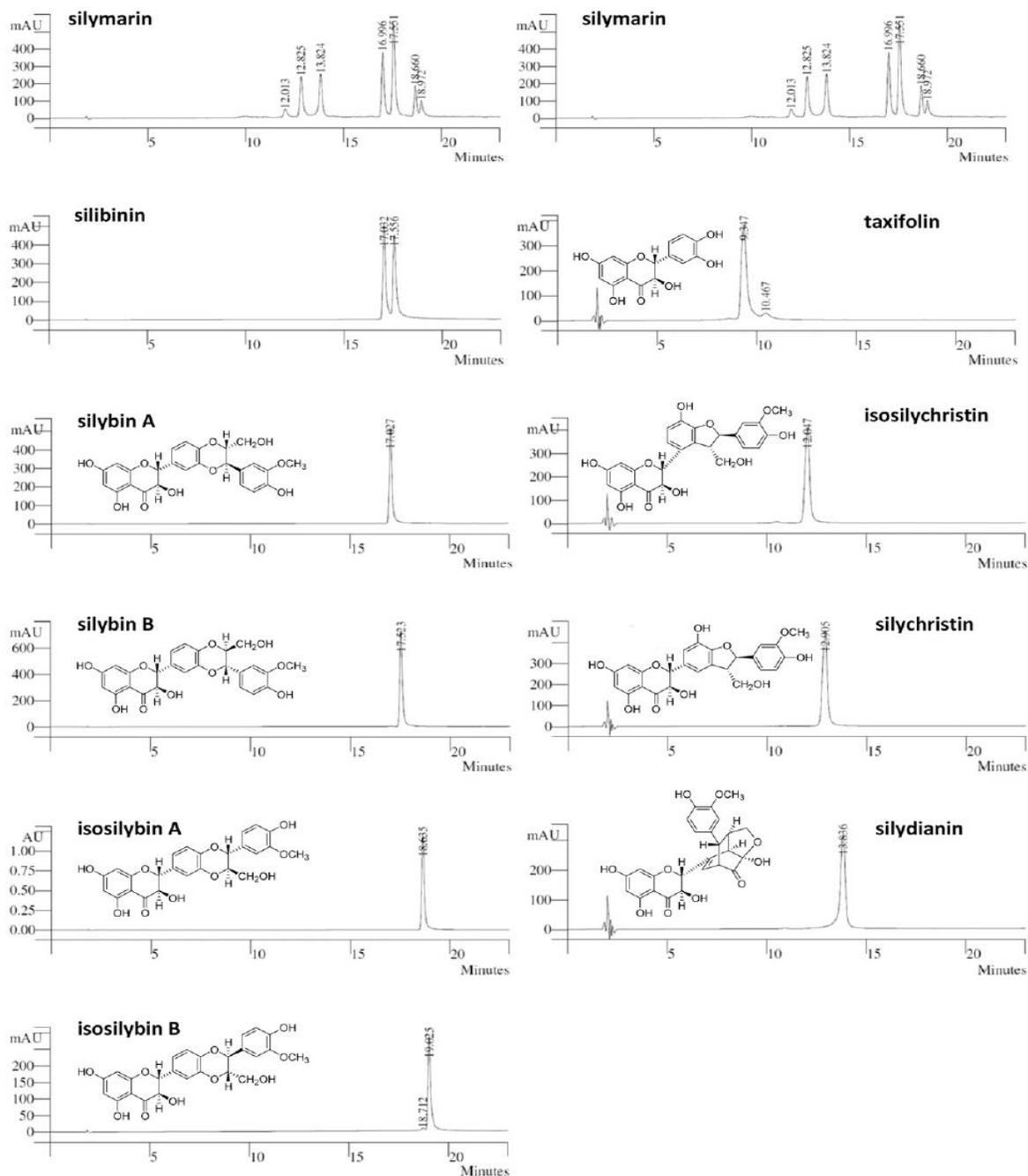


Fig. S1. HPLC chromatograms of milk thistle extract (silymarin), the 1:1 mixture of silybin A:silybin B (silibinin), the flavonoid (taxifolin), and the seven flavonolignan diastereoisomers (silybin A, silybin B, isosilybin A, isosilybin B, silychristin, isosilychristin, and silydianin). The structures for all of the pure compounds are also shown.