



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EFFECTO DE LOS ESTRÓGENOS Y LA MELATONINA SOBRE LOS
NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN NÚCLEOS CON
INERVACIÓN DE LA SUSTANCIA NEGRA EN UN MODELO DE
ENFERMEDAD DE PARKINSON**

TESIS DE LICENCIATURA

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

PRESENTA: JOSÉ MIGUEL OLMOS ROMERO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. VERÓNICA ANAYA MARTÍNEZ

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

**DRA. MARÍA ROSA ÁVILA ACOSTA
DRA. MARIA EUGENIA GARÍN AGUILAR
DR. JOSÉ LUIS ORDOÑEZ LIBRADO
MTRO. ENRIQUE MONTIEL FLORES**



TLALNEPANTLA DE BAZ, ESTADO DE MÉXICO, 2023



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.

A familia y a mis maestros

*** ÍNDICE**

Resumen.....	4
Introducción: Enfermedad de Parkinson.....	5
Ganglios Basales.....	6
Etiología.....	9
Estrés Oxidativo.....	9
Modelos de EP.....	12
Tratamiento con L-Dopa.....	14
Melatonina.....	16
Estrógenos.....	18
Justificación.....	22
Objetivo.....	23
Material y Métodos.....	23
Resultados.....	25
Discusión.....	38
Conclusiones.....	45
Literatura citada.....	46

EFFECTO DE LOS ESTRÓGENOS Y LA MELATONINA SOBRE LOS NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN NÚCLEOS CON INERVACIÓN DE LA SUSTANCIA NEGRA EN UN MODELO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON

Resumen

La Enfermedad de Parkinson (EP) es uno de los desórdenes neurodegenerativos más comunes en la actualidad, se caracteriza por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (SN), lo que ocasiona trastornos del movimiento que resultan altamente incapacitantes para el paciente. En la actualidad el tratamiento más empleado es la administración de L-Dopa (precursor de dopamina), sin embargo, su uso a largo plazo provoca síntomas que resultan igual de incapacitantes que la misma enfermedad. Estudios recientes han demostrado el efecto neuroprotector de la melatonina en las neuronas dopaminérgicas, efecto que incluso puede verse potenciado al combinarse con L-Dopa. Por otra parte, debido a que la prevalencia de la EP es más alta en hombres que en mujeres y a que varios estudios que muestran diferencias entre sexos en cuanto a la resistencia de las neuronas dopaminérgicas a ciertas toxinas, se ha sugerido que los estrógenos podrían tener un efecto neuroprotector y/o antioxidante. Por lo tanto, en este estudio se exploró el efecto antioxidante de los estrógenos midiendo la cantidad de peroxidación lipídica de diferentes núcleos de cerebros de ratas wistar lesionadas con 6-OHDA usadas como modelo de EP y medicadas con L-Dopa y/o Melatonina. Los resultados revelan que además de la SN y el NE, el GP resultó un núcleo muy sensible a la lesión con 6OHDA en el haz medial. Además, se observó que el tratamiento con L-Dopa incrementó los niveles de peroxidación en casi todos los núcleos, mientras que los tratamientos con Melatonina y L-Dopa+Melatonina disminuyeron significativamente los niveles de peroxidación causados por la inyección de 6OHDA. Por otra parte, en nuestros resultados solamente la corteza y el Núcleo Estriado mostraron niveles de peroxidación lipídica más bajos en las ratas que no fueron ovariectomizadas y que, por lo tanto, presentaban niveles más altos de estrógenos, por lo cual se sugiere que los estrógenos tuvieron un efecto antioxidante; efecto que se vio potenciado por los tratamientos de Melatonina y L-Dopa+Melatonina. Los estrógenos tienen un efecto antioxidante significativo en Corteza y Núcleo Estriado, y este efecto se puede ver potenciado con los tratamientos de Melatonina en algunas áreas del cerebro

INTRODUCCIÓN

Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP), es uno de los desórdenes neurodegenerativos más comunes en la actualidad (solo por debajo de la enfermedad de Alzheimer, se estima que afecta entre 0.3 y 2% de la población mayor a 60 años, (Secretaría de Salud 2010), en el caso de nuestro país afecta a 50 de cada 100,000 habitantes (Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, 2008). Se estima que para el año 2030 se considerará un problema de salud pública, ya que la cifra de pacientes se habrá duplicado (Secretaría de Salud 2010), estos datos nos sitúan en lo importante que es continuar las líneas de investigación enfocadas a mitigar esta enfermedad.

La EP, descrita por el médico inglés James Parkinson en 1817 (Gómez Chavarrín et al., 2012), se caracteriza principalmente por 4 síntomas motores: temblor en reposo, bradicinesia (lentitud de movimiento), rigidez (en extremidades y músculos faciales principalmente) y una alteración característica en la marcha y la postura (Gómez-Chavarrín et al., 2012). Además, se presentan síntomas secundarios que incluyen fatiga, homonimia, disartria y dificultad para la deglución, así como algunos síntomas no motores como alteraciones gastrointestinales y de sueño, pérdida de peso, ansiedad y depresión (Secretaría de Salud, 2010)

Comúnmente la enfermedad inicia entre los 50 y 70 años y culmina con la muerte entre 10 y 20 años después, usualmente a casusa de complicaciones secundarias; principalmente infecciones respiratorias (Purves, 2004).

La característica patológica principal de esta enfermedad es la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* (SNc), las cuales normalmente liberan dopamina en diversos núcleos, principalmente en el núcleo estriado, por lo que su pérdida afecta el correcto funcionamiento de una serie de núcleos relacionados con aspectos motores conocidos como los ganglios basales, lo cual provoca los trastornos del movimiento ya mencionados (Gómez-Chavarrín et al., 2012).

Los Ganglios Basales

Los ganglios basales son un grupo de núcleos subcorticales relacionadas fundamentalmente con la planeación, selección y control motor. Este grupo de núcleos incluyen: el núcleo estriado (NE); dividido en los núcleos caudado (NC) y putamen (NP) en el caso de los primates, globo pálido externo e interno (GPe/GPi – en roedores el núcleo equivalente al GPi es el núcleo entopeduncular), núcleo subtalámico (NST), *substantia nigra pars reticulata* (SNr) y SNc (Figura 1).

La función general de estos núcleos es recibir e integrar información proveniente de corteza y enviarla al tálamo, el cual estimula o inhibe la actividad de las áreas de la corteza cerebral responsables de la actividad motora.

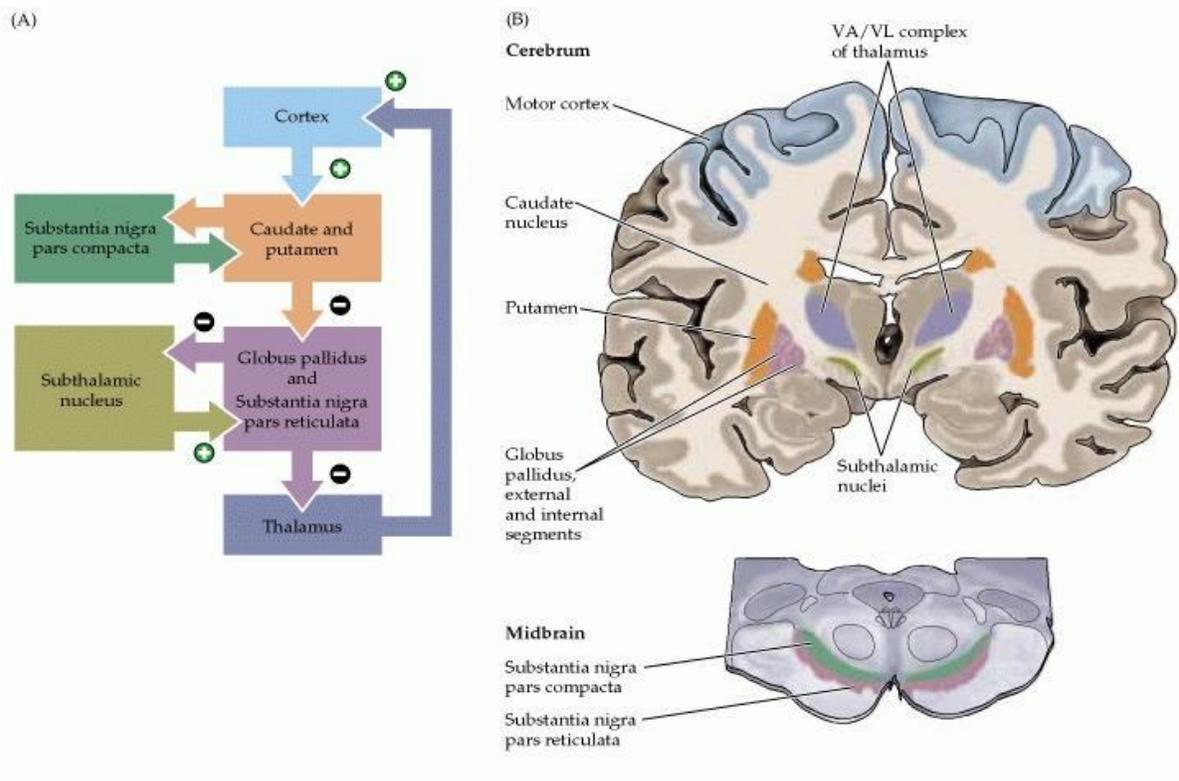


Figura 1. Neuroanatomía y conexiones de los ganglios basales. En (A), se muestran las principales proyecciones entre los núcleos; los símbolos + y - indican si las sinapsis son excitatorias o inhibitorias. En (B) se muestra la localización de los núcleos que conforman los ganglios basales, en un corte coronal de cerebro (Tomado de Purves, 2004).

El NE es el principal integrador de información cortico-talámica de los ganglios basales, y su actividad es modulada mediante la innervación dopaminérgica que recibe de las neuronas de la SNc, la cual, por tanto, es crítica para su funcionamiento. El principal destino de esta innervación dopaminérgica, son las neuronas espinosas medianas (NEM), las cuales constituyen el 90% de la población neuronal del NE y son de naturaleza GABAérgica, por lo que tienen un efecto inhibitorio en sus sitios de proyección.

La innervación dopaminérgica que llega a las NEM regula el circuito motor mediante la activación de dos vías; la directa y la indirecta. La activación de una u otra vía se lleva a cabo mediante la activación de distintas poblaciones de NEM, que se diferencian por sus sitios de proyección y por el tipo de receptores dopaminérgicos que presentan: Las NEM de la vía directa expresan predominantemente los receptores dopaminérgicos de la familia D1, mientras que las NEM que activan la vía indirecta expresan mayormente receptores de la familia D2:

- *Vía Directa*

Las NEM de la vía directa proyectan sus terminales directamente hacia el GPi y la SNr principalmente; dado que estos núcleos inhiben la acción del tálamo sobre la corteza motora, su inhibición por parte de las NEM resulta en una activación del tálamo, y por consiguiente también de la corteza motora, permitiendo que se lleve a cabo el movimiento (Figura 2).

- *Vía Indirecta*

Las NEM de la vía indirecta proyectan hacia el GPe; este núcleo tiene una acción inhibitoria sobre el NST, el GPi y la SNr, que a su vez inhiben al tálamo y a la corteza motora. Por lo tanto, la inhibición del GPe provoca la activación de los demás núcleos, inhibiendo la acción del tálamo sobre la corteza e impidiendo que se lleve a cabo el movimiento. La vía indirecta, por tanto, funciona como un “freno”, y de esta manera ayuda a modular la acción de la vía directa (Figura 2).

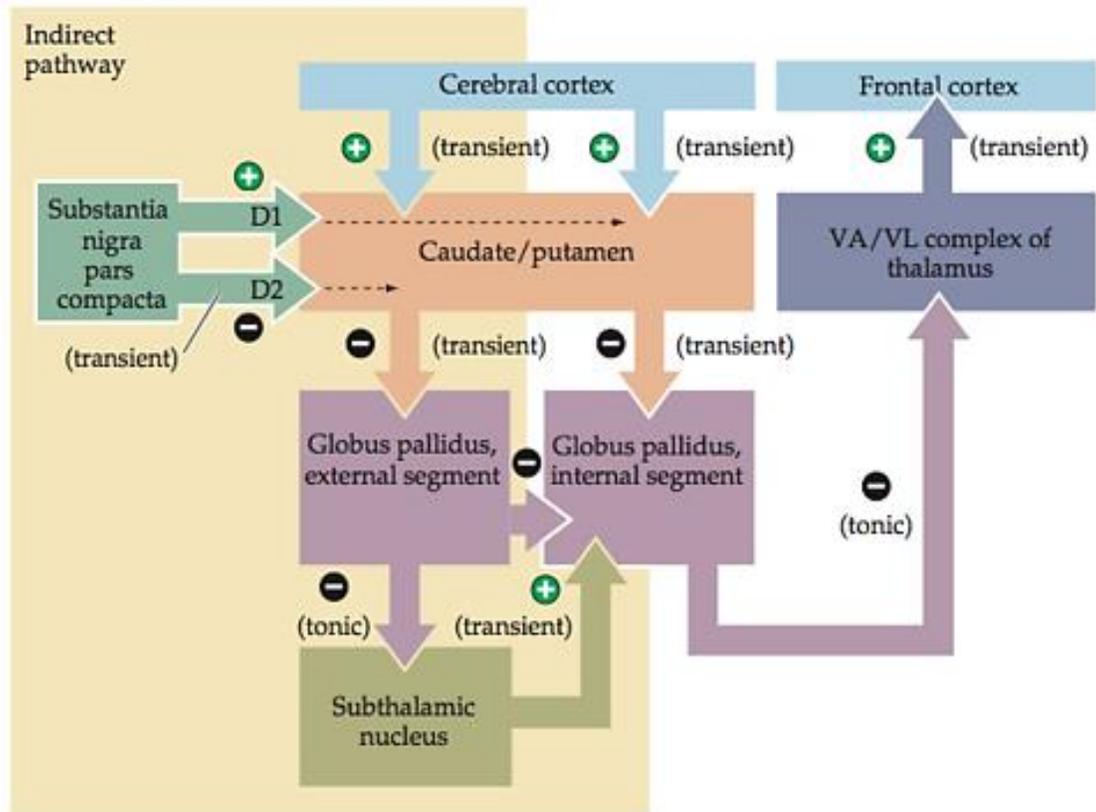


Figura 2. Esquema de las vías directa e indirecta de los ganglios basales. Se muestran las principales proyecciones de cada núcleo; los signos + y - indican sinapsis excitatorias o inhibitorias (Tomado de Purves, 2004).

Ambas vías modulan la acción de las motoneuronas superiores, sin embargo, como ya se mencionó antes, la EP se caracteriza por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Figura 3), las cuales son la principal fuente de suministro de dopamina al NE. La pérdida de este suministro dopaminérgico en el NE provoca que la aferencia inhibitoria de los ganglios basales sea anormalmente alta (las aferencias excitadoras de la vía directa se ven disminuidas), lo que se traduce en trastornos *hipocinéticos*, disminución de las expresiones faciales, dificultades para iniciar o terminar un movimiento, entre otros síntomas motores de la EP.

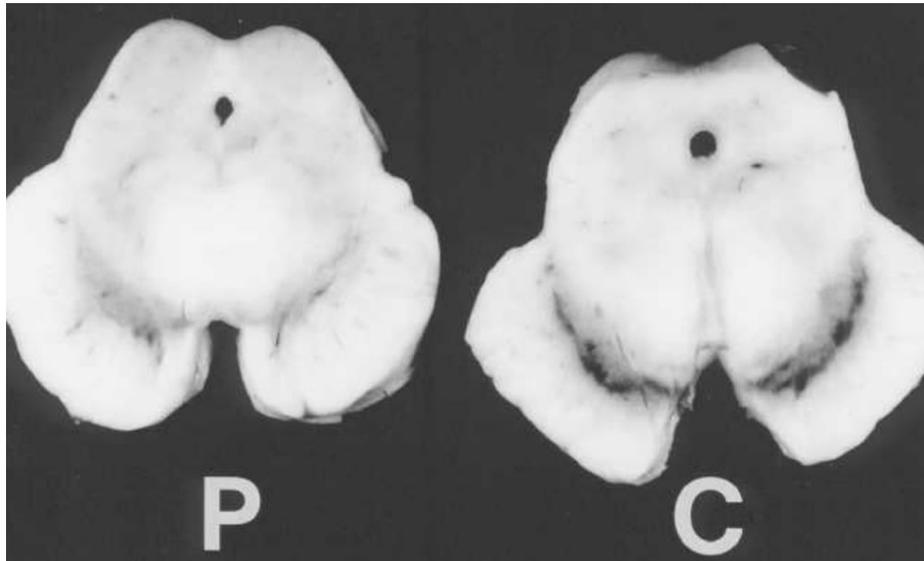


Figura 3. Pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNc en pacientes con enfermedad de Parkinson. Se muestran cortes a nivel de mesencéfalo de un paciente que padeció la EP (P) y un sujeto control ©; se evidencia la ausencia de neuronas dopaminérgicas (zona pigmentada) en (P) (Tomado de Ian et al., 2001).

Etiología

En la actualidad no se tiene una explicación satisfactoria sobre la causa de la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, sin embargo, se conocen diversas alteraciones que se ha propuesto que pudieran contribuir a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas; una de las principales es el estrés oxidativo.

Estrés oxidativo

Un radical libre (RL) es un átomo o molécula que contiene un electrón desapareado en su orbital más exterior, lo que provoca una alta inestabilidad química confiriéndole reactividad oxidante para otras especies químicas que se encuentren cercanas, las cuales

reaccionan rápidamente. Por esta razón se les conoce como “especies reactivas”, y a nivel celular las más importantes son derivadas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN) (Davies, 1998).

Los RL y especies reactivas desempeñan un papel importante en la fisiología de la célula, son generadas de manera normal como consecuencia del metabolismo para generar energía y normalmente son eliminadas por diversos sistemas intracelulares conocidos como antioxidantes. Los antioxidantes son sustancias que disminuyen o inhiben el daño oxidativo; pueden actuar de diversas formas, pero principalmente es transformando los peróxidos en productos menos reactivos o uniéndose a los RL para neutralizar su reactividad. Los antioxidantes pueden catalogarse en *enzimáticos* como las superóxido-dismutasas, las catalasas y las peroxidasas, y *no enzimáticos*, como las vitaminas A, E y C, el glutatión o algunos aminoácidos (Davies, 1998; Dorado et al., 2003).

Por tanto, los sistemas antioxidantes funcionan creando un balance en las reacciones de óxido-reducción dentro de la célula, sin embargo, bajo condiciones patológicas la eliminación de RL resulta deficiente, por lo que se rompe el equilibrio y se produce una acumulación excesiva de RL que ocasionan una condición dañina para la célula conocida como *estrés oxidativo* (Davies, 1998; Gómez Chavarrín et al., 2007).

Durante el estrés oxidativo, los RL pueden reaccionar con cualquier biomolécula cercana ocasionando diversos tipos de alteraciones. La oxidación de ácidos nucleicos y proteínas a causa de los RL puede ocasionar una producción de proteínas defectuosas, con alteraciones en su función, plegamiento y reciclaje, lo cual afecta el funcionamiento normal de las células y puede ocasionar toxicidad y activar vías de apoptosis (Barnham et al., 2004).

En el caso de algunos tipos de lípidos la susceptibilidad a ser atacados por los RL puede ser aún mayor debido a los dobles enlaces que se presentan, por ejemplo, en las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos insaturados. En este caso, los RL producen un aumento en la *peroxidación de lípidos*, lo cual resulta perjudicial para la célula, ya que afecta la rigidez de la membrana celular alterando el potencial de membrana y permitiendo la entrada de diversas entidades químicas dentro de las células, entre ellas los iones calcio (Ca^{2+}), los cuales en el caso de terminales glutamatérgicas además pueden inducir la liberación del neurotransmisor que “sobre activar” a los receptores de glutamato

produciendo excitotoxicidad y causando posteriormente muerte celular (Ferrer et al., 1999; Barnham et al., 2004).

La mitocondria es una de las principales fuentes de producción de RL dentro de la célula debido a las reacciones de óxido reducción que se llevan a cabo en la cadena respiratoria, por lo que alteraciones mínimas pueden incrementar los niveles de producción de RL y ERO. A su vez, se ha reportado que el aumento de los niveles de estrés oxidativo a causa de disfunción mitocondrial también puede afectar el sistema *Ubiquitina-Proteosoma*, el cual se encarga de la degradación y reciclaje de proteínas “de vida corta”, con defectos en el plegamiento o dañadas. Por ende, un daño en este sistema resulta en acumulación de proteínas mal plegadas que interfieren con la homeostasis celular y pueden activar cascadas de señalización para apoptosis (Moon Hyo Eun y Sun Ha Paek, 2015).

Las neuronas dopaminérgicas especialmente, se exponen a estrés oxidativo debido al propio metabolismo de la dopamina, ya que puede autooxidarse produciendo algunas moléculas que resultan tóxicas para las células como quinonas, semiquinonas y radicales superóxido, y por otro lado, también puede metabolizarse por medio de la enzima MAO-B (monoamino oxidasa-B) formando DOPAC (ácido 3,4 dihidroxifenilacético) y peróxido de hidrógeno. Además, cabe mencionar que las concentraciones de hierro (Fe^{2+}) son significativamente más altas en la SNc en comparación con otras regiones del cerebro, (Sofic et al., 1988) por lo que el peróxido de hidrógeno puede reaccionar fácilmente con el Fe^{2+} mediante la *reacción de Fenton* produciendo radicales hidroxilo, los cuales a su vez, pueden reaccionar con óxido nítrico para formar ERN altamente citotóxicas (Pedrosa y Soares-Da-Silva, 2002; Cardoso et al., 2005; Hattori et al., 2009; Gómez Chavarrín et al., 2012).

Alrededor del 10% de los casos de EP se han relacionado con algún factor genético, por lo que se conoce como “forma familiar” de la enfermedad. Algunos de estos genes como SNCA (PARK1 Y PARK2), Parkin (PARK3), UCHL1, PINK1 y DJ-1, han sido relacionados con diversas formas de disfunción mitocondrial y producción de ERO (Moon Hyo Eun y Sun Ha Paek, 2015).

En estudios *post mortem* de pacientes con EP se han detectado alteraciones en las mitocondrias de las neuronas dopaminérgicas de la SNc. Entre estas alteraciones se han detectado disminución de la actividad de los complejos I y IV de la cadena respiratoria, lo que puede provocar disminución en la síntesis de ATP, activación de señales de apoptosis

y un aumento en la producción de RL y ERO (Schapira et al., 1998; Keeney et al., 2006). Asimismo, se han reportado altos niveles de peroxidación lipídica y anormalidades en la actividad de diversas enzimas antioxidantes en la SNc (Dexter, 1989; Dexter et al., 1989; Saggiu et al., 1989; Sofic et al., 1992; Sanyal et al., 2009; Hattori et al., 2009; Gómez Chavarrín et al., 2012), lo que sugiere al estrés oxidativo como uno de los principales contribuyentes a la degeneración las neuronas dopaminérgicas de la SNc en esta enfermedad.

Modelos de la Enfermedad de Parkinson

A la fecha no existe ningún modelo experimental que reproduzca por completo los síntomas y las características patológicas de la EP, lo que dificulta el ensayo de terapias para la enfermedad.

En los últimos años se ha intentado inducir la disminución de dopamina en la SNc y el cuadro clínico que presentan los pacientes de EP mediante la producción de animales genéticamente modificados que se basan en la sobreexpresión o inhibición de proteínas como Parkina, α -Sinucleína o alguna otra relacionada con la forma familiar de la EP, sin embargo, no se ha conseguido tener un modelo que represente fielmente tales características.

Por ello, los modelos experimentales más utilizados son los llevados a cabo en animales a los que se les administra una neurotoxina con especificidad de acción sobre las neuronas dopaminérgicas; sin embargo, aunque estos modelos reproducen la carencia de dopamina en la SNc y en sus núcleos blanco, los efectos conductuales no siempre son similares a los que presentan los pacientes. A continuación, se describen brevemente los principales modelos de EP:

- 6-OHDA

Este modelo de ratas hemiparkinsonianas ha sido uno de los modelos experimentales más usados para el estudio de la enfermedad desde su descripción inicial (Ungerstedt; 1968).

El protocolo consiste en una inyección intracerebral de la toxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA), la cual induce la degeneración selectiva de neuronas dopaminérgicas; la toxina entra a las neuronas mediante el Transportador de Dopamina (TDA o DAT por sus siglas en inglés) y actúa inhibiendo los complejos I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial causando una disminución de ATP, además, su metabolismo está ligado a la producción de radicales libres, lo cual en conjunto producen muerte neuronal.

La inyección unilateral de 6-OHDA en la SNc ocasiona un desbalance en la cantidad de dopamina en cada hemisferio cerebral e hipersensibilidad en los receptores dopaminérgicos, lo cual puede evaluarse por pruebas conductuales como la medición de rotaciones al administrar apomorfina o anfetamina (Deumens et al., 2001).

- *MPTP*

Otro de los modelos que recapitula más fielmente las alteraciones motoras presentes en la EP es el producido por la administración de 1-metil-4 fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). Este compuesto es altamente lipofílico, por lo que puede atravesar rápidamente la barrera hematoencefálica y una vez en el cerebro es captada por las células gliales, las cuales mediante la enzima MAO-B, lo transforma en su forma activa: MPP+, la cual es capaz de inhibir al complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial y conducir al proceso de apoptosis. Presenta cierta selectividad a las neuronas dopaminérgicas debido a que también puede entrar en las neuronas usando el TDA (Dye et al., 2012; Castañeda-Achuntigú et al., 2015).

- *Rotenona*

La rotenona es un pesticida orgánico que se extrae de raíces de plantas tropicales de los géneros *Lonchocarpus* y *Derris*. Su modo de administración puede ser oral, cutánea o intracerebral y funciona inhibiendo el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial; además de que produce la presencia de cuerpos de Lewy, acumulaciones de α -sinucleína que son característicos de la EP. Posee alta liposolubilidad por lo que atraviesa fácilmente las membranas celulares, lo que le confiere poca selectividad para las neuronas dopaminérgicas (Castañeda-Achuntigú et al., 2015).

- *Paraquat*

1,1-dimetil-4,4-dipiridinio o Paraquat es un herbicida tóxico usado ampliamente en los años 60's hasta que se descubrió su toxicidad en los humanos. Actualmente se usa como modelo de la EP debido a su selectividad para las neuronas dopaminérgicas, al igual que el MPP+, se especula que actúa como inhibidor de la cadena respiratoria, lo cual podría ser la base de su toxicidad junto con la generación de ERO y ERN en las células. Este modelo también reproduce agregados similares a los cuerpos de Lewy y algunos de los síntomas de la EP (Castañeda-Achuntiguí et al., 2015).

Tratamiento con L-Dopa

A la fecha, no existe ningún tratamiento totalmente efectivo para eliminar la EP. El tratamiento de remplazo con L-Dopa (Levodopa) es el más usado; sin embargo, se ha reportado que su uso a largo plazo provoca complicaciones motoras que pueden resultar incluso más incapacitantes que la misma enfermedad (Nagatsu y Sawada, 2009).

La L-Dopa se sintetiza en las neuronas catecolaminérgicas a partir del aminoácido Tirosina en una reacción catalizada por la enzima Tirosina Hidroxilasa (TH), y posteriormente, mediante la enzima DOPA Descarboxilasa (DDC), la L-Dopa es convertida en Dopamina (Figura 4). Por lo tanto, la L-DOPA es el precursor directo de la Dopamina y es por ello que es el tratamiento más usado en la actualidad ya que su administración ayuda a restaurar los niveles de Dopamina en el sistema, principalmente en el NE (Nagatsu y Sawada, 2009), revirtiendo los síntomas de la EP.

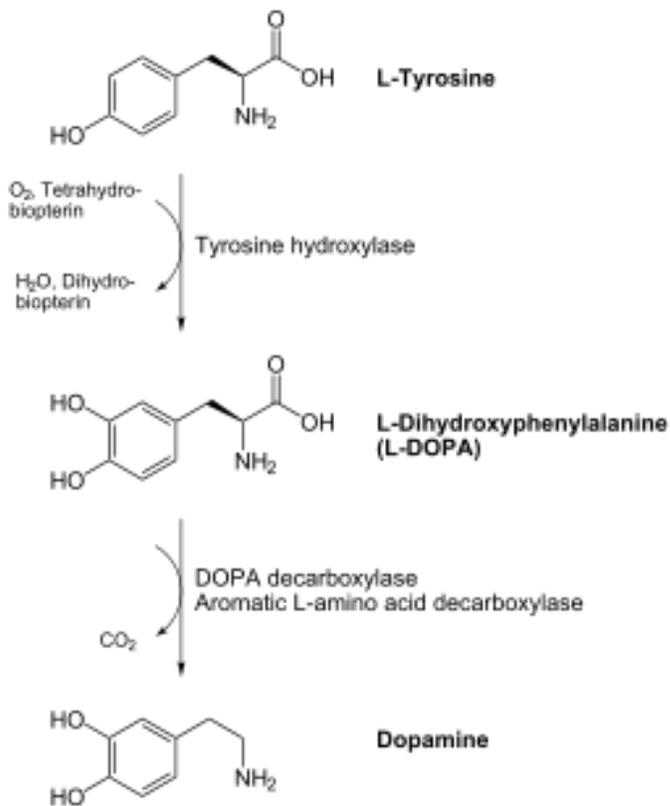


Figura 4. Síntesis de Dopamina. A partir de L-Tirosina, la enzima TH añade un grupo hidroxilo para formar L-Dopa, y en la segunda reacción la enzima Dopa Descarboxilasa elimina un grupo carboxilo de la L-Dopa, formando Dopamina (Tomado de Bahena-Trujillo et al., 2000).

La Dopamina no se utiliza debido a que al ser administrada oralmente no puede cruzar la barrera hematoencefálica. La L-Dopa lo logra utilizando un transportador de aminoácidos aromáticos (Díaz et al., 1998). Sin embargo, la L-Dopa puede metabolizarse periféricamente debido a la acción de la DDC, por lo que usualmente se administra L-Dopa

con algún inhibidor de esta enzima, como Carbidopa o Benzeracida (Nagatsu y Sawada, 2009).

La L-Dopa ha mostrado ser muy efectivo para disminuir los síntomas motores, sin embargo, no detiene el progreso de la enfermedad, y a largo plazo, el tratamiento induce efectos secundarios; principalmente *discinesias (DIL;* discinesias inducidas por L-Dopa); que son movimientos involuntarios de extremidades, tronco y cara que resultan altamente incapacitantes para el paciente (Nombela et al., 2002).

Por otro lado, se ha reportado evidencia de que la L-Dopa podría ser tóxica para las neuronas dopaminérgicas debido a su metabolismo oxidante (Fahn, 1996; Kostrzewa et al., 2002; Abdin y Sarhan, 2011; Chan, 2012). Además, se ha reportado la producción de la toxina 6-OHDA de forma endógena a partir de L-Dopa en el estriado de roedores (Borah et al., 2010), y un aumento en la peroxidación lipídica en NE y SNc de ratas Wistar tratadas con L-Dopa (Gutiérrez, 2012). Debido a esta información, algunos autores proponen que el tratamiento con L-Dopa a largo plazo podría contribuir a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (Borah, et al. 2012), por lo que es necesario buscar nuevos tratamientos para esta enfermedad.

Melatonina

La melatonina es una hormona que se sintetiza a partir del triptófano (figura 5), y está involucrada en diversos procesos fisiológicos, entre ellos regulación neuroinmunológica, modulación del citoesqueleto, regulación de ritmos biológicos como el de sueño-vigilia y función antioxidante. Principalmente es secretada por la glándula pineal, aunque también es secretada en menores cantidades por la retina, el intestino y la médula ósea (Reyes Prieto et al., 2009).

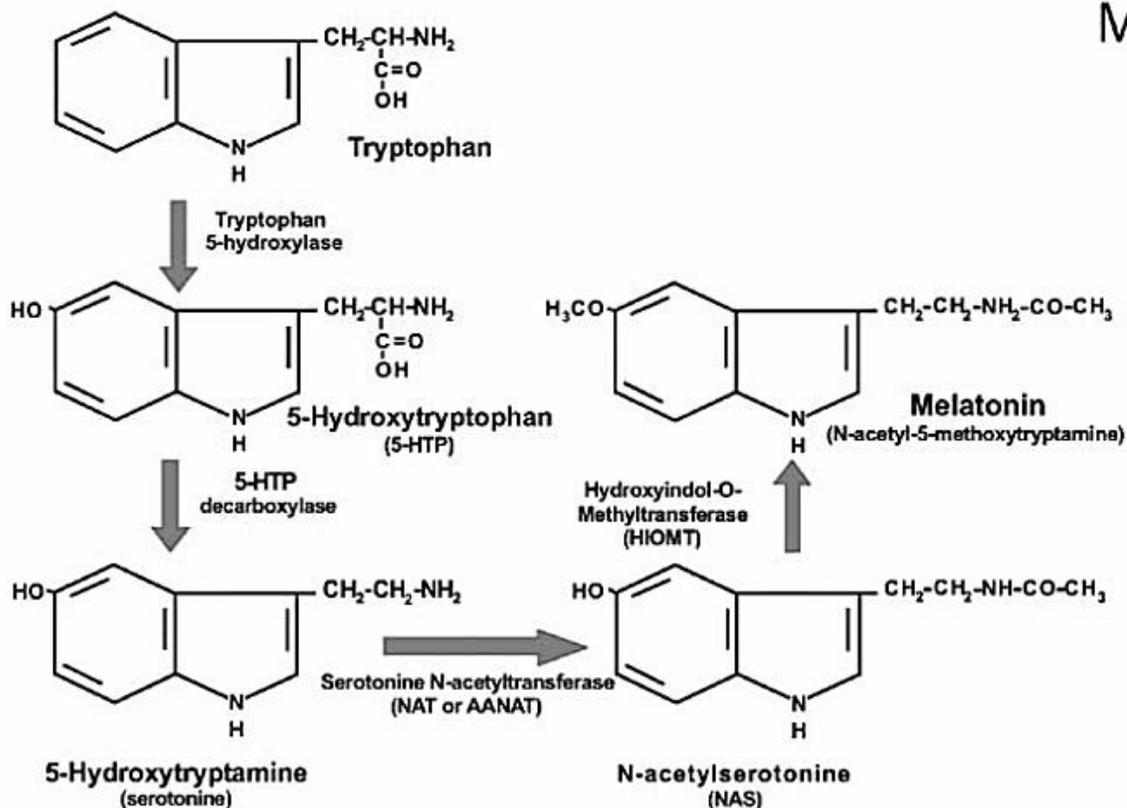


Figura 5. Síntesis de la melatonina a partir del triptófano (Tomado de Reiter et al., 2004).

Su efecto antioxidante funciona en dos niveles: 1) como *antioxidante directo* y 2) como *antioxidante indirecto* induciendo la expresión y/o activación de otras enzimas antioxidantes (Tomás-Zapico y Coto Montes, 2007).

Como antioxidante *directo* es un poderoso eliminador de RL; es capaz de eliminar especies reactivas como el peróxido (H_2O_2), radical hidroxilo ($OH\cdot$), peroxinitrito ($ONOO^-$), moléculas de oxígeno (O_2) y superóxido ($O_2^{\cdot-}$). La mayoría de los antioxidantes requieren pasar por una serie de reacciones de óxido-reducción después de donar un electrón, por lo que en ocasiones pueden inducir oxidación, sin embargo, la melatonina es una molécula rica en electrones, por lo que puede interactuar con los RL a través de reacciones consecutivas que dan lugar a compuestos estables que pueden ser excretados por la orina (Ma et al., 2005).

Además, el efecto antioxidante de la melatonina involucra una cascada en la cual sus metabolitos secundarios y terciarios poseen función antioxidante, como *N*-acetil-*N*-

formil-5-metoxikinuramina (AFMK) y *N*-acetil-metoxinuramina (AMK) (Reiter et al., 1998), e incluso se ha reportado que estos metabolitos podrían ser más eficientes que la melatonina (Acuña-Castroviejo et al., 2003).

En cuanto a su efecto “*indirecto*” como antioxidante, se ha reportado que incrementa la expresión y/o activación de las principales enzimas antioxidantes; como son Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), Glutación Peroxidasa (GPx) y Glutación Reductasa (GRd). Lo que se sabe de este mecanismo es que induce la activación de estas enzimas, se propone que es parte de una cascada inducida por la activación de los receptores de melatonina (Tomás-Zapico y Coto Montes, 2007).

En años recientes, diversos estudios muestran un efecto protector de la melatonina en neuronas y glía de distintas zonas del sistema nervioso, efecto que se le atribuye a su capacidad para inducir la expresión de factores tróficos, frenar la apoptosis y a sus propiedades antioxidantes (Cardinali et al., 2013).

También se ha reportado que la melatonina puede potenciar el efecto de la L-DOPA, mostrando un efecto sinérgico al proteger neuronas dopaminérgicas en modelos de EP, efecto principalmente atribuido a su capacidad antioxidante (Mayo et al., 1998; Gutiérrez Valdez et al., 2012; Gutiérrez Valdez et al., 2015; Naskar et al., 2015). Estudios *in vitro* han demostrado una alta capacidad de esta hormona para inhibir los RL formados por la L-DOPA y la Dopamina (Miller et al., 1996; Khaldy et al., 2000). Asimismo, se ha reportado que la melatonina disminuye la peroxidación de lípidos en el NE y la SNc en modelos de EP en roedores y produce un aumento de la actividad de las enzimas CAT, GPx y SOD (Zaitone et al., 2013).

Estrógenos

La prevalencia de la EP es ligeramente mayor en hombres que en mujeres (aproximadamente 2/3), y ya que es una enfermedad que inicia a edad avanzada, la mayoría de las pacientes femeninas son postmenopáusicas (Secretaría de Salud, 2010). Además, algunos autores han reportado que en pacientes femeninas de EP con mayor tiempo de *vida fértil* y altos niveles de estrógenos pueden presentar síntomas motores

menos severos y un retraso en la aparición de estos (Yadav et al., 2010; Pavón et al., 2010; Nitkowska et al., 2014). Esta evidencia, sugiere que los estrógenos podrían tener un efecto protector en el sistema nervioso en el caso de la EP.

Los estrógenos son hormonas esteroideas con naturaleza no polar, por lo que son capaces de atravesar la membrana celular fácilmente. Existen tres estrógenos naturales: el estradiol, la estrona y el estriol, siendo el primero el más abundante. Debido a los efectos que ejercen sobre las funciones reproductivas de las hembras, se les considera principalmente hormonas *feminizantes*, sin embargo, tienen además una amplia variedad de funciones en diversos tejidos (Flórez, 2005).

En el caso de las hembras el proceso de síntesis de estrógenos se lleva a cabo principalmente en los ovarios y se ve regulado por las hormonas luteinizante (HL) y foliculoestimulante (HFE o FSH por sus siglas en inglés); las primeras actúan preferencialmente sobre las células de la teca para producir pregnenolona y progesterona a partir del colesterol y posteriormente andrógenos como testosterona y androstenediona. Después, estas hormonas serán secretadas hacia las células de la granulosa, las cuales, al ser estimuladas por la FSH para promover la maduración del folículo, llevan a cabo el proceso de aromatización de andrógenos; mediante la enzima “aromatasa” llevan a cabo la reacción para transformar los andrógenos en estradiol (Figura 6) (Flórez, 2005; Kronenberg et al., 2009).

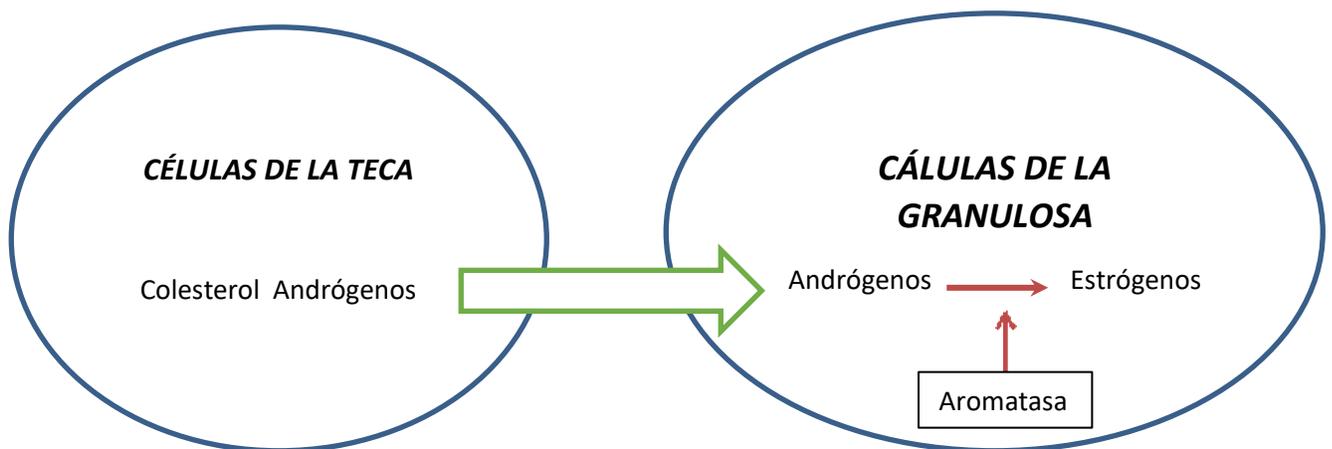


Figura 6. Síntesis de estrógenos.

Aunque la síntesis de estrógenos se realiza principalmente en los ovarios, también se producen en la placenta durante el embarazo y en menores cantidades en testículos y glándulas adrenales. Además, también se ha reportado la presencia del estradiol, sus receptores e incluso aromatasas en neuronas y glía del cerebro de mamíferos (Litim et al., 2016).

Dentro del cerebro, los estrógenos juegan un papel importante en la modulación de la excitabilidad neuronal, plasticidad sináptica, inducción de la sobrevivencia neuronal y regulación en la diferenciación y desarrollo neuronal, esto último principalmente en el desarrollo embrionario en el caso de ambos sexos (Litim et al., 2016).

Existen diferentes tipos de receptores de estrógenos (RE); de acuerdo con su estructura molecular se han caracterizado dos tipos; los α y los β , sin embargo, se especula que actúan de la misma forma al ser activados. Sin embargo, el efecto podría cambiar dependiendo de su localización en la célula; si son RE nucleares, se encargan de modular la síntesis de proteínas activando factores de transcripción, y en caso de ser RE membranales, se han descrito efectos que involucran segundos mensajeros, modulación de cinasas y efectos antioxidantes tanto del estradiol como de algunos de sus derivados (Marín et al., 2005).

La presencia de los RE se ha descrito en diferentes zonas del cerebro de mamíferos; principalmente se ha reportado una gran cantidad de RE en corteza, núcleo olfatorio y *locus ceruleus*, y en cantidades más moderadas en septum, hipotálamo, SN, entre otros (Zhang et al., 2002). La presencia de RE en hipocampo y en el complejo nigro-estriatal se ha asociado con la reestructuración de sinapsis (Dye et al., 2012; Arnold et al., 2012). Además, en años recientes se ha propuesto cierta acción neuro protectora por parte de los estrógenos, o bien de la activación de los RE, posiblemente mediante la regulación transcripcional de elementos involucrados en el crecimiento axonal, sinaptogénesis y factores de crecimiento, así como su actividad antioxidante (Wise et al., 2005; Marín et al., 2005).

Aunque existe gran controversia al respecto del efecto neuroprotector de los estrógenos, algunos estudios sugieren que podrían tener un efecto importante en las neuronas dopaminérgicas de la SN, por lo que podrían ser potencialmente un blanco terapéutico para el tratamiento de la EP (Litim et al., 2015).

Callier y colaboradores en 2002 reportaron que el pretratamiento con estradiol en un cultivo de células mesencefálicas reduce la muerte por apoptosis y necrosis tras la administración de MPTP y 6-OHDA, y Misiak y colaboradores en 2010 observaron que la administración de estradiol en cultivos de células mesencefálicas de ratas hembras y machos reduce los niveles de estrés oxidativo, las alteraciones morfológicas y la muerte neuronal por apoptosis y necrosis tras la administración de 6-OHDA, además de que las células mesencefálicas de hembras son más resistentes a la toxina con respecto a los machos.

Se ha reportado que el estradiol puede estimular la actividad de la dopamina en el sistema nigro-estriatal o incluso evitar la muerte neuronal dependiendo del grado de lesión del sistema, de acuerdo con un estudio de Cordellini y colaboradores en 2011, donde administraron diferentes dosis de estradiol en ratas ovariectomizadas y lesionadas con 6-OHDA. En una revisión de Litim y colaboradores en 2016 también mencionan estudios en los que se muestra el efecto neuroprotector del estradiol en ratas y ratones lesionados con MPTP, sin embargo, los mecanismos por los cuales ejerce este efecto son desconocidos, aunque se propone que mediante los RE- α se desencadene la activación de proteínas G y una vía de segundos mensajeros que promueva la síntesis de enzimas antioxidantes y/o la producción de factores tróficos (Bourque et al., 2015).

Además, Tozzi y colaboradores en 2015 sugieren al estradiol como un posible factor de importancia en la potenciación a largo plazo de la *vía directa* de los ganglios basales, lo que podría compensar en cierto grado las alteraciones sinápticas que se presentan en los pacientes con EP.

Finalmente, en 2015 Gutiérrez Valdez y colaboradores reportaron que existe un retraso en el deterioro motor de ratas hembra lesionadas con 6-OHDA, con respecto a ratas macho y ratas hembra ovariectomizadas con el mismo tratamiento, sugiriendo un papel neuroprotector por parte de los estrógenos. Además, se observó un menor desempeño motor de las hembras ovariectomizadas tratadas con melatonina con respecto a las que conservaban sus ovarios, lo que sugiere una probable interacción sinérgica entre los estrógenos y la melatonina.

En apoyo a lo anterior, Tai y colaboradores en 2011 reportaron el efecto neuroprotector del estradiol en un modelo de isquemia cerebral en ratas, y observaron que

existía un efecto sinérgico en cuanto a actividad antioxidante y antiinflamatoria al combinarse estradiol y melatonina.

Justificación

Como ya se mencionó, muchos estudios demuestran que el estradiol y derivados ejercen una función protectora o antioxidante en diversos tipos neuronales, por lo que sugieren que los niveles de estrógenos pueden ayudar a modular la supervivencia neuronal, lo que podría explicar la mayor prevalencia de la EP en hombres que en mujeres.

En la actualidad la L-Dopa sigue siendo el tratamiento más usado para aliviar los síntomas de la EP, sin embargo, diversos estudios sugieren que podría resultar tóxica debido a su metabolismo oxidante, por lo que a largo plazo podría incluso acelerar la muerte de las neuronas dopaminérgicas. Por otra parte, en años recientes se ha demostrado el efecto neuroprotector de la melatonina en diversos estudios, efecto que se atribuye en gran parte a su alta capacidad como antioxidante y barredor de radicales libres. Similar a otros antecedentes, en estudios recientes de nuestro laboratorio se observó que la terapia con L-Dopa y Melatonina consiguió mejorar tanto el desempeño motor como la supervivencia de neuronas dopaminérgicas y la conservación en el número de espinas dendríticas en las NEM de ratas lesionadas con 6-OHDA; sin embargo, no se realizó ningún experimento para evaluar el efecto de este tratamiento en los niveles de estrés oxidativo en el sistema.

Además, el tratamiento retrasó la aparición de los síntomas motores en las ratas hembra que conservaban sus ovarios, con respecto a las ratas ovariectomizadas, lo que sugiere un efecto neuroprotector por parte de los estrógenos. Por ello, en este estudio se evaluará el efecto de los estrógenos en conjunto con el tratamiento de L-Dopa/Melatonina en los niveles de peroxidación lipídica en núcleos con inervación dopaminérgica de la SNC mediante la prueba del ácido tiobarbitúrico (TBARS).

El experimento se realiza con el fin de evaluar si los estrógenos alteran de forma significativa los niveles de peroxidación lipídica del cerebro tras el tratamiento con L-Dopa y melatonina, y así determinar si podrían ser considerado un factor terapéutico para el tratamiento de la EP.

Objetivo

Evaluar el efecto de los estrógenos sobre el estrés oxidativo tras el tratamiento con L-Dopa/Melatonina en el modelo de EP en ratas lesionadas con 6-OHDA en núcleos que reciben inervación dopaminérgica (NE, GP, Hipocampo y Corteza motora,).

Material y Métodos

Se usaron 50 ratas Wistar hembras con un peso inicial de 160-180 gramos. El estudio se dividió en 2 grupos (n=25): (A) ratas hembra con ovarios y (B) ratas ovariectomizadas.

Para el grupo A, las ratas fueron lesionadas con 6-OHDA (8µg en 4 µL) inyectada intracerebralmente en el haz medial del cerebro anterior de forma unilateral (lado izquierdo). Para garantizar una pérdida de neuronas dopaminérgicas del 90%, las ratas lesionadas debieron presentar conducta de giro contralateral de 200 giros durante 30 minutos tras la inyección de apomorfina (dosis de 0.25 mg/kg) 48 horas después de la lesión (Hefti et al., 1980).

En el grupo B, las ratas fueron ovariectomizadas, para lo cual se hizo una incisión dorsal de 2 cm a la altura del *músculo transverso abdominal* y a continuación se estiró la piel hacia el lado derecho, se separó el músculo para exponer el ovario y se extirpó, luego se procedió a hacer lo mismo en el lado izquierdo. Después de dos semanas se lesionaron con 6-OHDA y se evaluó el grado de depleción dopaminérgica como en el grupo A.

Posteriormente los grupos A y B se dividió en 5 subgrupos (n=5) para administrar los siguientes tratamientos: L-Dopa (10 mg/kg), Melatonina (15 mg/kg) y L-Dopa +

Melatonina (10 y 15 mg/kg c.u.), así como un grupo con lesión 6-OHDA sin tratamiento y se añadió un grupo control sin ninguna alteración (n=5), como se muestra en las siguientes tablas:

Grupo A – Hembras con ovarios				
Sin lesión	6-OHDA	6-OHDA	6-OHDA	6-OHDA
Sin tratamiento (Controles)		+L-Dopa	+Melatonina	+L-Dopa +Melatonina

Grupo B – Hembras ovariectomizadas				
Sin lesión	6-OHDA	6-OHDA	6-OHDA	6-OHDA
Sin tratamiento		+L-Dopa	+Melatonina	+L-Dopa +Melatonina

Los medicamentos fueron administrados oralmente una vez al día por 60 días, las ratas fueron mantenidas en ciclo de luz oscuridad 12:12 con acceso libre a agua y alimento.

Una vez finalizados los 60 días, se sacrificaron todas las ratas, se extrajeron los cerebros y se disecaron los núcleos de interés (SN, NE, GP, Hipocampo y Corteza motora) para un análisis de peroxidación lipídica usando la prueba de ácido tiobarbitúrico (TBARS), la cual se fundamenta en la reacción de éste ácido con el malonaldehído (un producto de la peroxidación de ácidos grasos), produciendo una reacción color rosa que puede medirse por medio de espectrometría (Jenway 6305 a 532 nm); la cantidad de luminiscencia es directamente proporcional a la cantidad de peroxidación lipídica y por tanto, de estrés oxidativo, en cada experimento se usa una curva de referencia con cantidades conocidas

que se procesan al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones que las muestras experimentales. A cada muestra se realiza la medición proteica mediante el método de Bradford para poder expresar los resultados en microgramos de proteína.

Finalmente, para verificar si existen diferencias significativas entre los tratamientos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de la prueba Bonferroni para comprobar las diferencias entre los grupos. Los ANOVA de dos vías se usaron para analizar diferencias de los tratamientos con respecto a los grupos control, y diferencias entre ratas con ovarios y ratas ovariectomizadas (OVX) con el mismo tratamiento.

El proceso se realizó tanto en el lado ipsilateral a la lesión como en el lado contralateral para determinar si había algún efecto en los niveles de peroxidación lipídica en condiciones donde no hay pérdida de inervación dopaminérgica.

Resultados

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de cada uno de los núcleos estudiados. De cada núcleo se muestra una gráfica para el lado ipsilateral y el lado contralateral; cada uno de los tratamientos se representa con un color diferente y también se distinguen entre ratas con ovarios (Barras con relleno coloreado) y ratas OVX (Barras sin relleno). Los resultados se expresan en μL de malonaldehído por mg de proteína.

Las diferencias significativas se muestran con las siguientes acotaciones:

*: Diferencia significativa con respecto al grupo con ovarios sin tratamiento

+: Diferencia significativa con respecto al grupo OVX sin tratamiento

#: Diferencia significativa con respecto al grupo OVX con el mismo tratamiento

De esta forma, cuando un grupo tiene una acotación “*”o “+” refiere a que la cantidad de malonaldehído es significativamente mayor a los grupos sin tratamiento (controles), por el contrario, los grupos que no presentan ninguna acotación indican resultados similares a los

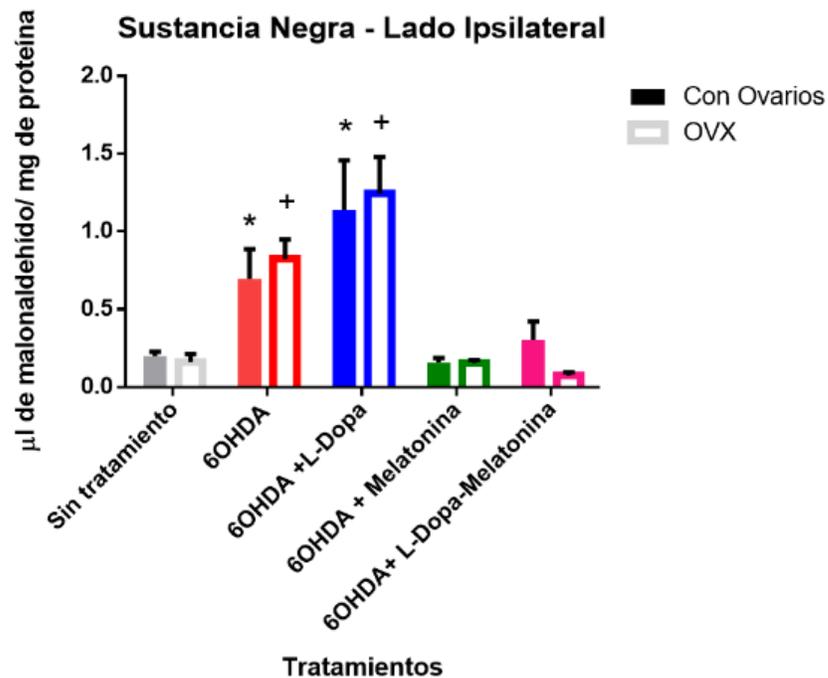
grupos controles. De esta forma se observa qué tratamientos incrementaron o bien mantuvieron/disminuyeron la peroxidación lipídica.

Sustancia negra

Se observa que la lesión con 6OHDA en el haz medial aumenta la peroxidación lipídica en la SN ipsilateral a la lesión en medida por la cantidad de malonaldehído (0.69 ± 0.18 en ratas con ovarios y 0.82 ± 0.12 en ratas OVX) al compararlo con el grupo sin lesión y sin tratamiento (Grupos controles) (0.19 ± 0.025 en ratas con ovarios y 0.16 ± 0.05 en ratas OVX).

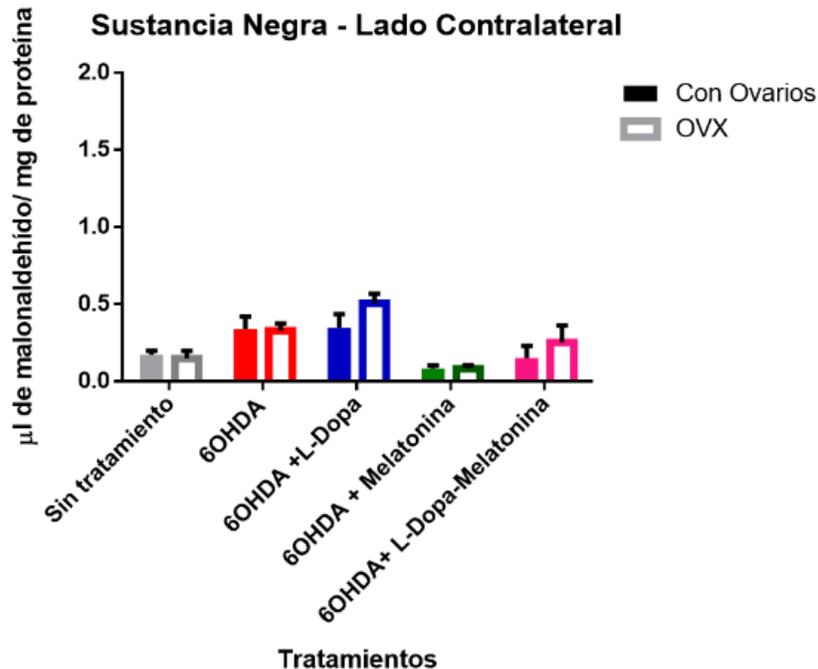
El aumento de peroxidación lipídica tras la lesión con 6OHDA, se ve potenciado con el tratamiento con L-Dopa (1.13 ± 0.31 con ovarios y 1.24 ± 0.23 en ratas OVX), sin embargo, los tratamientos con melatonina y L-Dopa+melatonina lograron disminuir significativamente la cantidad de malonaldehído tras la lesión con 6OHDA, mostrando valores similares a los de los grupos controles.

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de ratas ovariectomizadas (OVX) y las que conservaron sus ovarios (Gráfica 1).



Gráfica 1. Cantidad de malonaldehído según el tratamiento en la SN ipsilateral. * = $p < 0.05$ Significativo vs “Con Ovarios/Sin tratamiento”, + = $p < 0.05$ Significativo vs “OVX/Sin tratamiento”.

En el lado contralateral los tratamientos no mostraron diferencias significativas; las concentraciones de malonaldehído se mantuvieron estadísticamente similares a los de los grupos controles (0.17 ± 0.025 en ratas con ovarios y 0.14 ± 0.048 en ratas OVX), aunque hay una ligera tendencia a un aumento de peroxidación en los grupos lesionados con 6OHDA (0.32 ± 0.01) y los animales lesionados que recibieron L-Dopa (0.42 ± 0.1). En este caso tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos de ratas OVX y las que conservaron sus ovarios.



Gráfica 2. Cantidad de malonaldehído según el tratamiento en SN contralateral. Sin diferencias significativas.

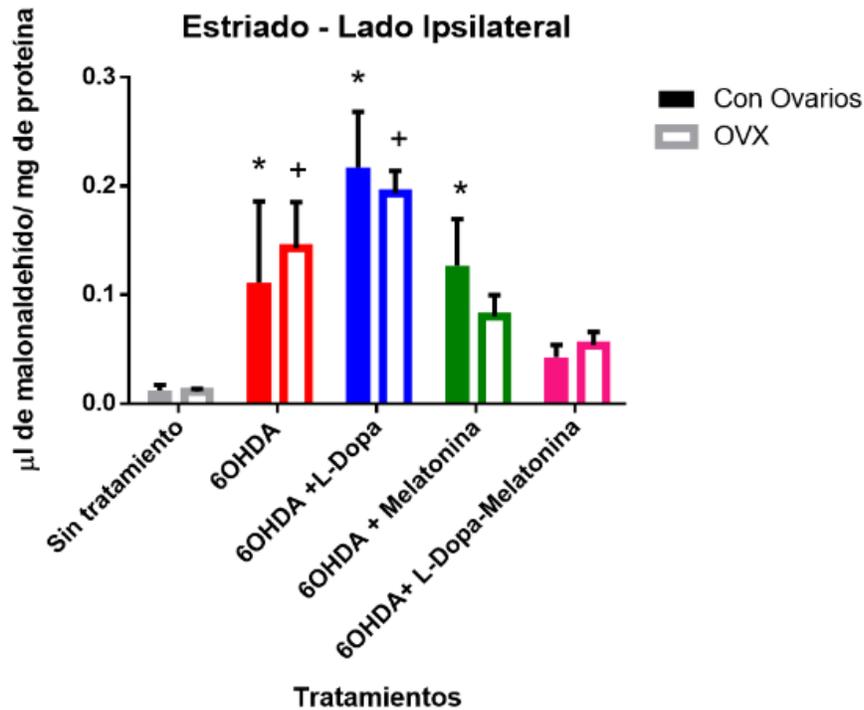
Núcleo Estriado

En el NE, lado ipsilateral, se observa la misma tendencia que en la SN: Los grupos lesionados con 6OHDA y los que posteriormente se trataron con L-Dopa muestran niveles de peroxidación lipídica significativamente más altos que los valores de los grupos controles (0.012 ± 0.0049 en ratas con ovarios y 0.0108 ± 0.0027 en ratas OVX) (Gráfica 3).

El grupo de ratas con ovarios tratado con melatonina también presentó niveles de peroxidación significativamente más altos (1.2 ± 0.042) con respecto al grupo control ($0.0128.2 \pm 0.009$), sin embargo, el grupo de ratas OVX tratado con melatonina (0.08 ± 0.03) no presentó diferencias significativas.

Los grupos tratados con L-Dopa+ melatonina mostraron valores similares a los de los grupos controles en ratas OVX y en ratas con ovarios. Promedio: 0.047 ± 0.01 .

No se encontraron diferencias entre los grupos que conservaron sus ovarios y los grupos OVX.



Gráfica 3. Cantidad de malonaldehído según el tratamiento en NE ipsilateral. * = Significativo vs “Con Ovarios/Sin tratamiento”, + = Significativo vs “OVX/Sin tratamiento”.

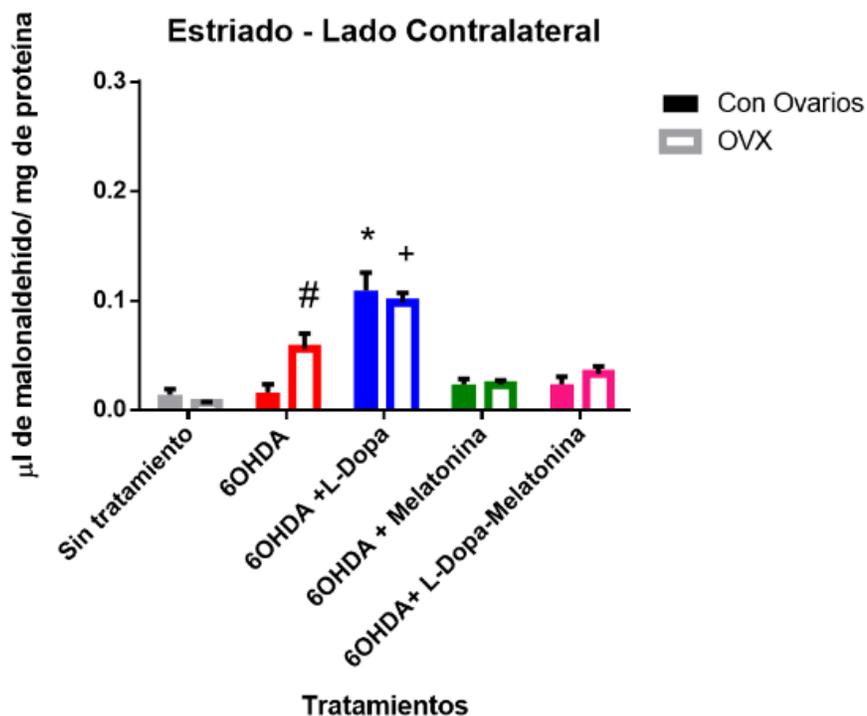
En el lado contralateral, existe una diferencia significativa entre los grupos de ratas lesionadas con 6OHDA que conservan sus ovarios (0.015 ± 0.007) y las ratas lesionadas con 6OHDA OVX (0.055 ± 0.139), sin embargo, los datos de estos no muestran diferencias significativas respecto a sus grupos controles, promedio 0.015 ± 0.003 (Gráfica 4).

El grupo tratado que conservo ovarios y fue tratado con L-Dopa (0.10 ± 0.016) muestra valores significativamente más altos a los de sus grupos control (0.014 ± 0.004). El grupo OVX y tratado con L-Dopa (0.098 ± 0.008) también mostró diferencias significativas con respecto al grupo control (0.0067 ± 0.0006).

Los grupos tratados con melatonina y L-Dopa + melatonina muestran valores similares a los de los grupos controles en ratas OVX (0.022 ± 0.0003 y 0.033 ± 0.009 respectivamente) y en ratas con ovarios (0.023 ± 0.0003 en cada condición) Los grupos tratados con

melatonina y L-Dopa + melatonina muestran valores similares a los de los grupos controles en ratas OVX y en ratas con ovarios.

No se encontraron diferencias entre los grupos que conservaron sus ovarios y los grupos OVX.



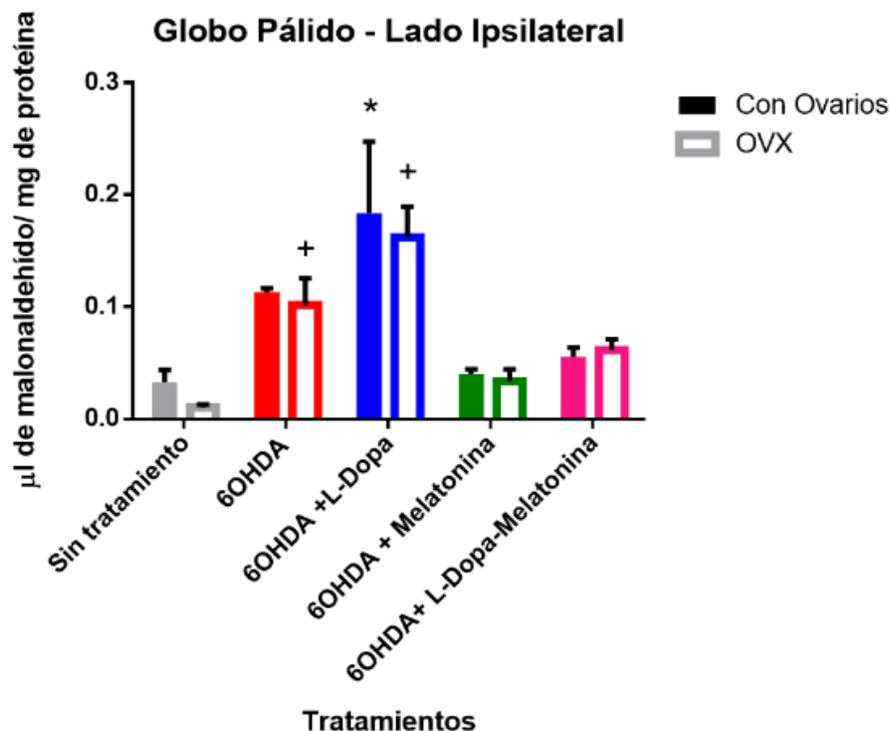
Gráfica 4. Cantidad de malonaldehído según el tratamiento en NE contralateral. * = Significativo vs “Con Ovarios/Sin tratamiento”, + = Significativo vs “OVX/Sin tratamiento”, # = Significativo vs “Con Ovarios/6OHDA”.

Globo Pálido

En el lado ipsilateral se observa que el tratamiento con 6OHDA en ratas OVX aumenta significativamente los niveles de malonaldehído (0.10 ± 0.023) con respecto al grupo control (0.010 ± 0.0025), sin embargo, en el caso de grupo de ratas que conservaron ovarios, el grupo lesionado con 6OHDA (0.11 ± 0.003) no muestra diferencias respecto a su control (0.032 ± 0.011).

Por otra parte, los grupos tratados con L-Dopa mostraron niveles significativamente más altos que los de los grupos controles (0.18 ± 0.6 en ratas con ovarios y 0.16 ± 0.027 en ratas OVX).

Los grupos tratados con melatonina y con L-Dopa + melatonina mostraron valores estadísticamente similares a los grupos controles tanto en ratas OVX (0.033 ± 0.006 y 0.06 ± 0.006) respectivamente como en ratas con ovarios (0.04 ± 0.006 y 0.05 ± 0.005) como en ratas con ovarios (Gráfica 5).



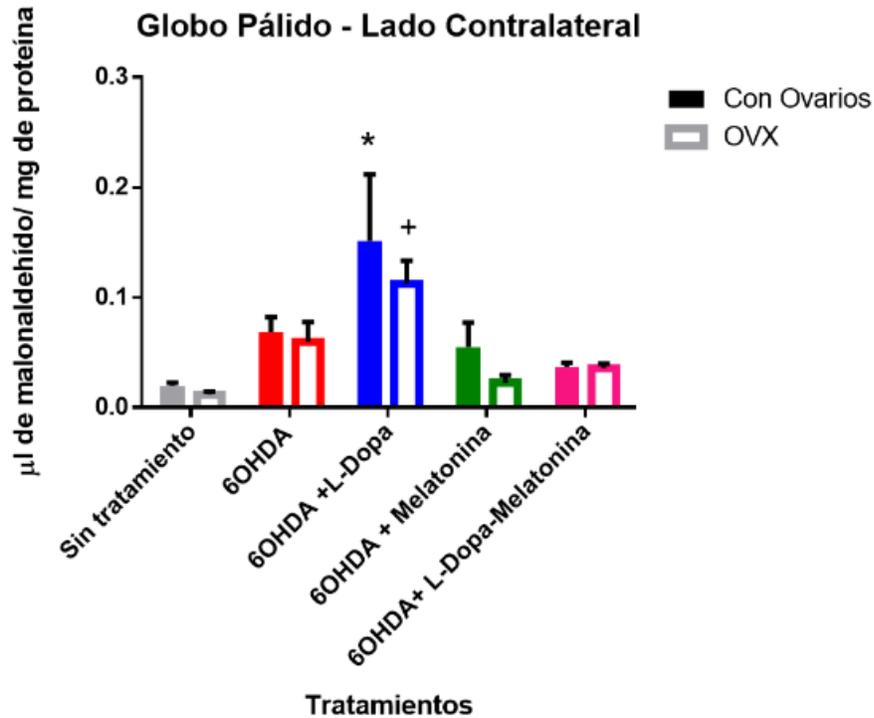
Gráfica 5. Cantidad de malonaldehído según el tratamiento en GP ipsilateral. * = Significativo vs “Con Ovarios/Sin tratamiento”, + = Significativo vs “OVX/Sin tratamiento”.

En el lado contralateral el grupo OVX lesionado con 6OHDA (0.068 ± 0.009) muestra diferencias significativas no está señalada esa diferencia en la gráfica, por eso ceo que más bien muestra tendencia a incrementar la peroxidación con respecto al grupo control (0.0019 ± 0.007).

Los grupos tratados con L-Dopa muestran diferencias significativas en los niveles de peroxidación con respecto a los grupos control en ratas con ovarios (0.019 ± 0.002 “sin tratamiento” y 0.15 ± 0.06 “L-Dopa”) y en ratas OVX (0.011 ± 0.021 “sin tratamiento” y 0.11 ± 0.021 “L-Dopa”).

Los grupos tratados con melatonina (0.05 ± 0.03 y 0.022 ± 0.002 respectivamente) y con L-Dopa + melatonina (0.035 ± 0.03 y 0.037 ± 0.002) no mostraron diferencias significativas con respecto a los grupos controles (Gráfica 6).

No se encontraron diferencias entre los grupos que conservaron sus ovarios y los grupos OVX.



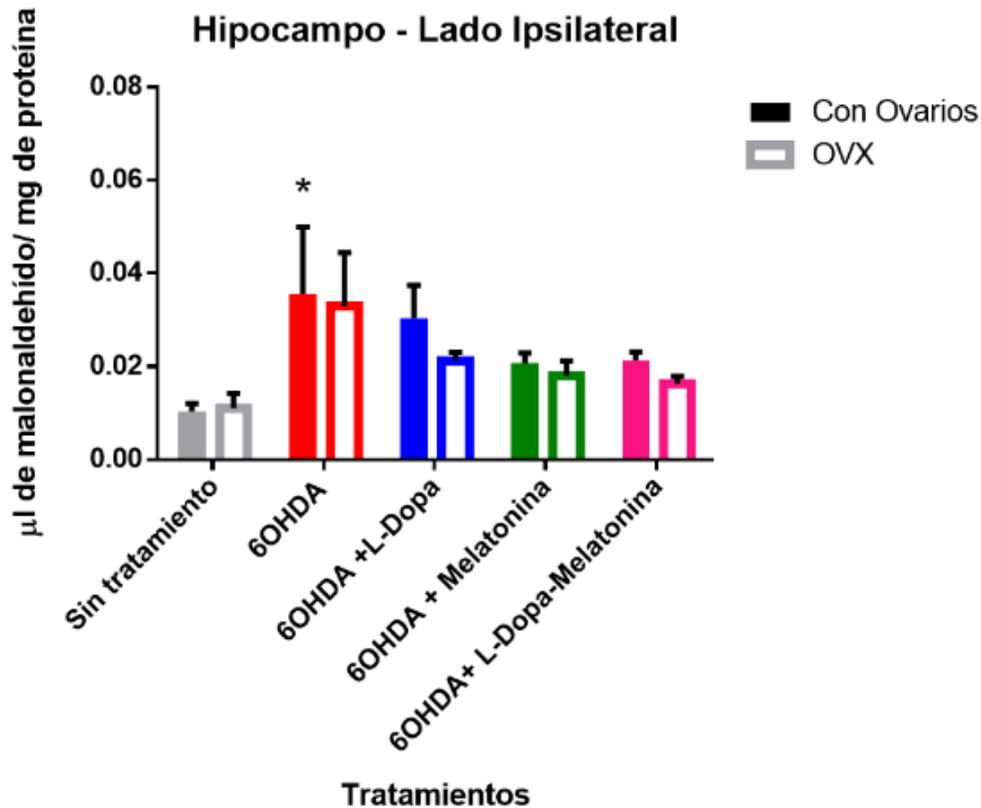
Gráfica 6. Cantidad de malonaldehído según el tratamiento en GP contralateral. * = Significativo vs “Con Ovarios/Sin tratamiento”, + = Significativo vs “OVX/Sin tratamiento”.

Hipocampo

En el lado ipsilateral el grupo que conservó sus ovarios y fue lesionado con 6OHDA (0.035 ± 0.014) aumentó significativamente los niveles de malonaldehído con respecto al grupo control (0.010 ± 0.0017), sin embargo en las ratas OVX no hubo diferencias significativas en el grupo lesionado con 6OHDA (0.032 ± 0.011) y su grupo control (0.011 ± 0.003).

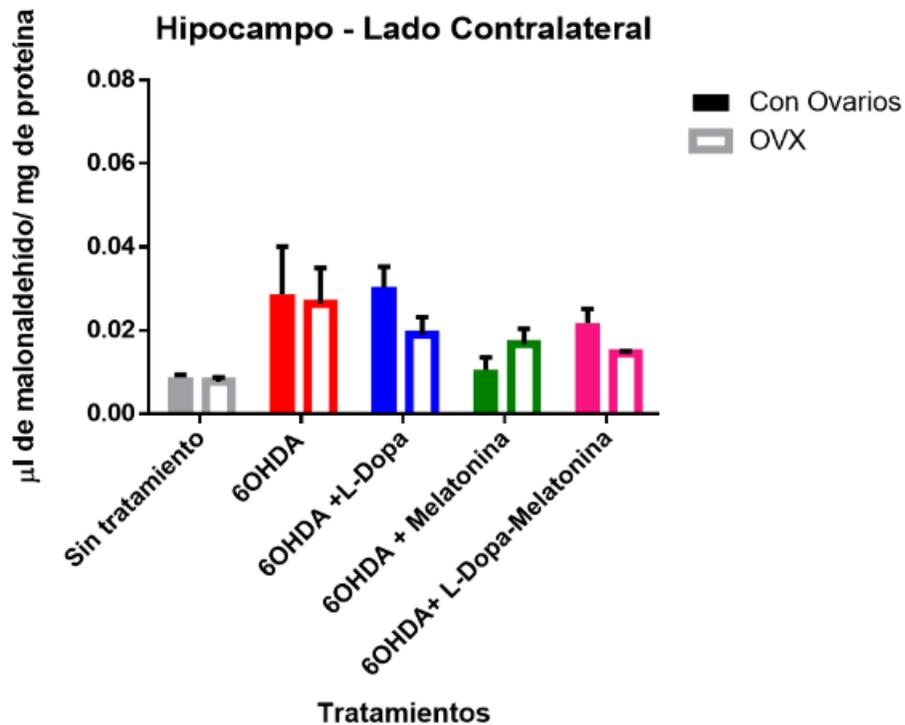
Los grupos tratados con L-Dopa, melatonina y L-Dopa + melatonina no mostraron diferencias significativas con respecto a los grupos control, tanto en ratas con ovarios (0.03 ± 0.009 , 0.02 ± 0.002 y 0.021 ± 0.004) como en los grupos OVX (0.02 ± 0.01 , 0.018 ± 0.002 y 0.016 ± 0.005).

No se encontraron diferencias entre los grupos que conservaron sus ovarios y los grupos OVX.



Gráfica 7. Cantidad de malonaldehído según el tratamiento en Hipocampo ipsilateral. * = Significativo vs “Con Ovarios/Sin tratamiento”, + = Significativo vs “OVX/Sin tratamiento”.

En el lado contralateral a la lesión no se encontró diferencia significativa entre los grupos lesionados con 6OHDA, ni en los que fueron tratados con L-Dopa (0.03 ± 0.01 y 0.29 ± 0.01) melatonina (0.01 ± 0.006 y 0.016 ± 0.005) y L-Dopa + melatonina (0.02 ± 0.007 y 0.014 ± 0.007) con respecto a los grupos control que conservaron ovarios (0.0088 ± 0.0005) y los grupos control OVX (0.0077 ± 0.001) (Gráfica 8). Tampoco se encontraron diferencias entre los grupos que conservaron sus ovarios y los grupos OVX.



Gráfica 8. Cantidad de malonaldehído según el tratamiento en Hipocampo contralateral. * = Significativo vs “Con Ovarios/Sin tratamiento”, + = Significativo vs “OVX/Sin tratamiento”.

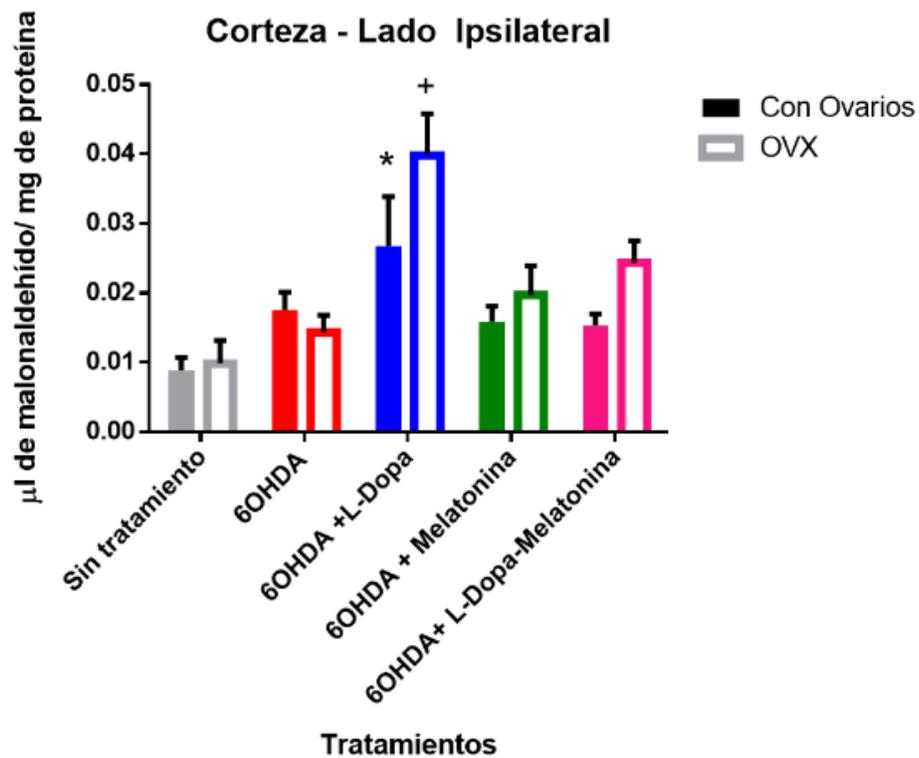
Corteza

En el lado ipsilateral los grupos lesionados con 6OHDA no mostraron diferencias significativas contra los grupos controles, tanto en el grupo OVX como en el grupo que conservó sus ovarios.

Los grupos tratados con L-Dopa mostraron diferencias significativas con respecto a los grupos controles tanto en los grupos de ratas con ovarios (0.008 ± 0.0017 “sin tratamiento”

y 0.026 ± 0.007 “L-Dopa”) como en los grupos de ratas OVX (0.009 ± 0.003 “sin tratamiento” y 0.039 ± 0.005 “L-Dopa”).

Los tratamientos con melatonina (0.015 ± 0.003 con Ov, 0.019 ± 0.003 OVX) y con L-Dopa + Melatonina (0.015 ± 0.009 con Ovarios, 0.02 ± 0.0008 OVX) no presentaron diferencias significativas con respecto a los grupos controles (0.0088 ± 0.0009 con OV, y 0.009 ± 0.0009 OVX) Tampoco se encontraron diferencias entre los grupos de ratas con ovarios y los grupos con ratas OVX. (Gráfica 9).

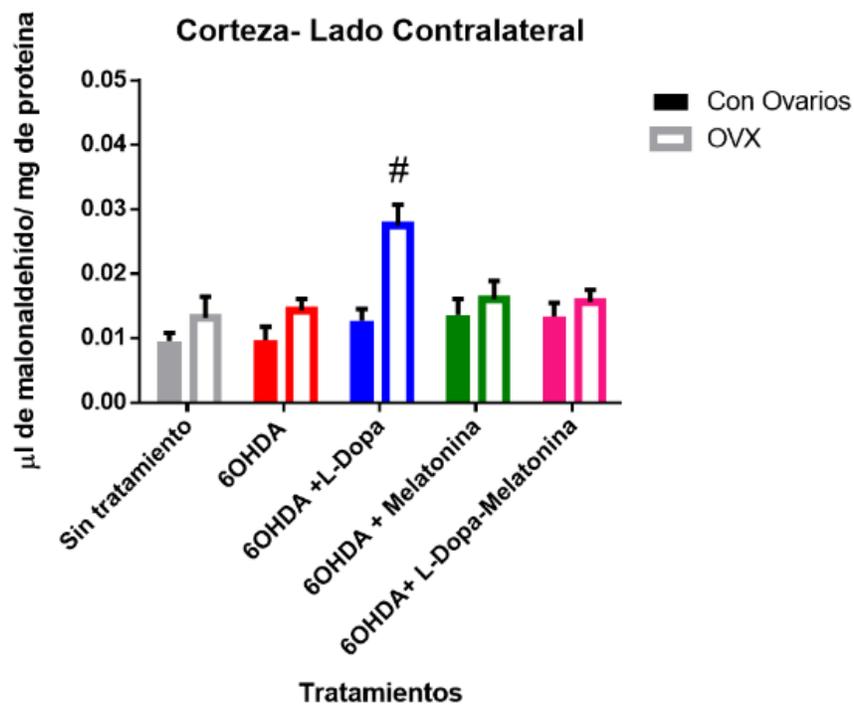


Gráfica 9. Cantidad de malonaldehído según el tratamiento en Corteza ipsilateral. * = Significativo vs “Con Ovarios/Sin tratamiento”, + = Significativo vs “OVX/Sin tratamiento”.

En el lado contralateral solamente el grupo de ratas OVX tratado con L-Dopa (0.027 ± 0.0032) mostró diferencias significativas con respecto al grupo control (0.013 ± 0.0032). En este caso el ANOVA indicó una interacción entre ambos factores; el tratamiento con L-Dopa y la ausencia de estrógenos (Gráfica 10).

Los grupos lesionados con 6OHDA (0.009 ± 0.004 con Ovarios, 0.014 ± 0.004 OVX) y el resto de los tratamientos (promedio 0.013 ± 0.002 con Ovarios y 0.17 ± 0.002 OVX) no presentaron diferencias significativas respecto a los grupos controles, tanto en los grupos OVX, como en los que conservaron sus ovarios.

No se encontraron diferencias entre los grupos de ratas con ovarios y los grupos con ratas OVX.



Gráfica 10. Cantidad de malonaldehído según el tratamiento en Corteza contralateral. * = Significativo vs “Con Ovarios/Sin tratamiento”, + = Significativo vs “OVX/Sin tratamiento”, # = Significativo vs “6OHDA +L-Dopa Con Ovarios”

Discusión

Sustancia negra

Los resultados muestran que en la SN, la lesión con 6OHDA provoca un aumento significativo de los niveles de peroxidación lipídica en el lado ipsilateral a la lesión, lo cual probablemente se debe a que esta toxina funciona inhibiendo los complejos I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que produce un mal funcionamiento en la cadena transportadora de electrones y resulta en un aumento en los niveles de estrés oxidativo en las células (Deumens et al, 2001) y por lo tanto un aumento de peroxidación lipídica.

El grupo tratado con L-Dopa tras la lesión con 6OHDA, también mostró un incremento significativo de peroxidación lipídica respecto a los grupos sin tratamiento; este incremento puede deberse (además de la acción de la 6OHDA) a que durante el metabolismo de la dopamina se pueden producir radicales libres que aumentan los niveles de estrés oxidativo en el sistema (Fahn, 1996; Kostrzewa et al., 2002; Borah et al., 2010, Abdin y Sarhan, 2011; Chan, 2012).

No hay que dejar de lado el hecho de que la dopamina es un neurotransmisor modulador y en terminales glutamatérgicas se encuentran receptores de la familia D2 (Maura et al., 1998, Surmeier et al., 2007) que disminuye la liberación del glutamato, por lo que ante la falta de dopamina estas terminales pierden dicha inhibición y por lo tanto hay cantidades altas de glutamato, lo cual induce la acumulación de calcio al estimular los receptores ionotrópicos, en especial los NMDA (Feldman et al., 1996). Este aumento de calcio genera la formación de radicales libres que promueven la peroxidación de lípidos a nivel de las membranas (Hidalgo, 2008).

Por otra parte en los resultados se puede observar que al combinarse L-Dopa y melatonina, o bien, con la sola administración de melatonina, se disminuyen los niveles de peroxidación lipídica a niveles similares a los de los grupos sin tratamiento; estos resultados pueden explicarse debido a que la melatonina funciona como un poderoso antioxidante, el cual se encarga de eliminar los radicales libres que pudieran formarse durante el metabolismo de la dopamina, por lo que la combinación permite la entrada de dopamina en las zonas donde se requiere y a su vez una disminución en los niveles de estrés oxidativo y por lo tanto de

peroxidación lipídica. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Gutiérrez, 2012 y 2015, quien encontró que la lesión con 6OHDA y la consecuente administración de L-Dopa por seis meses aumentan los niveles de peroxidación lipídica en el NE y la SN, y por otro lado la administración de melatonina y la combinación L-Dopa + melatonina resulta en un efecto neuroprotector de las neuronas dopaminérgicas contra la toxicidad de la 6OHDA.

Se ha reportado que la lesión con 6OHDA unilateral en ocasiones puede afectar el hemisferio contrario a la lesión (Ávila-Costa, 1996), sin embargo, en este caso, no se encontraron diferencias significativas con respecto a los grupos “sin tratamiento” de la SN en el lado contralateral, aunque se observa una ligera tendencia similar a la del lado ipsilateral. Cabe mencionar que la administración de los tratamientos se realizó en un periodo corto (48 horas) después de la lesión y que la evolución del daño contralateral es más lenta que la del lado ipsilateral (Ávila-Costa et al., 2008).

En la SN no se encontraron diferencias entre los grupos de ratas con ovarios y ratas OVX ni en el lado ipsilateral ni en el contralateral a la lesión con 6OHDA, por lo que se sugiere que la ausencia de estrógenos no afecta significativamente este núcleo con ninguno de los tratamientos, al menos durante el periodo estudiado (dos meses).

Núcleo Estriado

En el NE se observa una tendencia similar a la SN: En el lado ipsilateral, la lesión con 6OHDA provocó un aumento significativo en los niveles de peroxidación lipídica, al igual que los grupos que fueron lesionados y posteriormente tratados con L-Dopa. El NE recibe inervación dopaminérgica de la SN y de las neuronas glutamatérgicas provenientes de corteza; de esta manera modulan la actividad del circuito los ganglios basales. Esta inervación ocasiona que el NE sea un blanco muy susceptible al daño por estrés oxidativo causado por la lesión con 6OHDA, ya que la toxina podría viajar a través de los axones y llegar a las terminales dopaminérgicas en el NE, causando daños en los sitios de sinapsis (Blum et al., 2001). Además, una descarga anormalmente grande de dopamina podría causar también toxicidad en el NE, ya sea incrementando la generación de 6OHDA (Maharaj et al., 2005; Borah et al., 2010) o por radicales libres formados como consecuencia del metabolismo de este neurotransmisor (Fahn 1996; Kostrzewa et al., 2002; Abdin, Sarhan, 2011; Chan, 2012).

Por otra parte, en las ratas ovariectomizadas, el grupo tratado con melatonina no muestra diferencias significativas en los niveles de peroxidación lipídica con respecto a los grupos “sin tratamiento”. Sin embargo, en las ratas que conservaron sus ovarios, la sola administración de melatonina fue incapaz de reducir significativamente los niveles de peroxidación causados por la lesión con 6OHDA. Estos resultados sugieren que la presencia de estrógenos podría afectar la eficacia de la melatonina para reducir los niveles de peroxidación lipídica en el NE. Los estudios en cuanto al efecto neuroprotector de los estrógenos son controversiales, existe evidencia de que los estrógenos pueden presentar efectos neuroprotectores contra la 6OHDA (Misiak et al., 2010; Cordellini et al., 2011), sin embargo también se ha reportado que en algunos tipos celulares la melatonina podría funcionar inhibiendo los receptores de estrógenos induciendo cambios conformacionales en los complejos RE-Calmodulina (Hill y Blask et al., 1998; Del Río et al., 2004), afectando así la vía de activación de los RE y por tanto inhibiendo la acción protectora de los estrógenos contra la 6OHDA. No obstante, hay que considerar que este puede ser un efecto a corto o mediano plazo, pues en trabajos previos (Gutiérrez 2012; 2015) la medicación a largo plazo (seis meses) muestra un efecto benéfico.

Los niveles de peroxidación de los grupos tratados con L-Dopa + melatonina resultaron estadísticamente similares a los grupos “sin tratamiento”, por lo que se sugiere que la combinación de ambos fármacos es efectiva para reducir los niveles de peroxidación lipídica causada por 6OHDA.

En el lado contralateral a la inyección de la neurotoxina, se observa que el grupo de ratas lesionadas con 6OHDA que conservaron sus ovarios es estadísticamente similar a los grupos “sin tratamiento”, sin embargo, el grupo de ratas ovariectomizadas presenta niveles de peroxidación significativamente más altos que los de los grupos “sin tratamiento”, por lo que se sugiere que la presencia de estrógenos puede influir como un factor neuroprotector contra el daño por 6OHDA. El efecto protector de los estrógenos se atribuye a la activación de vías de segundos mensajeros que se activan mediante los RE, dado que los RE son nucleares, estas vías actúan mediante la activación de genes que se encargan de inducir la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl2 y Bcl-xL (Misiak et al., 2010), o genes que se encargan de inducir cambios en la estructura de las mitocondrias, aumentando la eficiencia de la cadena transportadora de electrones y manteniendo así la viabilidad celular (Arnold et al., 2012). De esta manera se sugiere que el efecto tóxico de la 6OHDA es más potente en ausencia de estrógenos.

Finalmente, los grupos tratados con melatonina o con L-Dopa + melatonina no muestran diferencias significativas con respecto a los grupos sin tratamiento.

Globo Pálido

En el GP, en el lado ipsilateral a la lesión, las ratas ovariectomizadas mostraron niveles más altos de peroxidación en el grupo lesionado con 6OHDA con respecto al grupo “sin tratamiento”, mientras que en las ratas que conservaron sus ovarios fueron estadísticamente similares a las de los grupos “sin tratamiento”, lo que sugiere nuevamente un efecto neuroprotector de los estrógenos contra la 6OHDA.

Los grupos que fueron tratados con L-Dopa mostraron niveles significativamente más altos de peroxidación con respecto a los grupos control. El resto de los tratamientos mostraron cantidades de malonaldehído estadísticamente similares a los grupos control.

En el lado contralateral sólo los grupos tratados con L-Dopa también mostraron niveles de peroxidación significativamente más altos que los grupos control.

Como los tratamientos con L-Dopa resultaron en niveles altos de peroxidación tanto en ratas ovariectomizadas como en las que conservaban sus ovarios y tanto en lado ipsilateral como contralateral a la lesión, se sugiere que éste núcleo es especialmente susceptible al daño por dopamina. Se ha reportado que existen neuronas dopaminérgicas con inervación directa al GP desde la SN (Debeir et al., 2005; Anaya-Martínez et al., 2006), por lo que la 6OHDA y/o la dopamina, podrían viajar a través de los axones de las neuronas dopaminérgicas de la SN hasta llegar a los sitios de sinapsis en el GP, lo que explicaría los altos niveles de peroxidación lipídica en este núcleo.

En el caso del lado contralateral, los altos niveles de peroxidación en los grupos tratados con L-Dopa pueden explicarse debido a que la administración de L-Dopa puede resultar en un exceso de dopamina (tomando en cuenta que el lado contralateral no es tan afectado), por lo que los radicales libres resultantes del metabolismo de la dopamina aumentan los niveles de estrés oxidativo en la zona. Como señalamos previamente, este experimento nos da información sobre el progreso de la enfermedad, el tiempo de medicación fue de dos meses, cabe destacar que los datos muestran al GP como un núcleo especialmente sensible y que valdría la pena tomar en cuenta incluso como posible blanco terapéutico.

Hipocampo

En el hipocampo en el lado ipsilateral a la lesión, las ratas que conservaron sus ovarios registraron un aumento significativo en los niveles de peroxidación con respecto al grupo “sin tratamiento”, sin embargo, en el caso de las ratas ovariectomizadas no se mostraron diferencias significativas con respecto al grupo “sin tratamiento”, pero si una clara tendencia a aumentar los niveles de peroxidación lipídica. Estos resultados sugieren que la ausencia de estrógenos favorece la resistencia del hipocampo contra la lesión por 6OHDA en el haz medial del cerebro anterior.

Se observa que los grupos que recibieron tratamientos con L-Dopa y melatonina tienen niveles de peroxidación estadísticamente similares a los de los grupos “sin tratamiento”, por lo que estos fármacos lograron disminuir los niveles de estrés oxidativo causados por la 6OHDA tanto en ratas con ovarios como en ratas ovariectomizadas.

La innervación dopaminérgica en el hipocampo llega principalmente a zonas relacionadas con neurogénesis en cerebros adultos de roedores, primates no humanos y humanos. El hipocampo recibe innervación dopaminérgica desde distintas zonas como el área ventral tegmental (AVT) y la SN (Scatton et al., 1980; Hoglinger et al., 2014), por lo que tras la lesión la toxina podría viajar a través de los axones de las neuronas dopaminérgicas que hayan captado 6OHDA y así llegar a los sitios de sinapsis en el hipocampo, aumentando los niveles de peroxidación. No obstante, hay que resaltar que el daño sería parcial, ya que la 6OHDA al ser introducida a las células por el transportador de dopamina (DAT) no afecta a las neuronas de ambas zonas de manera similar (Rothblat et al., 2001), es más agresivo sobre la SNc, por lo que éste núcleo ayudaría a mantener los niveles de Dopamina (Bernheimer et al., 1973; Blanchard et al., 1994; Uhl, 1998) Asimismo, el tratamiento con L-Dopa podría favorecer la neurogénesis por medio de la estimulación de los receptores D3, lo que protegería sustancialmente la zona contra los altos niveles de estrés oxidativo causados por la 6OHDA. (VanKampel et al., 2004)

En el lado contralateral a la lesión no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Corteza

En los resultados registrados de la corteza cerebral en el lado ipsilateral, los grupos tratados con L-Dopa mostraron niveles de peroxidación lipídica significativamente más altos que los demás grupos.

Nuestros resultados son similares a los reportados por Ogawa et al., 1994, quienes encontraron que roedores sanos tratados con L-Dopa mantienen niveles de peroxidación similares a los del grupo control en corteza, sin embargo, si antes del tratamiento con L-Dopa los ratones eran previamente lesionados con 6OHDA, los niveles de peroxidación lipídica en corteza aumentaban significativamente. Debeir y colaboradores en 2005, reportaron que la lesión unilateral con 6OHDA provoca una pérdida de fibras corticales que expresaban TH. También se ha reportado que en roedores existen neuronas dopaminérgicas de la SN que puede proyectar a otros núcleos, como el GP, el tálamo y la corteza (Gauthier et al., 1999; Prensa y Parent, 2001), por lo que la dopamina administrada podría ser transportada hasta las terminales corticales causando un aumento de los niveles de estrés oxidativo en esa zona.

Por otra parte, Bamford y colaboradores en 2004 reportaron la existencia de receptores dopaminérgicos de la familia D2 en neuronas corticoestriatales, donde la dopamina se encarga de modular la frecuencia de disparo y la liberación de glutamato en estas terminales, por lo que una alteración en el sistema dopaminérgico puede desencadenar excitotoxicidad y así aumentar los niveles de estrés oxidativo y dañar a las neuronas.

Por otra parte, Hamdi A. en 1998 demostró que la melatonina puede incrementar la afinidad de la dopamina hacia los receptores D2 en el NE, y dado que existen receptores D2 en corteza, parte del efecto protector de la melatonina podría ser mediante el incremento de esta afinidad.

En el lado contralateral solamente el grupo de ratas ovariectomizadas y tratadas con L-Dopa registró niveles significativamente más altos al resto de los grupos, por lo que se sugiere que los estrógenos lograron tener un efecto neuroprotector durante el tratamiento con L-Dopa.

.....
Como puede observarse, el papel neuroprotector de los estrógenos en nuestros resultados no es homogéneo, ya que varía de acuerdo al núcleo y al tratamiento farmacológico. Esta heterogeneidad en los resultados se puede atribuir a la cantidad de RE en diferentes zonas del cerebro, ya que una diferencia en el número de RE en cada núcleo podría representar mayor neuroprotección en algunos casos. Se ha reportado que las cantidades de receptores de estrógenos se distribuyen de manera heterogénea en el cerebro y pueden disminuir conforme avanza la edad del organismo, sin embargo, se ha observado que núcleos como la SN, hipocampo, estriado y corteza no se ven significativamente afectados hasta que el animal se encuentra en una edad muy avanzada (24 meses) (Yamaguchi-Sima y Yuriko, 2007).

Por otra parte, existen estudios en los que se reportan grandes cantidades de RE en la corteza cerebral e hipocampo de ratas adultas hembras, y una menor cantidad de RE en la SN (Zhang et al., 2002; Brailoiu et al., 2007). La gran cantidad de RE que existen en la corteza cerebral a comparación de otros núcleos puede explicar el hecho de que se haya mostrado un efecto protector, a pesar de ser del lado contralateral a la lesión. En apoyo a esto, en un estudio realizado por Pérez y colaboradores, quienes en 2003 reportaron la distribución de RE alfa y beta en el cerebro de ratas a las dos semanas después del nacimiento; si bien la distribución de los RE cambia a medida que el individuo crece, se observa que un tipo de receptor puede predominar en alguno de los dos hemisferios, lo que podría explicar la presencia de neuroprotección solamente en lado contralateral en el caso de corteza, y solo ipsilateral en el caso del NE.

Los mecanismos de neuroprotección por parte de los estrógenos son aún desconocidos, sin embargo, principalmente se ha sugerido que actúan mediante la activación de proteínas G, las cuales desencadenan vías de segundos mensajeros que pueden activar vías anti-apoptóticas o bien, un aumento de la tasa de transcripción de genes que controlan la sobreproducción de ERO, lo cual podría incluir la activación de otros mecanismos antioxidantes (Misiak et al., 2010).

Conclusiones

- La lesión con 6OHDA incrementa los niveles de peroxidación lipídica principalmente en SN y NE, aunque también puede afectar el GP, y el hipocampo.
- El GP resultó muy sensible a la inyección 6OHDA.
- El tratamiento con L-Dopa incrementa los niveles de peroxidación en SN, NE, GP y Corteza.
- No se detectó alguna interacción entre la presencia de estrógenos y el tratamiento con Melatonina, salvo en el lado ipsilateral del NE, en el que la ausencia de estrógenos favoreció la reducción de los niveles de peroxidación en el grupo tratado con Melatonina.
- La ausencia de estrógenos ocasionó un incremento de peroxidación significativamente mayor en el contralateral a la lesión en el NE del grupo lesionado con 6OHDA.
- La ausencia de estrógenos provocó un incremento significativo de peroxidación en la Corteza de los grupos tratados con L-Dopa.
- En general, los tratamientos con Melatonina y L-Dopa + Melatonina tienden a reducir significativamente los niveles de peroxidación lipídica tanto en presencia o ausencia de estrógenos.

Literatura citada

- 1- Abdin AA, Sarhan IN. (2011) Intervention of mitochondrial dysfunction-oxidative stress-dependent apoptosis as a posible neuroprotective mechanim of α -lipoic ácid against rotenone-induced parkinsonism and L-DOPA toxicity. *Neuroscience Research*. 71: 387–395
- 2- Acuña-Castroviejo D, Escames G, Leon J, Carazo A, Khaldy H. (2003) Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Adv Exp Med Biol*; 527: 549-57.
- 3- Anaya-Martínez V, Martínez-Marcos A, Martínez-Fong D, Aceves J, Erij D. (2005) Substantia Nigra Compacta Neurons Inervate the Reticular Thalamic Nucleus In The Rat Also Project To Striatum Or Globus Pallidus: Implications For Abnormal Motor Behavior. *Neuroscience* (143):477-486
- 4- Arnold S, Victor MB, Beyer C. (2012) Estrogen and the Regulation of Mitochondrial Structure and Function in the Brain. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. (131) 2-9
- 5- Ávila Costa MR. (1996) Evolución de las alteraciones ultraestructurales del neurópilo del núcleo caudado de rata después dela lesión unilateral de la vía nigroestriatal con 6OHDA. Tesis para obtener el grado de Maestra en Neurociencias, ENEP Iztacala, UNAM
- 6- Ávila-Costa MR, Gutiérrez-Valdez AL, Ordoñez-Librado JL, Anaya-Martínez V, Colín Barenque L, Ezpinosa-Villanueva J, Aley-Medina P, Montiel-Flores E, Velazquez-Mata A, Machado-Salas JP. (2008). Time course changes of the striatum neuropil after unilateral dopamine depletion and the usefulness of the contralateral striatum as a control structure. *Neurological Research* (30): 1068-1074
- 7- Bahena-Trujillo R, Flores G, Arias-Montaña JA. (2000) Dopamina; síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central. *Rev. BioMed* 11: 39-60

- 8- Bamford NS, Robinson S, Palmiter RD, Joyce JA, Moore C, Meshul CK. (2004) Dopamine Modulates Release From Corticostriatal Terminals. *The Journal of Neuroscience* 24(43): 9641-9652
- 9- Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress *Nat Rev Drug Discov* 3: 205-214.
- 10- Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O., Jellinger K. & Seitelberger F. (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington: clinical and morphological and neurochemical correlations. *J. Neurol. Sci.* 20: 415-455
- 11- Blanchard V., Raisman-Vozari R., Vyas S., Michel P. P., Javoy-Agid F., Uhl G. & Agid Y. (1994). Differential expression of tyrosine hydroxylase and membrane dopamine transporter genes in subpopulations of dopaminergic neurons of the rat mesencephalon. *Brain Res Mol Brain Res* 22: 29–38.
- 12- Blum D, Torch S, Lambegh N, Nissou NF, Benabid L, Sadoul R, Verna JM. (2001) Molecular pathways involved in neurotoxicity of 6OHDA, dopamine and MPTP: Contributions to the apoptotic theory in Parkinson's Disease. *Progress in Neurobiology* 65 (2001):135-172.
- 13- Borah A, Mohanakumar KP. (2010) L-DOPA- induced-6OHDA production in the striata of rodents is sensitive to degree of denervation. *Neurochemistry International*, 56: 357-362.
- 14- Borah A, Mohanakumar KP (2012). L-Dopa Induced -endogenous 6-hydroxydopamine is the cause of aggravated dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's disease patients.
- 15- Bourque M, Morissette M, Di Paolo T (2015) Neuroprotection in Parkinsonian Treated Mice via Estrogen receptor A Activation Requires G Protein – Coupled Estrogen Receptor 1. *Neuropharmacology* 95: 343-52
- 16- Brailoiu E, Dun SL, Brailoiu GC, Mizuo K, Sklar SA, Oprea TI, Prossnitz ER, Dun NJ. (2007). Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *Journal of Endocrinology* (193) 311-321

- 17- Callier S, Le Saux M, Lhiaubet AM, Di Paolo T, Rostene W, Pelaprat D. (2002) Evaluation of the Protective Effect of Estradiol Against Toxicity Induced by 6-Hydroxidopamine and 1-Methyl-4Phenylpyridinium ion (MPP+) towards Dopaminergic Mesencephalic Neurons in Primary Culture. *Journal of Neurochemistry*, (80) 307-316 pp.
- 18- Cardinali DP, Pagano ES, Scachi Bernasconi PA. (2013) Melatonin and Mitochondrial Dysfunction in the Central Nervous System. *Hormones and Behavior* 63 (2) 322-330
- 19- Cardoso SM, Moreira PI, Agostinho P, Pereira C, Oliveira CR. (2005) Neurodegenerative Pathways in Parkinson's Disease: Therapeutic Strategies. *CNS & Neurological Disorders*. 4 : 405-419
- 20- Castañeda-Achuntiguí F, Tejada MA, Escalante CA, Suces Bernes HA, Monterrubio LE, García LR. (2015) Modelos Clásicos de Inducción de Enfermedad de Parkinson. *Rev. eNeurobiología* 6 (13):020915
- 21- Chan SW, Dunlop RA, Rowe A, Double KL, Rodgers KJ (2012) L-DOPA is incorporated into brain proteins of patients treated for Parkinson's inducing toxicity in human neuroblastoma cell in vitro. *Experimental Neurology* 10919.); 4C
- 22- Cordellini MF, Piazzetta G, Pinto KC, Delattre AM, Matheussi F, Carolino ROG, Szawka RE, Anselmo Franci JA, Ferraz AC. (2011) Effect of Different Doses of Estrogen on the Niugroestriatal Dopaminergic System in Two 6-Hydroxydopamine-Induced Lesion Models of Parkinson's Disease. *Neurochem Res* (36) 955-961 pp.
- 23- Davies KJA. (1998) Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposium*, 61:1-31
- 24- Debieir T, Ginester L, Francois C, Laurens S, Martel JC, Chopin P, Marien M, Colpaert F, Raisman-Vozari R. (2005). Effect of intrastriatal 6OHDA lesion on dopaminergic innervation of the rat cortex. *Experimental Neurology* (193): 444-454

- 25- Del Río B, García Pedrero JM, Martínez Campa C, Zuazua P, Lazo P, Ramos S. (2004) Melatonin, an endogenous specific inhibitor of Estrogen Receptor Alfa via Calmodulin. *The Journal of Biological Chemistry*. 279 (37): 38294-38302
- 26- Deumens R, A Blokland, J Prickaerts. (2001) Modeling Parkinson's Disease in Rats: An Evaluation of 6-OHDA Lesions of the Nigrostriatal Pathway. *Experimental Neurology*: 175, 303–317 pp.
- 27- Dexter D, Wells FR, Lees AJ, Agid Y, Jenner P. (1989) Increased nigral Iron content and alteration in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem* 52: 1830-1836.
- 28- Dexter DT. (1989) Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 52: 381-389
- 29- Díaz-Martínez A, Pascual-Gómez J, Pazos AC. (1998) Terapéutica Farmacológica de los movimientos anormales. *Medicine* 7 (103) 4809-4822
- 30- Dorado MC, Vargas RC, Rivas AS. (2003) Estrés oxidativo y Neurodegeneración (Monografía) *Rev Fac Med UNAM Vol.46 No.6 Noviembre-Diciembre, 2003*
- 31- Dye VR, Miller JK, Singer JE, Levine AJ. (2012) Hormone Replacement Therapy and Risk for Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Alzheimer's Disease*: (2012), Article ID 258454: 18 pp. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/ijad/2012/258454/>
- 32- Fahn Stanley. (1996) Is levodopa toxic? *Neurology*, vol. 47. 6:3; 184S-195S
- 33- Feldman RS., Quenzer FL. *Principles of Neuropsicofarmacology*. (1996). Capítulo 10, Parte 1: Excitatory amino acids: Glutamate and Aspartate. Publicado por: Simanuer and associates, 1° edición.
- 34- Ferrer VD, Jorge FC, Cutido CL, García RE, Arce G. (1999) Radicales libres y su papel en la homeostasis neuronal. *Medisan* 3: 5-11.
- 35- Flórez J. (2005) *Farmacología Humana*. Masson 4° edición. "Hormonas sexuales: estrógenos, gestágenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales", pp. 867-890

- 36- Gauthier J, Parent M, Levesque M, Parent A. (1999) The axonal arborization of single nigrostriatal neurons in rats. *Brain Research* 834: 228-232
- 37- Gómez-Chavarrín M, Pérez M, Arancibia S. (2007) Estrés Oxidativo y Neurodegeneración: ¿Causa o consecuencia? *Archivos de Neurociencias*. 12 (1): 45-54).
- 38- Gómez-Chavarrín M, Roldan-Roldan G, Morales-Espinosa R, Pérez-Soto G, Torner-Aguilar C. (2012) Mecanismos Fisiopatológicos involucrados en la enfermedad de Parkinson. *Neurociencia*: 17,1: 25-33 pp.
- 39- Gutiérrez-Valdez AL, Anaya Martínez V, Ávila Costa MR. (2012) Efecto Neuroprotector de la Melatonina en la Enfermedad de Parkinson. Editorial Académica Española.
- 40- Gutiérrez-Valdez AL. (2015) Efecto de la administración de la L-Dopa, melatonina y L-Dopa/melatonina en un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson: comparación entre sexos. Tesis de Doctorado. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.
- 41- Hattoria N, Wanga M, Taka H, Fujimura T, Yoritaka A, Kubo S-I, Mochizuki H. (2009) Toxic effects of dopamine metabolism in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2009 Jan;15 Suppl 1:S35-8
- 42- Hamdi A. (1998) Melatonin administration increases the affinity of D2 Dopamine receptors in the rat striatum. *Life Sciences* 63(23): 2115-2120
- 43- Hefti F, Melamed E, Wurtman RJ. (1980). Partial Lesions of the Dopaminergic Nigrostriatal System in Rat Brain: Biochemical Characterization. *Brain Research* (195): 123-137
- 44- Hill SM, Blask DE. (1998) Effects of the pineal hormone Melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Research* 48: 6121-6126
- 45- Hidalgo C, Nuñez M.T. (2008) Calcium, Iron and Neuronal Function, *Critical Review. IUBMB Life*, 59 (4-5): 280-285

- 46- Hoglinger GU, Arias-Carrion O, Ipach B, Oertel WH. (2014) Origin of the dopamergic innervation of adult neurogenic areas. *Journal of Comparative Neurology* 522 (10): 2336-2348
- 47- Ian RA, Mackenzie MD, FRCPC. (2001) The Pathology of Parkinson Disease. *BC Medical Journal*, 43 (3): 142-147
- 48- Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (2008). Enfermedad de Parkinson. Disponible en la web: [_Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía \(salud.gob.mx\)](http://www.inn.neuro.gob.mx)
- 49- Keeney PM, Xie J, Capaldi RA, Bennett Jr JP, (2006). Parkinson Disease Brain Mitochondrial Complex 1 has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci*. 10:26 (19) 5256-64
- 50- Khaldy H, Escames G, Leon J, Vives F, Luna JD, Acuña-Castroviejo D. (2000) Comparative effects of melatonin, L deprenyl, Trolox and ascorbate in the suppression of hydroxyl radical formation during dopamine autoxidation in vitro. *Journal of Pineal Research* 29 (2): 100-107
- 51- Kostrzewa RM, Kostrzewa JP, Burns R. (2002) Neuroprotective and neurotoxic roles of levodopa (L-DOPA) in neurodegenerative disorders relating to Parkinson's disease. *Amino Acids* 23: 57-63
- 52- Kronenberg MH, Melmed S, Polonsky S, Kenneth L, P Reed. (2009) *Tratado de Endocrinología*. Madrid, España; México: Elsevier. 11° edición. 549-600 pp.
- 53- Litim N, Morissette M, Di Paolo T. (2016). Neuroactive Gonadal Drugs for Neuroprotection in male and female models of Parkinson's Disease. *Neurosci. Biobehav Rev* 67:79-88
- 54- Ma X, Idle JR, Krausz KW, Gonzalez FJ. (2005) Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug Metab Dispos*: 33: 489-94.
- 55- Maura G, Giardi A, Raiteri M. (1988). Release regulating D2 Dopamine receptors are located on striatal glutamatergic nerve terminals. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 247 (2) 680-684.

- 56- Marín R, Guerra B, Alonso R, Ramírez CM y Díaz M. (2005) Estrogen activates classical and alternative mechanisms to orchestrate neuroprotection. *Curr Neurovasc Res* 2(4): 287-301.
- 57- Mayo JC, Sainz RM, Uría H, Antolín I. (1998) Inhibition of cell proliferation: a mechanism likely to mediate the prevention of neuronal cell death by melatonin. *J Pineal Research* 25(1):12-8.
- 58- Maharaj H, Maharaj DS, Scheepers M, Mokokong R, Daya S. (2005) L-Dopa Administration enhances 6- Hydroxydopamine generation. *Brain Research*. 1063 (2): 180-186
- 59- Miller JW, Selhub J, Joseph JA. (1996) Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autoxidation: protective effects of O-methylation and melatonin. *Free Radical Biology & Medicine*. 21 (2): 241-249
- 60- Misiak M, Beyer C, Arnold S. (2010) Gender-Specific Role of Mitochondria in the Vulnerability of 6-Hydroxydopamine-Treated Mesencephalic Neurons. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797, 1178-1188 pp.
- 61- Moon Hyo Eun, Sun Ha Paek. (2015) Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *Exp. Neurobiol.* 24 (2): 103-116
- 62- Nagatsu T, Sawada M., 2009. L-Dopa Therapy for Parkinson's Disease; Past, Present and Future (Review). *Parkinsonism and Related Disorders*: 15, Supplement 1 (2009): S3–S8 pp.
- 63- Naskar A, Prabhakar V, Singh R, Dutta D, Mohanakumar KP. (2015) Melatonin enhances L-DOPA therapeutic effects, helps to reduce its dose, and protects dopaminergic neurons in MPTP induced parkinsonism in mice. . *Journal of Pineal Research* 58: 262-274
- 64- Nitkowska M, Cyzyk M, Friedman A (2014) Reproductive life characteristics in females affected with Parkinson's disease and in healthy control subjects - a comparative study on Polish population. *Neurol Neurochir Pol.* 48(5):322-7

- 65- Nombela-Merchan F, Tomoro-Ortíz I, Galán-Gutiérrez T. (2002) Tratamiento Farmacológico de la NEfermedad de Parkinson. Revista de la sociedad madrileña de Medicina de la Familia y Comunitaria. 1(4): 38-42
- 66- Ogawa N, Asanuma M, Kondo Y, Kawada Y, Yamamoto M, Mori A. (1994) Differential effects of chronic L-Dopatreatment on lipid peroxidation in the mouse brainwith or without pretreatment with 6OHDA. Neuroscience Letters, 171: 55-59
- 67- Pavon JM, Whitson HE, Okun MS. (2010) Parkinson's disease in women: a call for improved clinical studies and for comparative effectiveness research. Maturitas, 65 (4):352-8
- 68- Pedrosa R, Soares-da-Silva P. (2002). Oxidative and non oxidative mechanisms of neuronal cell death and apoptosis by L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and dopamine. British Journal of Pharmacology (137:8) 1305-13013
- 69- Pérez SE, Chen EY, Mufson EJ. (2003). Distribution of estrogen receptor alfa and beta inmunoreactive profiles in the postnatal rat brain. Developmental Brain Research (145) 117- 139
- 70- Prensa L, Parent A. (2001) The nigrostriatalpathway in the rat: a single-axon study of the relationship between dorsal and ventral tier nigral neurons and striosome matrix striatal compartments. Journal of Neuroscience 21: 7247-7260
- 71- Purves D. 2004. Invitación a la Neurociencia. Editorial Médica Panamericana 2° reimpresión. 459-477 pp.
- 72- Reiter RJ, Guerrero JM, García JJ, Acuña-Castroviejo D. (1998) Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. Ann N Y Acad Sci; 854: 410-24.
- 73- Reiter RJ, Tan DX, Gitto E. (2004). Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. Pol J Pharmacol; 56(2): 159-70.
- 74- Reyes-Prieto BM, Velázquez-Paniagua M, Prieto-Gómez B. (2009) Melatonina y Neuropatologías. Rev Fac Med UNAM (52) 3, 105-109.

- 75- Rothblat DS1, Schroeder JA, Schneider JS. (2001) Tyrosine hydroxylase and dopamine transporter expression in residual dopaminergic neurons: potential contributors to spontaneous recovery from experimental Parkinsonism. *J Neurosci Res.* Aug 1;65(3):254-66.
- 76- Saggi H. (1989) A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in parkinsonian substantia nigra. *J Neurochem* 52: 692-697
- 77- Sanyal J, Bandyopadhyay SK, Banerjee TK, Mukherjee SC, Chakraborty DP, Ray BC, Rao VR. (2009) Plasma Levels Of Lipid Peroxides In Patients With Parkinson's Disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2:129-132.
- 78- Scatton B, Simon H, Le Moal M, Bischoff S. (1980) Origin of dopaminergic innervation of the rat hippocampal formation. *Neuroscience Letters.* 18(2): 125-131
- 79- Secretaría de Salud, México. (2010) Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad de Parkinson inicial y avanzada en el tercer nivel de atención. CENETEC. Disponible en:
http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/305_SSA_10_PARKINSON_3ER_NVL/EyR_Parkinson.pdf
- 80- Schapira AH. (1998). Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Disorders. *Biochim Biophys Acta.* Aug 10: 136681-2) 225-33.
- 81- Sofic E. (1988) Increased Iron (III) and total iron content post mortem substantia nigra of Parkinsonian brain. *J. Neurochem* 53: 692-697
- 82- Sofic E, Lange KW, Jellinger K, Riederer P. (1992) Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neuroscience Letters.* 142(2):128-130.
- 83- Surmeier JD, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W. (2007). D1 and D2 dopamine receptors modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends of Neuroscience.* 30 (5): 228-235.
- 84- Tai SH, Hung YC, Lee EJ, Lee AC, Chen TY, Shen CC, Chen HY, Lee MY, Huang SY, Wu TS. (2011) Melatonin protects against transient focal cerebral ischemia in both reproductively active and estrogen-deficient female rats: the impact of

circulating estrogen on its hormetic dose–response. *J. Pineal Res*: 2011; 50: 292–303 pp.

- 85- Tomás-Zapico C, Coto-Montes A. (2007) Melatonin as Antioxidant Under Pathological Processes. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery* : 1, 63-82
- 86- Tozzi A, De Lure A, Tantucci M, Durante V, Quiroga V A, Giampa C, Di Mauro M, Mazzochetti P, Costa C, Di Filippo M, Grassi S, Petorossi VE, Calabresi P. (2015) Endogenous 17 β -estradiol is required for activity-dependent long-term potentiation in the striatum: interaction with the dopaminergic system. *Front Cell Neurosci.* _9: 192-198
- 87- Uhl G. R. (1998). Hypothesis: the role of dopaminergic transporters in selective vulnerability of cells in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, Vol. 43, pp. 555–560.
- 88- Ungersted U. (1968) 6-Hydroxidopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J. Pharmacol*, 5: 107-110
- 89- VanKampel V, Hagg T Robertson H (2004) Inductions of neurogenesis in adult rats subventricular zone and neurostriatum following dopamine D3 receptor stimulation. *European of Journal Neuroscience.* 19:2377-2387
- 90- Wise PM, Dubal DB, Rau SW, Susuki RS. (2005) Are estrogens neuroprotective or risk factors in brain injury and neurodegeneration? *Endosc Rev*, 26(3): 308-312 pp.
- 91- Yadav R, Shulka G, Goyal V, Singh S, Behari M. (2010) A case control study of women with Parkinson's disease and their fertility characteristics. *J Neurol Sci.* 15; 319(1-2):135-8
- 92- Yamaguchi Sima N. Yuriko N. (2007). Age related changes in the expression of ER-beta mRNA in the female rat brain. *Brain Research* (1155) 34-41
- 93- Zaitone SA, ,Hammad LN, Faraq NE. (2013) Antioxidant Potential of melatonin enhances response to L-DOPA in MPTP parkinsonian mice. *Pharmacological Reports* 65: 1213-1226

94- Zhang JQ, Cai WQ, Shou DS, Su BY. (2002). Distribution and differences of estrogen receptor beta immunoreactivity in the brain of adult male and female rats. *Brain Research* (935): 73-80