



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Efecto Funcional y sobrevivencia neuronal en la
SNc por la coadministración de L-Dopa/Melatonina
en ratas lesionadas con 6-OHDA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGO

PRESENTA:

MARIA DEL CARMEN TORRES ESQUIVEL

DIRECTORA DE TESIS: DRA. VERONICA ANAYA MARTINEZ



ESTADO DE MEXICO

2012



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.

“La ciencia es la expresión de una necesidad inherente al ser humano y, en todo caso, está ligada a la función superior de su naturaleza inteligente: la capacidad de crear”

René Gerónimo Favaloro

“Mientras el cerebro sea un misterio, el universo continuará siendo un misterio”

Santiago Ramon y Cajal

“El cerebro es más grande que el cielo si los pones uno junto al otro el primero contiene al segundo y sin dificultad te incluye a ti también”

Emily Dickinson

“Hay dos formas de ver la vida: una es creer que no existen milagros, la otra es creer que todo es un milagro.”

Albert Einstein

DEDICATORIAS

A mi madre, el más puro ejemplo de fortaleza y empeño, porque a ti te debo todo lo que soy. Por ser el motor que impulsa el andar de cada uno de mis días, TE AMO.

A mis hermanos y a mi abuela, sin ustedes mi esfuerzo sería nada...

A mis sobrinos, quienes ahora mueven toda mi existencia y llenan mi vida entera con la armonía de sus risas.

A mi ángel de la guarda, mi abuelo Rubén, porque aunque no estés aquí físicamente, se que desde el cielo sigues cada paso que doy...

A Verónica Anaya y María Rosa Ávila quienes acrecentaron y formaron mi amor por la ciencia con su ejemplo y sabiduría.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo brindado para la elaboración de este trabajo a:

- Proyecto DGAPA-PAPIIT IN220111
- PAPCA-IZTACALA No. 13-2011-2012
- CONACYT-SIN-118320

Del mismo modo, agradezco al comité tutorial por su apoyo y por sus aportaciones para la realización de este trabajo.

Dra. Verónica Anaya Martínez

Dra. María Rosa Avila Costa

Dra. Laura Colín Barenque

Mtro. en C. Enrique Montiel Flores

Dra. Bertha Segura Alegría

AGRADECIMIENTOS

Gracias mamá, porque sin tu paciencia, ejemplo y amor este trabajo no se hubiese logrado, gracias por tu infinito apoyo y ser para mi desde pequeña la razón de toda ambición, agradezco todos y cada uno de tus innumerables sacrificios... A ti debo todo lo que soy y cada una de mis metas, cada logro mío es también tuyo; doy gracias a Dios por haberme dado la dicha de tenerte conmigo. Agradezco también a mis hermanos quienes realmente mueven mi vida desde siempre y para quienes espero ser un buen ejemplo; ustedes fueron motivo clave para realizar este trabajo. A mi dos veces madre, "mi cori" quien ha llenado de amor toda mi existencia con su paciencia y sabios consejos, no tienes una idea de la importancia que ha tenido tu presencia no sólo en este capítulo de mi vida, si no desde siempre.

A mi familia del laboratorio de Neuromorfología Experimental y Aplicada: Vero, mi madre académica, sinceramente no pude tener a nadie mejor que tu dirigiendo mi proyecto de tesis estas impregnada en todas y cada una de sus páginas, gracias por compartir conmigo todo tu conocimiento, pero sobre todo por ser más que solo mi asesora y convertirte en mi amiga y brindarme un poco de tu tiempo, tu espacio y alegrías, ¡estoy orgullosa de haber podido ser dirigida por una persona tan sabia y maravillosa como tú!. Verito, de verdad muchas gracias por tu infinita **paciencia** y por enseñarme que la serenidad y la razón siempre te muestran el camino más certero... TE ADORO.

Gracias María Rosa, no sé que habría hecho sin todo tu apoyo, cuando te conocí jamás imaginé que te convertirías en una de las personas más influyentes en mi vida, estoy profundamente agradecida con Dios por ponerte en mi camino, eres el mayor ejemplo de tenacidad, fortaleza, bondad, amistad y amor. De verdad no tengo vocabulario suficiente para expresar mi gratitud por tu incondicional apoyo y por todo lo que he aprendido de ti en todos los aspectos, te quiero y

admiro cada día más... Simplemente no creo que imagines lo importante que eres para mí. ¡MIL GRACIAS!

A mi asesora implícita a quien le debo gran parte de este trabajo, gracias Ana Gutierrez, por enseñarme toooooodo lo necesario para elaborar este trabajo, por tus comentarios, puntos de vista y conocimiento, pero sobre todo gracias por valiosa amistad. A Ricardo García, por compartir conmigo tu sapiencia universal, no imaginas lo importante que eres para mi, tu al igual que Ana fueron indispensables para que este trabajo dejara de ser interminable... A ambos les debo gran parte de mi tesis... ¡Los adoro! A Enrique Montiel, por tu consejos y amistad; a Laura Colín, Javier, Alejandra, Chucho, Paty, Fidencio, Lichita y Jose Luis. A mi hermana académica y futura ganadora del novel Montserrat Moreno, quien aunque siempre luchó por ser la preferida de nuestra madre Vero, ¡nunca lo logró!... Gracias por haber endulzado este proceso, por llenar de vida y alegría cada día en el laboratorio.

A mis amigos de la carrera, Victor Jimenez, Kenya Toledo, Karina Trinidad, Juan de Dios Ruíz y Adrian Palma, porque ustedes son simplemente lo mejor que me ocurrió en toda la carrera, LOS AMO. A mi amiga y hermana Daljie Nava, quien sufrió mi abandono por la elaboración de este trabajo.

Agradezco especialmente a mis profesores de la carrera quienes me mostraron la maravilla de la biología con sus enseñanzas y me hicieron enamorarme perdidamente de ella... especialmente a Daleth Guedea, Martin Martínez, Sarma S. Pilar Villeda, Héctor Barrera, Ángel Durán y Elías Piedra, ¡Gracias por todo!. Finalmente quiero expresar mi más atenta y profunda gratitud al Dr. Juan Silva quien me rescató del tormento estadístico, porque sin usted seguiría haciendo gráficas...

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Abreviaciones	2
3. Introducción	3
3.1 Antecedentes	3
3.2 Neuropatología	5
3.3 Características Clínicas	6
3.4 Etiología	7
3.4.1 Factores genéticos	7
3.4.2 Factores ambientales	7
3.4.3 Estrés oxidativo	8
3.4.4 Disfunción mitocondrial	10
3.5 Ganglios basales	10
3.5.1 Anatomía de los Ganglios Basales	12
3.5.2 Organización Funcional	14
3.5.3 Alteraciones de los Ganglios basales	16
3.6 Modelos Experimentales de la EP	18
3.6.1 Modelos con MPTP	19
3.6.2 Modelo de la 6-OHDA	20
3.7 Terapias	22
3.7.1 Anticolinérgicos	24
3.7.2 Terapia de remplazo (L-Dopa)	24
3.7.3 Discinesias Inducidas por L-Dopa (DIL)	27
3.7.4 Agonistas dopaminérgicos	31
3.7.4.1 Apomorfina	32
3.7.4.2 Bromocriptina	33
3.7.4.3 Antioxidantes	34
3.7.4.4 Vitaminas A, C y E	34
3.7.4.5 Coenzima Q10	34
3.7.4.6 Melatonina	35

4. Justificación-----	40
5. Objetivo General-----	40
6. Objetivos Particulares-----	41
7. Metodología-----	41
8. Resultados-----	47
8.1 Prueba de Escalera-----	47
8.2 Prueba de Viga-----	49
8.3 DILs/AIMs-----	51
8.4 Supervivencia Neuronal-----	58
9. Discusión-----	60
9.1 Prueba de Escalera-----	60
9.2 Prueba de Viga-----	63
9.3 DILs/AIMs-----	65
9.4 Supervivencia Neuronal-----	70
10. Conclusiones-----	71
11. Referencias-----	72
12. Apéndice-----	88

RESUMEN

La Enfermedad de Parkinson (EP), es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la Sustancia Nigra compacta (SNc) lo que induce la aparición de una serie de alteraciones motoras características, la deficiencia de dopamina, es tratada por remplazo farmacológico con L-Dopa; sin embargo, pese a que este fármaco resulta efectivo para tratar los síntomas de la EP, tras su administración crónica se manifiestan efectos secundarios, entre los que destacan movimientos anormales involuntarios (por sus siglas en inglés AIMs) conocidos como “discinesias” (DIL). Por otro lado, existen evidencias de que la L-Dopa al autooxidarse, estimula la generación de radicales libres y considerando que entre las teorías que se han propuesto para explicar la etiología de la EP destaca el estrés oxidativo, se ha sugerido la administración de un antioxidante como la melatonina para complementar el tratamiento de esta enfermedad, por tal motivo se consideró importante comparar el efecto de la L-Dopa sola y en combinación con melatonina sobre la sobrevivencia neuronal en la SNc, la conducta motora y la severidad de las discinesias producidas por la administración del tratamiento por un periodo de 2 meses en ratas macho de la cepa wistar, lesionadas unilateralmente con 6-OHDA en el haz medial y distribuidas en 5 diferentes grupos: (I) control; (II) lesión+L-Dopa (7.5mg/kg); (III) lesión + L-Dopa + melatonina (10mg/kg) (IV) lesión + L-Dopa + melatonina esta última administrada al comenzar el segundo mes de tratamiento, y (V) lesión sin tratamiento. Durante el desarrollo del experimento las habilidades motoras de los animales fueron evaluadas mediante pruebas *ad hoc*. Los resultados indican que los animales del grupo III mostraron el mejor desempeño motor en las pruebas de viga y escalera, además de presentar menor cantidad de DIL en comparación con los grupos II, IV y V; el grupo IV, por su parte, evidenció cierta mejora motora tras la administración de melatonina tanto en las pruebas conductuales como en el desarrollo de discinesias. Pese a que entre los grupos no se observan diferencias significativas en cuanto al número de neuronas inmunopositivas a Tirosina Hidroxilasa (TH) remanentes en la SNc, se observa cierta tendencia al aumento en los grupos que recibieron melatonina en algún momento del experimento. Los resultados sugieren que la melatonina en combinación con L-Dopa puede contribuir a disminuir la severidad de las DIL y el daño motor producido por la 6-OHDA.

ABREVIACIONES

6-OHDA 6-hidroxi-dopamina

AIMs Por sus siglas en ingles

Abnormal and involuntary

movements

APO Dihidro-apomorfina o bien

Apomorfina

COMT Catecol-orto-metil-transferasa

CTE Cadena de transporte

electrónico

D₁₋₅ Receptor dopaminérgico 1 a 5

DA Dopamina

DAT Transportador de dopamina

DDC Dopa decarboxilasa

DIL Discinesias inducidas por L-

Dopa

DOPAC ácido 3,4-

dihidroxifenilacetico

DT Discinesias Tardías

EP Enfermedad de Parkinson

ERO Especies Reactivas de

Oxígeno

GABA Acido gama-aminobutirico

GB Ganglios Basales

GDNF Factor Neurotrófico Derivado

de la Glía

GP Globo pálido

GPe Globo pálido externo

GPi Globo pálido interno

GPx Glutación peroxidasa

GR Glutación reductasa

GSH Glutación

GSH-Px Glutation Peroxidasa

H₂O₂ Peróxido de hidrógeno

L-Dopa L-3,4-dioxifenilalanina

LTD Por sus siglas en ingles Long

Term Depression

LTP Por sus siglas en ingles Long

term potentiation

MAO-B Monoamino oxidasa-B

MPP⁺ 1-metil-4fenil-2,3-

dihidropiridinium

MPPP 1-methyl-4-phenyl-4-propion-

oxypiperidine

MPTP metil-fenil-tetrahidropiridona

NEM Neuronas espinosas

medianas

NO[•] Oxido nítrico

NST Núcleo subtalámico

O₂[•] anión superóxido

OH[•] radical hidroxilo

ONOO- anión peroxinitrito

ONOOH ácido peroxinitroso

PBS Buffer fosfatos salina

RL Radicales Libres

ROO[•] Radicales peroxilo

SN Sustancia Nigra

SNc Sustancia *nigra* parte

compacta

SNr Sustancia *nigra* parte

reticulada

SOD Superoxido dismutasa

TH Tirosina hidroxilasa

UPDRS Por sus siglas en ingles

Unified Parkinson's Disease Rating

Scale

INTRODUCCION

Las enfermedades neurodegenerativas son procesos crónicos y progresivos que se caracterizan por la pérdida selectiva y simétrica de neuronas en el sistema motor, sensorial y cognitivo (Grau-Veciana, 2006). En la actualidad se conocen más de 100 enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerosis múltiple, entre otras (Antigüedad, 2004). Dichas patologías han incrementado su nivel de prevalencia en el mundo en los últimos años, se ha propuesto que la tasa de incidencia aumentará del 120 al 230% en las próximas décadas (Otero-Siliceo, 1996). Las demencias y la EP destacan a causa de su alta incidencia, esta última, es la segunda más frecuente dentro de las enfermedades degenerativas del Sistema Nervioso que afecta a las personas arriba de 55 años. Actualmente, se considera que de esta enfermedad se presentan de 150 a 200 casos por cada 100,000 habitantes al año en diversas partes del mundo, afectando al 2% de la población de los países desarrollados y al 2.5% de las personas mayores a 75 años. En México, 50 de cada 100,000 habitantes pueden padecerla, este índice podría aumentar en las próximas décadas a raíz del incremento de la esperanza de vida (Otero Siliceo, 1996; Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, 2008). Sin embargo, los datos obtenidos seguramente no son concluyentes ya que en las áreas rurales se tiene poco acceso a los centros de salud (Góngora-Alfaro *et al.*, 2005).

Antecedentes

La EP es una condición conocida desde tiempos muy antiguos; de modo que, en la antigua india hace aproximadamente 4500 años se describió en el sistema médico hindú "Ayurveda" con el nombre de *kampavata*, de *kampa*, que significa agitación y *vata* que describe la falta de movimiento muscular. En la literatura médica occidental Galeno la describió como "parálisis agitante" en el año 175 D.C. (Sharma, 2008); Leonardo Da Vinci describe esta patología, fascinado por la estructura y funcionamiento del cuerpo humano, advirtió que algunas personas experimentaban simultáneamente movimientos anormales involuntarios y dificultad en realizar acciones volitivas, relataba "aparece claramente en paralíticos cuyos miembros se mueven sin consentimiento de la

voluntad y esta voluntad, con todo su poder, no puede impedir que las extremidades tiemblen” (Tagle, 2005). La primera descripción moderna de este padecimiento la realizó el médico geólogo inglés James Parkinson en 1817 en su publicación *“Essay on the shaking palsy”* basado en la observación de seis casos clínicos para definir a la enfermedad de la siguiente manera: “movimientos involuntarios con disminución de la fuerza muscular en segmentos inmóviles, con tendencia a la inclinación del tronco hacia adelante, así como la marcha acelerada, sin alteración intelectual ni de los órganos de los sentidos” (Otero-Siliceo, 1996).

La descripción hecha por James Parkinson motivó a otros investigadores a profundizar en el estudio de la EP, de esta manera Charcot en 1880 afirmó que este padecimiento era el quinto más frecuente en pacientes con edades mayores de 40 a 50 años; Gowers en 1888, en una revisión de 80 pacientes informó que la edad de aparición de la enfermedad era posterior a los 40 años de edad y aseguró que los 52 años era la edad exacta del comienzo independientemente del sexo (Hoehn y Yahr, 1987). Purves Steward en 1898 observó que el inicio de la enfermedad podía incluso oscilar entre los 22 a los 71 años; a causa del rango tan amplio de edades la EP se clasifica como juvenil cuando la edad de inicio es igual ó inferior a los 20 años, de inicio temprano cuando la edad oscila entre los 21 y los 40 y finalmente, tardía con 70 o más años (Alanis, 1996).

En Agosto de 1957, Kathleen Montagu reportó la presencia de dopamina (DA) en el cerebro de varias especies animales, incluido el cerebro humano; en noviembre de 1957, Hans Weil-Malherbe, confirmó esta observación y examinó la distribución intracelular de DA en el tallo cerebral de conejo; sin embargo ninguno de los investigadores mencionados explicó el papel fisiológico de la dopamina (Hornykiewicz, 2006). En la década de 1960, Hornykiewicz analizó cerebros de pacientes con EP y encontró reducción significativa de DA, serotonina y noradrenalina principalmente en el cuerpo estriado y en la Sustancia Nigra parte compacta (SNc), puntualizando que de las tres aminas biogénicas la que más se reducía era la DA. Posteriormente se demostró que las neuronas que estaban degenerando principalmente eran las neuronas

dopaminérgicas de la SNc, con pérdida moderada de la porción dorsal de la misma (Yurek y Sladek, 1990; Gibb y Less, 1991).

Neuropatología

La EP se caracteriza anatomopatológicamente por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNc, y la presencia de inclusiones eosinófilas intracitoplasmáticas, denominadas cuerpos de Lewy (Otero-Siliceo, 1966) que se encuentran formadas principalmente por una proteína llamada α -sinucleína (Bertarbet *et al.*, 2002). Pese a que aún no es muy claro el papel fisiológico de estas inclusiones, se ha propuesto que son importantes en la regulación y reciclamiento de las vesículas sinápticas, principalmente en el almacenamiento de DA (Moore *et al.*, 2005). Se ha reportado además que la α -sinucleína regula negativamente la actividad de la TH, manteniendo a la proteína en un estado inactivo no fosforilado, modulando de esta manera la biosíntesis de DA en neuronas catecolaminérgicas; asimismo regula la concentración del transportador de dopamina (DAT) en la membrana plasmática. Por otro lado, existen pruebas que revelan que la acumulación anormal de α -sinucleína puede estar asociada con la pérdida neuronal y/o degeneración. De esta manera, algunos modelos experimentales proponen que la α -sinucleína podría ser una de las principales especies tóxicas en la EP (Corti *et al.*, 2005).

Entre las neuropatologías se han observado además, alteraciones ultraestructurales en el núcleo estriado de pacientes con EP, en el cual, las dendritas de las neuronas están hinchadas y se presenta reducción en el número de espinas dendríticas (McNeil *et al.*, 1998), aumento en el tamaño de los botones sinápticos, mitocondrias hinchadas y cambios en el tipo de contactos sinápticos (Avila-Costa *et al.*, 1998), además de proliferación astrocítica, degeneración axónica y neuritas hiperdensas (Machado *et al.*, 1990).

Características Clínicas

Dentro de la variedad de síntomas que se manifiestan en pacientes con EP, destacan las alteraciones en el desempeño motor. Los defectos en la función motora se deben a la baja concentración de DA en el núcleo estriado, inducida por la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Maharaj, 2005); se estima que el 50% de estas neuronas, aunado al 80% de dopamina estriatal, deben perderse antes de la aparición de los síntomas motores (Limin, 2009). Diversos estudios han mostrado que existe una pérdida continua de las neuronas dopaminérgicas durante el envejecimiento normal, así como en la EP (Arias-Carrión, 2008).

Este desorden del movimiento está caracterizado por la combinación de cualquiera de las siguientes características motoras: bradicinecia (lentitud del movimiento), temblor en reposo (de 4 a 5 hertzios por segundo), rigidez (rostro inexpresivo y aumento en el tono muscular de forma anormal). También destaca la marcha festinante (arrastre de los pies) así como la postura flexionada con equilibrio inestable y existe además un fenómeno de no movimiento (cuando los pies están transitoriamente pegados al suelo). No todas las características necesitan estar presentes, pero si al menos dos deben exhibirse para la elaboración del diagnóstico (Alanis, 1996; Nass y Przedborsky, 2008). Al inicio de la enfermedad, los síntomas son confinados a una parte del cuerpo mientras el otro lado está bien preservado; más tarde, con el curso progresivo de la enfermedad, el cuerpo entero es afectado y las deficiencias neurológicas persisten (Adler y Ahlskog, 2000).

Si bien las alteraciones motoras dominan el cuadro clínico, e incluso definen el síndrome parkinsonico, la mayoría de los pacientes con EP refieren además trastornos psicológicos, que pueden ser aun mas incapacitantes que los motores, los cuales, se encuentran ligados a los medicamentos o a la misma enfermedad; tales como depresión, ansiedad, ataques de pánico y desordenes del sueño (sueño fragmentado y desordenes en el comportamiento del sueño en la etapa REM, pesadillas y somnolencia diurna entre otros). La demencia, es

una característica asociada con la edad y se sabe que se presenta en más del 70% de los pacientes con EP (Adler y Ahlskog 2000; Nass y Przedborsky, 2008).

Etiología

Aun cuando existen mutaciones en genes específicos como la α -sinucleína, DJ-1, PINK 1 o LRR K2 (Polymeropoulos, 1997); la EP es predominantemente de carácter idiopático, puesto que su etiología es desconocida y probablemente multifactorial. De este modo, pueden estar implicados factores genéticos, ambientales, defectos mitocondriales, envejecimiento cerebral acelerado y daño oxidativo entre otros (Colín-Barenque y Fortoul, 2007).

Factores genéticos

La etiología de la EP ha sido discutida desde que Gowers sugirió en 1888 que era puntualmente genética. Actualmente se sabe que los factores genéticos representan sólo una pequeña muestra del Parkinson típico, puesto que se ha estimado que solo entre el 5% y el 10% de los casos de EP son de carácter genético (Samadi *et al.*, 2006). Por otra parte, se han descrito al menos 10 loci relacionados con la EP hereditaria de los cuales solo 5 genes con mutación han sido identificados (Le y Appel, 2004; Paisan *et al.*, 2005).

Factores ambientales

Diversos estudios epidemiológicos han mostrado que existe un vínculo entre los factores ambientales y la EP; por tal motivo, se ha sugerido la relación entre la industrialización y el uso de agroquímicos como factores que inciden en la etiología de la EP, entre los químicos se encuentran el paraquat (herbicida) y la rotenona (plaguicida) (Bertarbet *et al.*, 2002). Otros factores ambientales asociados con el riesgo de desarrollar EP incluyen la vida rural, beber agua de pozo y la agricultura, por la exposición a pesticidas y herbicidas; así como la exposición a resinas epóxicas y metales pesados como el manganeso (Lai *et al.*, 2002; Ordoñez-Librado *et al.*, 2010).

Estrés Oxidativo

El oxígeno es un componente necesario para la vida, tanto en su papel como último aceptor de electrones para hacer posible la síntesis de ATP, como en la formación de diversos compuestos en procesos metabólicos celulares los cuales son realizados mediante una serie de reacciones de oxidación-reducción que, paradójicamente, conllevan a la generación de productos conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO) y radicales libres (RL), los cuales son altamente citotóxicos (Andersen, 2004; Gutierrez, 2007). Sin embargo el organismo desarrolla mecanismos de defensa antioxidante para contrarrestar la acción tóxica de las ERO y los RL. Estos mecanismos se constituyen por sistemas enzimáticos y moléculas de bajo peso molecular tales como glutatión (GSH), glutatión peroxidasa (GSH-Px), superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) entre otros, los cuales ayudan en la prevención y/o eliminación de ERO y RL (Storz and Imlay 1999; Betarbet *et al.*, 2002). Cuando el balance entre eventos oxidativos y sistemas antioxidantes se altera, la célula entra en un estado llamado “estrés oxidativo”, se generan daños por peroxidación lipídica, protéica, y daño en el ADN; de esta manera es bien sabido que las ERO participan en procesos que dirigen al cáncer, diabetes, daños gástricos y pulmonares así como en EN (Colín-Barenque y Fortoul, 2007).

El cerebro es especialmente vulnerable a los procesos oxidativos; específicamente las membranas celulares, puesto que los RL reaccionan con el doble enlace de los lípidos insaturados como el ácido linoléico y araquidónico, generando así peroxiradicales, de modo que se inicia una reacción en cadena que genera metabolitos como HNE (4-Hidroxinonenal), acroleína, malondialdehído, y F2 isoprostanes, los cuales se encuentran en altas concentraciones en cerebros de pacientes con EP (Gonzales-Fraguela, 1999; Barnham *et al.*, 2004; Yap-Yan *et al.*, 2007). Así, la generación de RL origina pérdida de fluidez membranal, reducción del potencial de membrana y aumento en la permeabilidad de los iones de Ca^{2+} (Ferrer *et al.*, 1999; Leist *et al.*, 1999), generando una respuesta excitotóxica, es decir activación de receptores

glutamatérgicos que desencadenan una cascada de eventos que provoca la muerte neuronal (Barnham *et al.*, 2004; Savit *et al.*, 2006). Además se ha reportado que el cerebro humano, contiene niveles bajos de enzimas antioxidantes y de otros antioxidantes no enzimáticos, y en ciertas áreas como los ganglios basales (GB) existen además grandes cantidades de Fe^{++} y otros metales de transición que constituyen factores importantes en la generación de ERO (Gonzales-Fraguela, 1999; Yap-Yan *et al.*, 2007). Estudios post-mortem en cerebros de pacientes con EP, muestran que las neuronas dopaminérgicas de la SNc son particularmente vulnerables al estrés oxidativo; dichos estudios indican que existe aumento de peroxidación lipídica, y agregación protéica en esta área cerebral (Dexter *et al.*, 1989^b; Shastry, 2003). Además, Perry y Yong en 1986, observaron niveles reducidos de GSH-Px, y se ha reportado incremento en los niveles de Fe^{++} , el cual funciona como catalizador en la reacción de Fenton y por tanto promueve la generación de RL (Dexter *et al.*, 1989^a), lo que probablemente resulta en estrés oxidativo crónico provocando la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, sin embargo, aun no queda claro por qué estas células poseen tal vulnerabilidad; es posible que la causa del deterioro de estas neuronas se relacione al alto estado oxidativo asociado con el metabolismo de la DA (Hattori *et al.*, 2009), durante el cual la DA se auto-oxida fácilmente en especies tóxicas como quinonas, radical superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2). Por otro lado durante la degradación de la DA a través de la monoamino oxidasa-B (MAO-B) se forma DOPAC (ácido 3,4-dihidroxifenilacetico) y H_2O_2 ; este último, puede ser fácilmente reducido en presencia de Fe^{2+} y, mediante la reacción de Fenton, formar el radical hidroxilo (OH^\bullet), el cual se considera el radical más nocivo en el proceso de estrés oxidativo.

De esta forma la teoría de los radicales libres en el envejecimiento propuesta por Gerschman y Harman en 1954 es la más estudiada en cuanto a la etiología de la EP (Gonzales-Fraguela, 1999). Sin embargo, aun no es posible explicar de manera clara la cascada de eventos responsables de dicha enfermedad (Gutierrez, 2007).

Disfunción mitocondrial

Se ha reportado que la disfunción mitocondrial es un mecanismo común en la patología de diversas enfermedades neurodegenerativas incluyendo la EP; pues se ha observado disminución significativa en la actividad del complejo I mitocondrial (NADH-ubiquitina-reductasa) y IV (citocromo oxidasa C) de la cadena respiratoria en personas que padecen EP (Parker *et al.*, 1989; Schapira *et al.*, 1989; Dawson y Dawson, 2003). Estudios recientes sobre la expresión génica de neuronas de la SN de pacientes con EP permitieron detectar daño en el transporte mitocondrial de electrones y en la utilización de glucosa (Zheng *et al.*, 2010), además se considera que el decremento de la actividad energética suscita incremento en la cantidad de ERO, provocando que las neuronas sean más susceptibles a la excitotoxicidad por glutamato, lo que conlleva a la generación de mayor muerte neuronal (Henze *et al.*, 2005). Además, la respiración mitocondrial, es capaz de producir daño oxidativo en ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos y proteínas, además de generar radicales libres, de este modo la disfunción mitocondrial conjuntamente con el estrés oxidativo se consideran como los principales promotores de la pérdida neuronal (Trushina Y McMurray, 2007).

Las estructuras cerebrales que se ven afectadas en la EP son un grupo de núcleos relacionados entre sí tanto anatómica como funcionalmente, los cuales se denominan Ganglios Basales y se describen a continuación.

Ganglios basales

Los ganglios basales (GB) se han estudiado desde que se iniciaron los estudios de neuroanatomía. En tiempos de los antiguos filósofos griegos estas estructuras han sido descritas, por lo que tuvieron diferentes nombres según su forma o lo que se creía su función (Gersenowies, 2000); de esta manera muchos autores como Aristóteles, Vieussens, Vesalio, Varolio, Meinert entre otros observaron tales estructuras (ya sea de forma individual o como parte de

otras); por ejemplo, Galeno utilizó el término “glúteos” para referirse a masas celulares que sobresalían hacia los ventrículos laterales. No fue hasta 1876 que el término de ganglios basales se introdujo por primera vez en inglés por David Ferrier, como una adaptación del término alemán “Stammganglion” dado por Forel en 1872 (Di Giovanni *et al.*, 2007) y seguramente hasta ese momento no era posible imaginar la importancia de este conjunto de núcleos neuronales.

Los GB participan en diversas funciones, aunque principalmente se asocian a movimientos voluntarios realizados inconscientemente; es decir, de manera automática; de forma que es posible realizar diferentes movimientos sin estar pensando en el modo de ejecución, así, por ejemplo, es posible salir a correr y seguir una ruta determinada, mientras escuchamos música y a la vez pensamos en algún suceso que tuvo lugar en el transcurso del día, o conducir un automóvil y al mismo tiempo conversar plácidamente con el copiloto, a esto es a lo que se le llama “memoria procedimental” o “memoria no declarativa”. Evidentemente alguna vez cada uno de los movimientos regulados por los Ganglios Basales fueron realizados de manera consciente; ese momento fue aquel en que se aprendió a realizar dicha labor, de este modo es como aprendimos a caminar, andar en bicicleta, conducir un automóvil, comer con cubiertos etc., el automatizar el movimiento significa por tanto un importante ahorro de memoria de trabajo al no tenerle siempre en la consciencia (Deus *et al.*, 1996). Sin embargo, estas estructuras, no solamente se limitan a aspectos sensoriales de programación de movimientos si no que también se encuentran relacionados con aspectos de planeación, selección de movimientos y memoria motora (Gutiérrez, 2007).

Al contrario de la mayoría de los demás componentes del sistema motor los GB no tienen conexiones directas de entrada y de salida con la medula espinal ya que reciben su formación primaria vía la corteza cerebral y envían sus señales al tronco encefálico, donde, a través del tálamo de nuevo viaja a la corteza prefrontal premotora y motora; por lo que las funciones motoras de los GB están mediadas en gran parte por áreas motoras de la corteza frontal (Kandell, 2000). Así pues, existen evidencias que sugieren al menos 5 circuitos

ganglios basales-talamocorticales que están organizados en paralelo y a la vez siguen siendo segregados de los otros, tanto estructural como funcionalmente; estos circuitos son: motor, óculomotor, prefrontal, orbitofrontal lateral y límbico (Alexander y Crutcher, 1990).

Anatomía de los Ganglios Basales

Anatómicamente, los ganglios basales son las estructuras subcorticales más grandes del cerebro humano (Per, 2004) en las cuales se han realizado numerosos y rápidos avances para el entendimiento de la estructura, la organización interna, la conectividad y la función de los ganglios basales (Afifi *et al.*, 1999) Desde el punto de vista clínico y funcional este grupo de núcleos está integrado de la siguiente manera (Figura 1):

- ✓ *Cuerpo Estriado*: En primates está dividido por la cápsula interna en una región dorsomedial (núcleo caudado) y en una región ventro medial (putamen); se le denomina “estriado” porque los fascículos axónicos que pasan a través del caudado y el putamen le dan una apariencia rayada cuando se corta transversalmente; esto es lo que da origen a los llamados parches (estriosomas) y a la matriz (Porves, 2001). Además de ser el núcleo más grande de los GB, el estriado es un componente importante dentro de los mismos, pues al recibir proyecciones de la corteza, del tálamo y de estructuras del tronco encefálico se le considera como el núcleo de entrada (Porves, 2001; Hadj-Bouziane, 2003). Tanto el caudado como el putamen se desarrollan de la misma estructura telencefálica por lo que se componen de los mismos tipos celulares; están constituidos en un 95% por Neuronas Espinosas Medianas (NEM), las cuales son consideradas como las neuronas de proyección del estriado y utilizan ácido gama-aminobutírico (GABA) como neurotransmisor, que es inhibitorio por excelencia; además de GABA, estas neuronas, también expresan taurina y numerosos neuropéptidos como sustancia P, encefalinas, neurotensinas, dinorfinas y colecistocinina. El 5% de la población neuronal restante está integrado por interneuronas (Kawaguchi *et al.*, 1995; Afifi *et al.*, 1999; Kandell,

2000), de las cuales se conocen dos grupos principales, interneuronas colinérgicas e interneuronas GABAérgicas, estas últimas se caracterizan además, por la coexpresión de sustancias como parvalbumina, calretinina o somatostatina. Las interneuronas intraestriatales responden a estímulos visuales y auditivos condicionados (Aosaki *et al.*, 1995) y actúan en el control del movimiento, o bien en su supresión (Ravel *et al.*, 2006; Apicella, 2007).

- ✓ *Globo pálido (GP)*: Al igual que el estriado es una estructura compuesta por dos segmentos, el globo pálido externo (GPe) que tiene una posición más lateral mientras que al núcleo con la posición medial se denomina globo pálido interno (GPi), esta estructura se conoce como núcleo entopeduncular en mamíferos inferiores. En humanos, el globo pálido externo constituye el 70% del volumen total del globo pálido. Estas estructuras presentan varios tipos neuronales pero todas las células que las conforman son GABAérgicas (Hadj-Bouziane, 2003; Gutiérrez, 2007; Utter, 2008).
- ✓ *Núcleo subtalámico (NST)*: Debe su nombre a su posición por debajo del tálamo, está localizado en la región ventral del diencefalo en la unión del mesencefalo. Se constituye principalmente por neuronas Golgi tipo I, y posee pocas interneuronas (Rafols y Fox, 1976). Las proyecciones del NST son las únicas con actividad excitatoria dentro del circuito de los GB, pues las neuronas de proyección que lo conforman liberan ácido glutámico, que es el principal neurotransmisor excitador en el Sistema Nervioso Central (SNC). Desde un punto de vista anatómico el NST puede considerarse también como núcleo de entrada pues recibe aferencias directamente desde la corteza. La función que este núcleo desempeña, fuera del papel que juega en la vía indirecta de los GB, aun no se tiene claro (Hadj-Bouziane, 2003; Ordoñez, 2007; Utter A., 2008).
- ✓ *Sustancia Nigra (SN)*: Se ubica en el segmento ventral del mesencefalo y presenta dos porciones, una dorsal pigmentada compuesta principalmente por neuronas dopaminérgicas cuyos cuerpos, en primates,

contienen neuromelanina, un pigmento oscuro que se piensa es un polímero de la dopamina o de alguno de sus metabolitos, y que es lo que brinda a la SNc compacta su nombre, así, el grado de pigmentación se correlaciona con los niveles de dopamina, pero la función de dicho pigmento es desconocida. Las neuronas que pertenecen a la SNc aun cuando proyectan prácticamente a todos los núcleos que conforman los GB proyectan principalmente al estriado, y recibe aferencias del mismo (Gauthier *et al.*, 1999). La parte ventral que compone a la SN se denomina Sustancia Nigra reticulada (SNr) y se conforma por neuronas GABAérgicas que proyectan directamente hacia el tálamo; por este motivo la SNr en conjunto con el GPi son considerados como los núcleos de salida de los GB (Hadj-Bouziane, 2003; Gutiérrez, 2007; Ordoñez, 2007; Utter, 2008) (Figura 1).

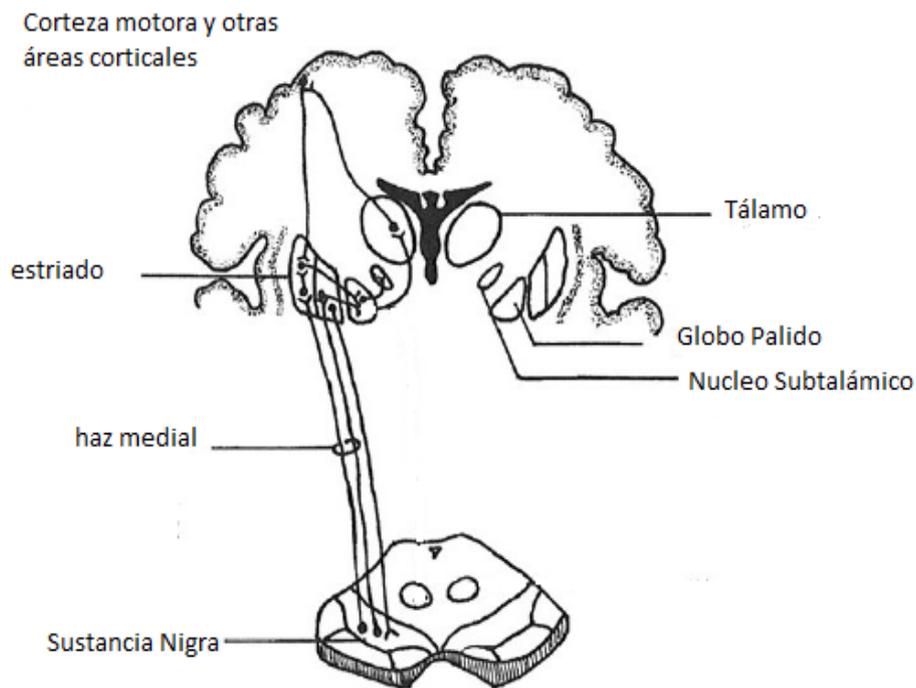


Fig. 1 Organización anatómica y principales conexiones de los ganglios basales; tomado de Lee *et al.*, 1995.

Organización Funcional

El primer modelo funcional de la arquitectura de los ganglios basales fue desarrollado a finales de la década de 1980; y se basa en la existencia de dos

vías estriatales con efectos antagonistas; la activación de una vía directa que facilita la ejecución de movimientos y una vía indirecta que se encarga de la inhibición del movimiento (García-Muñoz *et al.*, 2010). Las neuronas en la vía directa, las cuales expresan principalmente receptores para dopamina D1 y co-expresan neuropéptidos como sustancia P y dinorfinas, proyectan desde el putamen hacia los núcleos de salida (GPi y SNr) a quienes proveen de una inhibición directa. En cambio, las neuronas estriatales de la vía indirecta, que predominantemente contienen receptores de dopamina del subtipo D2 y el péptido encefalina, no conectan directamente el putamen con los núcleos de salida, si no que emplean conexiones sinápticas sucesivas con el GPe y el NST (Gerfen, 1992). Las conexiones que van desde el putamen hacia el GPe y de éste al NST son GABAérgicas y por tanto inhibitorias; en cambio, por otro lado las neuronas del NST utilizan Glutamato como neurotransmisor y por ende activarán a las neuronas del GPi/SNr. De esta manera, la estimulación de las neuronas de la vía indirecta conduce a la inhibición del GPe, la desinhibición del NST y la consecuente activación de los núcleos de salida (Obeso *et al.*, 2000^b). Bajo condiciones normales la actividad de la vía directa incrementa la comunicación de las eferencias de los GB hacia las neuronas tálamo-corticales, las cuales a su vez, modulan la actividad motora de las áreas precentrales (Wichmann y DeLong, 1993). La influencia de la inhibición tónica de las eferencias de los GB sobre la actividad de las neuronas tálamo-corticales, ayudará a suprimir el movimiento, mientras que la reducción fásica de las eferencias de los GB permitirá la actividad motora voluntaria (Ordoñez, 2007).

El modelo propone además, que la DA modula los efectos glutamatérgicos de las entradas corticales mediante una actividad dual en las neuronas estriatales; excitando mediante los receptores D1 expresados por las neuronas de la vía directa e inhibiendo por medio de los receptores D2 que expresan las neuronas de la vía indirecta (Obeso *et al.*, 2000^b).

Funcionalmente la DA ejerce sus efectos sobre la actividad motora a través de 7 subtipos de receptores genéticamente diferentes, acoplados a proteínas G distribuidos en 2 familias: familia D1 (D1 y D5) Y D2 (D3, D4, D1C Y D1D)

(Gutiérrez, 2007). La diferencia entre familias está determinada por el efecto de los receptores sobre la enzima adenilato-ciclasa, que forma parte de la familia de los segundos mensajeros y se encarga de aumentar los niveles intracelulares del adenosín monofosfato cíclico (AMPc), compuesto que activa los sistemas enzimáticos ligados más directamente a efectos biológicos. De este manera, los receptores D1 estimulan la formación de AMPc como principal mecanismo de transducción de señales, mientras que, los subtipos pertenecientes a la familia D2 inhiben la formación de AMPc activan la entrada de K^+ y reducen la entrada de iones de Ca^{2+} a través de canales dependientes del voltaje, efectos mediados también por proteínas G (Bahena-Trujillo *et al.*, 2000). Como ya se señaló en el circuito de los ganglios basales, los receptores D2 se han encontrado preferentemente en las neuronas que proyectan al GPe (vía indirecta) y los receptores D1 en las que se dirigen al Gpi (vía directa) (Gerfen, 1992).

Alteraciones de los Ganglios Basales

El mal funcionamiento de los ganglios basales está asociado a diversas enfermedades, algunos de estos trastornos se manifiestan exclusivamente como desórdenes motores mientras que otros además presentan desórdenes cognitivos (Utter, 2008). Inicialmente estos desórdenes motores se clasificaron en base a su aspecto clínico sin considerar las características o los mecanismos patofisiológicos que pudiesen tener en común; un esquema mas sistemático basado en datos clínicos y farmacológicos arroja 3 categorías:

- a) Hipercinesia: Caracterizada por movimientos incontrolables y relativamente rápidos, este tipo de movimientos son suprimidos por antagonistas de los receptores D2 de dopamina, son exacerbados por agonistas dopaminérgicos y responden a medicamentos colinérgicos. El trastorno más común que describe este tipo de movimientos es la Corea.
- b) Disonía: Se describe como la generación espontánea de posturas fijas durante algunos segundos o minutos; puede afectar a los músculos branquiales, axiales, e incluso a las extremidades. La distonía

generalizada se produce con frecuencia como un trastorno idiopático/hereditario; este desorden también se ha observado en algunos casos de parálisis cerebral

- c) Hipocinesia: En el cual se presentan acinesia temblor y rigidez; por lo tanto, la enfermedad de Parkinson es el mejor prototipo para describir este desorden del movimiento; el cuadro clínico resulta de los defectos en la neurotransmisión dopaminérgica nigroestriatal (Albin, 1989).

Un estado parkinsoniano, puede ser generado entonces por la reducción de la entrada dopaminérgica de la SNc hacia el estriado, de manera que se produce la sobreactivación de las neuronas de la vía indirecta; incremento de la densidad de los receptores D2 y la inhibición de aquellas neuronas que pertenecen a la vía directa aunado a la disminución de la cantidad de receptores D1; así pues, la depleción dopaminérgica genera complejas alteraciones en el circuito de los GB. Al sobre inhibir las neuronas estriatales que proyectan hacia el GPe se desinhibe al NST, las cuales proporcionan una sobreactivación de la salida inhibitoria en las neuronas del GPi y la SNr; de manera paralela, al disminuir la activación de la vía directa, disminuye la influencia inhibitoria en los núcleos de salida (Redgrave, 2010). El resultado será entonces la activación excesiva de los núcleos de salida de los ganglios basales, que producirá una fuerte inhibición del sistema motor, lo que conduce a las características motoras que se presentan en la EP (Obeso *et al.*, 2000^b) (Figura 2b).

El resultado opuesto al parkinsonismo (inhibición, en lugar de excitación), se observa en padecimientos como la corea y el balismo, los cuales provienen de actividad reducida en el NST y los núcleos de salida. Esto puede ser resultado, por ejemplo, de una lesión en el putamen que decrementa la inhibición del GPe y la consecuente sobre inhibición del NST, quien reducirá su actividad excitatoria, lo que hipoactivará al GPi y a la SNr; el decremento de la actividad de los núcleos de salida de los ganglios basales, reduce el efecto inhibitorio de las neuronas cortico-talámicas, acompañadas por la excesiva actividad de las aéreas motoras de la corteza y la aparición de discinesias (de las cuales se hablara más adelante) (Figura 2c).

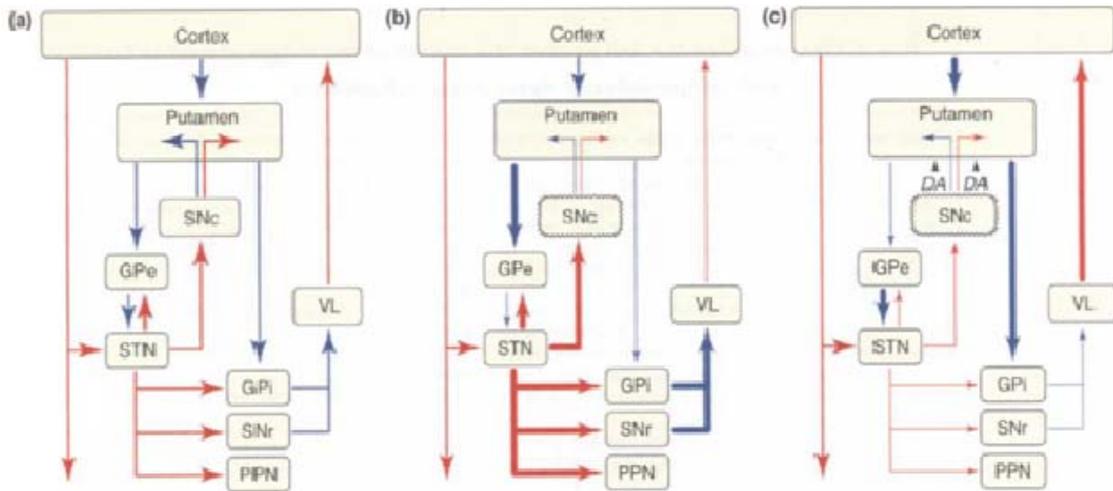


Fig.2 Modelo clásico de los ganglios basales: (a) estado normal (b) estado Parkinsoniano (c) estado discinéptico, las líneas azules representan proyecciones inhibitorias mientras que las rojas representan las excitatorias. Tomado de Obeso *et al.*, 2000^b.

Modelos experimentales de la EP

Se han desarrollado diversos modelos animales que tienen como objetivo recrear lo más cercanamente posible los eventos clínicos, conductuales, moleculares, citopatológicos, fisiológicos y/o genéticos que se presentan durante el desarrollo de la EP para investigar e incluso probar así nuevas estrategias terapéuticas que mejoren la calidad de vida de los pacientes que padecen dicha enfermedad. Sin embargo, la utilidad de cada modelo depende del objetivo de la investigación y ninguno puede reproducir todas las manifestaciones patológicas de la EP puesto que la variedad de factores que intervienen en ella no se conoce en su totalidad (García-Ruíz, 2008).

Para imitar la deficiencia dopaminérgica observada en los pacientes con EP, se han empleado diversos agentes farmacológicos en una amplia variedad de especies animales para interrumpir la vía dopaminérgica nigroestriatal (Bertarbet *et al.*, 2002). Este tipo de modelos, permiten definir la naturaleza anatómica, ultraestructural, fisiológica, bioquímica y conductual de la enfermedad, además, las alteraciones dopaminérgicas que estos producen, pueden ser evaluadas de diferentes formas, ya sea mediante la cuantificación de la reducción de las neuronas de la SNc, midiendo la actividad de la tirosina hidroxilasa (TH- que es

la enzima limitante en la síntesis de catecolaminas), midiendo la cantidad de DA remanente en el estriado, entre otras (Alexi *et al.*, 2000); por tal motivo, las primeras sustancias químicas empleadas para estudiar esta patología fueron toxinas que dañan el sistema catecolaminérgico (Ungersted, 1968), a partir de entonces, se han desarrollado diversas técnicas en la búsqueda del modelo óptimo para el estudio de la EP.

Modelos con metil-fenil-tetrahidropiridona (MPTP)

En 1982, unos jóvenes adictos de California inadvertidamente se inyectaron MPTP, el cual fue producido ilícitamente a partir de la síntesis de 1-methyl-4-phenyl-4-propion-oxypiperidine (MPPP) y un análogo de un narcótico llamado meperidina (Langston *et al.*, 1983); la inyección trajo como resultado síntomas clínicos muy parecidos a los presentados por pacientes con EP (Langston *et al.*, 1999; Przedborski y Vila, 2003); incluyendo el temblor, rigidez, enlentecimiento de los movimientos, inestabilidad postural y congelamiento (freezing) (Dauer y Przedborski, 2003). En monos se ha observado además, degeneración de las neuronas DA y agregación de la α -sinucleína (pero no los típicos cuerpos de Lewy), además de respuesta positiva al tratamiento con L-Dopa.

Al ser un compuesto altamente lipofílico, el MPTP es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, posteriormente es metabolizado por la MAO-B en los astrocitos como un metabolito activo, surgiendo el ion 1-metil-4fenil-2,3-dihidropiridinium o MPP^+ el cual es afín al transportador de DA de alta afinidad (DAT), (Betarbet, 2002; Nass y Przedborsky, 2008) y al ser introducido por el transportador afecta de manera selectiva a las células dopaminérgicas. Se cree que la toxicidad del MPP^+ es resultado de la inhibición del complejo I de la CTE (cadena del transporte de electrones), y que actúa reduciendo la formación de ATP y propiciando la generación de ERO lo que produce muerte celular por apoptosis (Shimohama *et al.*, 2003).

Modelo de la 6-OHDA

En 1968 Ungerstedt propuso por primera vez el empleo de la 6-hidroxidopamina (2,4,5-trihidroxifenetilamina, 2,5-dihidroxitiramina o bien 6-OHDA) como un posible modelo para estudiar su efecto sobre las neuronas dopaminérgicas y norepinefrinérgicas en el SNC desde entonces este compuesto ha sido utilizado tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*. La 6-OHDA es un análogo hidroxilado de DA que puede inducir depleción selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc y sus terminales en el estriado (Blum *et al.*, 1980).

Debido a que la 6-OHDA es incapaz de cruzar la barrera hematoencefálica, debe ser inyectada directamente en el cerebro vía estereotáxica, ya sea en la SN, en el haz medial, o en el núcleo estriado de manera bilateral o unilateral; la elección de un sitio u otro depende del objetivo del experimento a realizar (Dauer y Przedborski, 2003). Cuando la inyección de esta toxina es en la SN o en el haz medial la degeneración neuronal inicia 24 horas después y la DA estriatal es depletada 2 o 3 días después (Jeon *et al.*, 1995); es importante considerar que la magnitud del daño dependerá del sitio de lesión, la dosis administrada, el tiempo de sobrevivencia post-lesión y las diferencias entre especies. Por otro lado, cuando la inyección es en el estriado, la 6-OHDA promueve la lenta degeneración retrógrada de las neuronas del sistema nigroestriatal; este proceso puede transcurrir durante semanas, por tal motivo la lesión estriatal con 6-OHDA es comúnmente utilizado para imitar la lenta progresión de la EP (Przedborski *et al.*, 1995; Beal, 2001; Deumens *et al.*, 2002).

Esta neurotoxina es incorporada a las neuronas por el DAT, y una vez dentro de ellas, actúa inhibiendo el complejo I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial, reduciendo la generación de ATP (Glinka *et al.*, 1998; Lotharius *et al.*, 1999). Aunado a esto, la toxina es fácilmente oxidable por el oxígeno molecular promoviendo la creación de RL, ERO, O₂⁻, OH[•] y productos de oxidación de quinonas (León, 1996; Meredith *et al.*, 2008) además, existen

evidencias de que la 6-OHDA promueve la reducción de la GSH y de la SOD en el estriado, induciendo subsecuentemente la degeneración de las terminales axónicas y de los cuerpos celulares (Perumal *et al.*, 1992; Otero-Siliceo, 1996).

Usualmente la 6-hidroxidopamina es administrada unilateralmente, de manera que el hemisferio que no recibió la inyección funciona como control interno (Ungerstedt, 1968; Meredith *et al.*, 2008) y permite además evaluar el daño generado por la lesión al promover el giro, pues al lesionar la vía nigroestriatal de un solo lado, se produce un desbalance de DA entre ambos hemisferios, el cual, se traduce como asimetría motora (conducta de giro), exacerbada tras la administración de algún agonista dopaminérgico ya sea por agonistas directos (apomorfina) o indirectos (anfetaminas). Los primeros producen rotación contralateral por la activación de los receptores dopaminérgicos hipersensibles en el estriado lesionado, en este caso, la conducta de giro se presenta solo si se han perdido más del 90% de las neuronas dopaminérgicas. Por otro lado, los agonistas indirectos, causan giro ipsilateral por la activación de las terminales nigroestriatales del lado no lesionado. Este comportamiento, puede iniciarse incluso con tan solo un 50% de pérdida de neuronas dopaminérgicas (Ungerstedt, 1976; Hefti *et al.*, 1980; Deumens *et al.*, 2002).

De este modo, los modelos en los que solo se lesiona un hemisferio cerebral son más eficaces para la detección de anomalías motoras que la lesión bilateral, además de que la enfermedad a menudo comienza con un trastorno unilateral que progresa a un síndrome bilateral; así, este modelo puede recrear los primeros signos motores de la enfermedad (Ungerstedt, 1968; Meredith *et al.*, 2008). Además de que los animales lesionados bilateralmente necesitan de cuidados intensivos debido a que presentan una marcada adipsia y afagia que puede conducirlos fácilmente a la muerte (Ungerstedt, 1971).

Pese a estas limitaciones el modelo de lesión con 6-OHDA ha sido utilizado para evaluar la eficacia de diversas sustancias antiparkinsonicas, se ha utilizado además para evaluar la funcionalidad de los trasplantes celulares y en la

evaluación de factores neurotróficos, componentes que promueven la sobrevivencia o la degeneración de neuronas dopaminérgicas etc., finalmente, se ha descrito su uso en diversas especies animales como por ejemplo: ratones, perros, gatos, monos y ratas (Dunnet *et al.*, 1981; Beal, 2001).

Terapias

El tratamiento adecuado para tratar la EP sigue siendo un problema latente, pues, a pesar los avances que ha tenido el conocimiento con respecto a las bases neuroquímicas y anatomofuncionales de la EP, hasta el momento ningún tratamiento ha demostrado de forma fehaciente la capacidad de modificar el progreso de la enfermedad (Mínguez-Castellanos *et al.*, 2005).

Las modalidades de procedimientos actuales para tratar a los pacientes con Parkinson se dividen en 5 categorías principales:

- La Fisioterapia: en la cual se capacita a los pacientes con EP para mantener su nivel máximo de movilidad mediante ejercicios de rehabilitación, que junto con la educación y el apoyo adecuados, procuran aumentar al máximo la capacidad funcional, reducir las complicaciones secundarias y mejorar la calidad de vida durante toda la evolución de la enfermedad (Deane, 2008).
- Terapia ocupacional: permite al paciente continuar con sus actividades de cuidado personal, laborales y recreativas durante el mayor tiempo posible; una vez que ya no se puede continuar con la actividad habitual, los terapeutas ocupacionales ayudan a los pacientes en el cambio y adaptación de sus roles (Dixon, 2007).
- La terapia del lenguaje ayudará con el habla y la comunicación, y también con los problemas relacionados con la acción de tragar, ya que la EP puede causar problemas en el volumen y tono de la voz; en la expresión y en la fluidez, además de complicar la tarea de encontrar las palabras para mantener una conversación; asimismo, la rigidez de los músculos propia

de esta enfermedad también conlleva a la pérdida de la expresión del rostro y del lenguaje corporal así como un menor contacto visual (Sharma, 2008).

- Terapia quirúrgica: la neurocirugía es una alternativa que desde mediados del siglo XX es utilizada para tratar el temblor y la rigidez de los pacientes con Parkinson. Sin embargo su papel se limita a ser “el último recurso”, debido al alto riesgo y las complicaciones que puede ocasionar; además de que en la mayoría de los casos el beneficio motor a largo plazo es limitado. Pese a todo, los avances recientes en este campo han proporcionado un amplio grado de opciones quirúrgicas (Singh, 2007). La talamotomía y la estimulación talámica, se consideran procedimientos seguros y eficaces para tratar el temblor. La palidotomía y la estimulación palidal ayudan en el tratamiento de las discinesias, pero tienen efectos mínimos en la bradicinesia y la rigidez; y finalmente la estimulación del núcleo subtalámico mejora de manera significativa los periodos “*off-on*” inducidos por la L-Dopa (Zesiewicz y Hauser, 2001); y aunque esta última terapia es prometedora y más segura que las otras, desafortunadamente solo el 5% de 10% de pacientes con EP son candidatos para esta intervención quirúrgica (Singh, 2007).
- Terapia farmacológica: Desde 1949 se han probado diferentes fármacos como tirosina, fenilalanina, TH, trihexiphenadil, benzotropina, amantadina, L-Dopa, carbidopa, taurina, bromocriptina, litio, melatonina, L-carnitina, coenzima Q10 y otros en diferentes dosis, tratamientos, combinaciones y circunstancias para tratar esta patología (Shaw *et al.*, 1973; Avila-Costa *et al.*, 2005; Galpern *et al.*, 2007). Típicamente, las personas con Parkinson necesitan tomar al menos 2 medicamentos diferentes y conforme avanza la enfermedad necesitan tomar más de tres medicamentos distintos 5 o 6 veces al día. El objetivo de la medicación farmacológica es ayudar al paciente para mantener su función motora e independencia el mayor tiempo posible. A continuación se describen algunos fármacos comúnmente utilizados para el tratamiento de EP.

Anticolinérgicos

El Sistema colinérgico está íntimamente relacionado con el sistema dopaminérgico en los ganglios basales, puesto que la acetilcolina se encuentra sujeta al control inhibitorio de la DA, mediante su acción sobre los receptores D2 presentes en las interneuronas colinérgicas; por tal motivo, la disminución de este neurotransmisor en el estriado promueve la liberación excesiva de acetilcolina y por tanto sobre estimula a los receptores muscarínicos, lo que posiblemente conlleva a la generación del temblor, rigidez y acinesia. De esta manera se ha propuesto que la eficacia de los anticolinérgicos en la EP se debe a la atenuación de la hiperactividad colinérgica mediante el bloqueo de los receptores muscarínicos en el estriado. Algunos de los anticolinérgicos más utilizados son antagonistas muscarínicos como el trihexifenidril, la benzotropina y el biperideno (Beker *et al.*, 1990; Otero-Siliceo, 1996; Gongora-Alfaro *et al.*, 2005)

Por si solos los anticolinérgicos son eficaces para combatir el temblor y la rigidez, aunque no es muy efectivo contra la acinesia y la inestabilidad postural, sin embargo cuando se utilizan como coadyuvante de la L-Dopa son aun mejores para combatir el temblor en reposo (Ebadi *et al.*, 2005; Sharma, 2008). Por otro lado, se ha reportado que producen diversos efectos adversos tales como confusión, somnolencia, agitación, alucinaciones, boca seca, estreñimiento, incontinencia urinaria, visión borrosa y dificultad de concentración (Singh *et al.*, 2006).

Terapia de remplazo (L-Dopa)

Debido a que la DA administrada de manera exógena no atraviesa la barrera hematoencefálica, Birkmayer y Hornykiewicz (1982) decidieron emplear un precursor de este neurotransmisor que fuese capaz de atravesarla barrera para poder administrarlo de forma intravenosa y observar su efecto sobre la acinesia; a partir de entonces, la L-3,4-dioxifenilalanina o L-Dopa resultó todo un éxito

para tratar los síntomas de la EP, por lo que el reemplazo farmacológico se ha convertido en la piedra angular de la terapia antiparkinsoniana (Birkmayer y Hornykiewicz, 1982; Sharma, 2008).

La L-Dopa, se forma a partir del aminoácido L-tirosina como uno de los pasos intermedios de la síntesis de catecolaminas (Otero-Siliceo, 1996). Básicamente existen 2 reacciones; la primera es catalizada por la TH, la cual utiliza tres cofactores para realizar su función: tetrahidrobiopterina (BH4), hierro y oxígeno que actúan sobre la L-tirosina para dar paso a la formación de L-Dopa; la siguiente reacción, es catalizada por la Dopa Descarboxilasa (DDC), que utiliza piridoxal 5'fosfato (PLP) como cofactor logrando la descarboxilación de la L-Dopa para producir DA (Bahena-Trujillo *et al.*, 2000; Vallone *et al.*, 2000; García-Miniet *et al.*, 2003) (Figura 3).

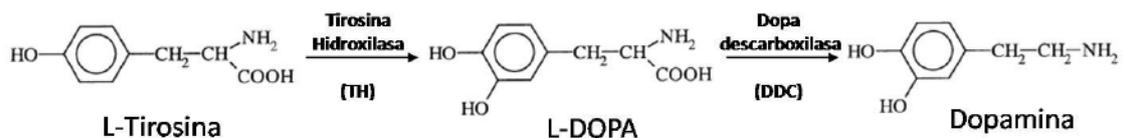


Fig. 3; Síntesis de dopamina (García-Miniet *et al.*, 2003)

La L-Dopa administrada vía oral, que es la vía más común, se absorbe en el duodeno y primeras porciones del yeyuno almacenándose en el estómago, en donde puede ser transformada a DA por acción de la DDC (Juri y Chaná, 2006). La DA que circula en el plasma, luego de la acción de la DDC sobre la L-Dopa, produce múltiples y frecuentes efectos adversos, como náuseas y vómitos; posteriormente, la DA es metabolizada en el hígado, músculos, riñones y glóbulos rojos por la catecol-orto-metil-transferasa (COMT) y en el cerebro por la MAO-B, de esta manera, la biodisponibilidad cerebral se reduce a tan solo a un 5% o un 10%. Por esta razón es que la L-Dopa suele administrarse asociada a algún inhibidor de la DDC, de la MAO-B o de la COMT (Jankovic, 2002).

Los inhibidores de la COMT incluyen fármacos como entacapona y tolcapona; los cuales suelen producir alteraciones del sueño, discinesias, confusión e insomnio. La tolcapona puede ser hepatotóxica por lo que en algunos países su

uso es controlado. El desarrollo de estos agentes está enfocado a la producción de fórmulas como la benserazida y carbidopa para reducir el metabolismo duodenal, subcutáneo e inclusive el que sucede tras la inyección intravenosa de L-Dopa (Singh *et al.*, 2007).

En el cerebro la DA es preferentemente metabolizada por la MAO-B, como se mencionó anteriormente, por lo que se utilizan inhibidores de ella para permitir que la DA permanezca más tiempo en su estado activo. La administración de selegilina (l-deprenilo) y sus metabolitos impiden la recaptura de la DA al bloquear los autorreceptores presinápticos de esta enzima, este proceso promueve un incremento en la síntesis dopaminérgica. Es por ello, que desde hace tiempo es utilizada como coadyuvante de la L-Dopa, ayudando a reducir los efectos *wearing-off* de aparición temprana; sin embargo es ineficaz para las fluctuaciones *on-off* en fases avanzadas de la EP (Heinonen *et al.*, 1989; Martínez *et al.*, 1998; Stocchi y Olanow, 2003).

El empleo de la L-Dopa, revolucionó el tratamiento de la EP por su eficiente capacidad para reducir temblor, rigidez y bradicinesias aunque como todos los fármacos tiene algunos efectos adversos, entre los más comunes se encuentran las náuseas y los dolores abdominales; esta es una de las razones por las cuales su administración comienza con dosis muy pequeñas, así los síntomas generalmente duran solo unas semanas y los efectos secundarios desaparecen (Olanow, 2004; Juri y Chaná, 2006; Sharma, 2008); sin embargo, el progreso de la enfermedad persiste (continúan muriendo las neuronas DA de la SNc) y después de varios años resulta necesario elevar la dosis de L-Dopa continuamente por lo que el beneficio terapéutico inicial desaparece a los pocos años, pues tras 5 años de tratamiento con L-Dopa cerca de 40% de los pacientes desarrollan una serie de complicaciones entre los que destacan: problemas neuropsiquiátricos, alucinaciones, delirios y demencia. Además de severas complicaciones motoras manifestadas por la disminución de la duración del efecto (*wearing-off* o deterioro de fin de dosis) y por la aparición de movimientos involuntarios también llamados discinesias (Obeso *et al.*, 2000^a).

Lo anterior, junto con estudios *in vitro* que muestran muerte neuronal acelerada por la presencia de L-Dopa, han planteado la posibilidad de que la L-Dopa sea tóxica para las neuronas remanentes en pacientes que padecen la EP (Muller *et al.*, 2004). Además del hecho de que la autooxidación no enzimática de la DA por la reacción de Fenton produce la formación de 2-OHDA, 5-OHDA y 6-OHDA en proporción 3:2:1 respectivamente. Los primeros dos productos no son citotóxicos sin embargo la 6-OHDA es altamente autooxidable (Slivka y Cohen, 1985).

Discinesias inducidas por L-Dopa (DIL)

La principal complicación motora tras la terapia con L-Dopa además de las fluctuaciones “*on-off*”, son las discinesias; las cuales se manifiestan como movimientos anormales e involuntarios (Abnormal and involuntary movements AIMs) de tipo coreico principalmente, y suelen involucrar extremidades, tronco y cabeza. Las DIL afectan a más del 50% de los pacientes tras aproximadamente 5 años de tratamiento con L-Dopa (Nutt *et al.*, 2002; Ebadi *et al.*, 2005) Aunque, es posible que este porcentaje esté disminuyendo como consecuencia de los cambios que el tratamiento inicial de la EP ha experimentado en los últimos años, aún así no se debe olvidar que es posible que estos tratamientos simplemente retrasen la aparición de estas complicaciones y este porcentaje se alcance a los 7 años en lugar de a los 5 (Gurutz *et al.*, 2005).

Existen diversos tipos de DIL entre las menos frecuentes se encuentran las discinesias oculares, respiratorias y mioclónicas; las más habituales suelen adoptar tres formas:

- a) Discinesias de pico de dosis o beneficio de dosis (cuando la concentración de L-Dopa en sangre es mayor); este tipo de DIL se caracterizan por la presencia de movimientos coreicos y regularmente afectan la región orolingual y el área corporal más afectada por la EP; con

menos frecuencia se han descrito movimientos distónicos, mioclonías, estereotipias o balismo. Casi todos los pacientes prefieren esta situación a la del bloqueo motor, y cuando este tipo de DIL llegan a ser muy severas regularmente se reduce la dosis usual de L-Dopa, si esta alternativa empeora los otros síntomas motores de la EP generalmente se emplean otros agonistas dopaminérgicos (Snow *et al.*, 2000; Ebadi *et al.*, 2005; Gurutz *et al.*, 2005).

- b) Discinesias Bifásicas: en las cuales las complicaciones motoras aparecen al inicio y al final del efecto de una dosis de L-Dopa presentándose el efecto: discinesias-mejora-discinesias, aunque a veces solo aparecen al inicio o al final, correlacionándose con los periodos en los que las concentraciones plasmáticas de L-Dopa ascienden o descienden. Se caracterizan por la presencia de movimientos estereotipados que principalmente afectan a las extremidades inferiores. En ocasiones son muy intensas y se acompañan de trastornos vegetativos (sudoración profusa, cambios en la presión arterial y frecuencia cardíaca, enrojecimiento facial etc.) que pueden poner en riesgo la vida del paciente (Gurutz *et al.*, 2005; Fabbrini *et al.*, 2007).

- c) Disonía off: Aparece coincidiendo con concentraciones plasmáticas muy bajas de L-Dopa; generalmente se correlaciona con la acinesia que precede a los efectos de la L-Dopa; regularmente, su primera manifestación suele ser a primera hora de la mañana antes de tomar la primera dosis, posteriormente aparece en todos los periodos off que el paciente sufre a lo largo del día; la disonía del pie suele ser la más común y afecta a todos los dedos del pie y suele acompañarse de dolor local; dificulta mucho la deambulación y despierta a los pacientes cuando sucede por la noche (Cubo *et al.*, 2001; Gurutz *et al.*, 2005; Fabbrini *et al.*, 2007) (Figura 4).

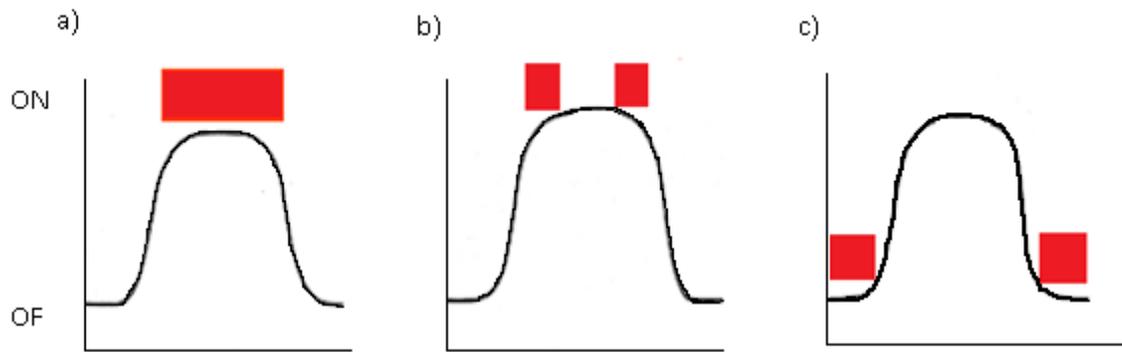


Fig. 4. Aparición de las discinesias (recuadros rojos) con respecto a la concentración de la L-Dopa (curva)

La etiopatología de las discinesias suele estar ligada a diversos factores que favorecen su aparición; los más frecuentemente implicados son: (1) edad de inicio de la enfermedad, ya que la aparición de éstas es mucho más frecuente en pacientes con EP cuyo inicio fue antes de los 50 años; no obstante, el riesgo de desarrollarlas disminuye a medida que aumenta la edad de aparición de los síntomas. Se piensa que este hecho puede estar ligado a la neuroplasticidad, pues a pesar de que los pacientes jóvenes poseen mayor plasticidad sináptica que les otorga mayor capacidad compensatoria y en muchos casos hace que la enfermedad progrese con mayor lentitud, también les confiere un riesgo más elevado de generar “formas aberrantes de plasticidad” incrementando la susceptibilidad a desarrollar complicaciones motoras; (2) influencia genética, se ha asociado la aparición de discinesias con ciertos polimorfismos en el gen del receptor dopaminérgico D2, además es bien sabido que pacientes con Parkinson por mutaciones en el gen de la parkina, DJ-1 y el PINK 1 son especialmente susceptibles a presentar discinesias; (3) un factor menos estudiado radica en el sexo de cada individuo, de tal forma, Yassa y Jeste en 1992 en una revisión sobre las diferencias de género en la Discinesias Tardías, encuentran que la prevalencia de estas es significativamente mayor en mujeres que en hombres para edades superiores a cincuenta años, mientras que para grupos de edades inferiores, tal diferencia entre sexos parece no manifestarse; aunque en este respecto aun faltan mas estudios(Oliveri *et al.*, 1999;Gurutz *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2005; Linazasoro, 2005). No obstante, solo dos factores son considerados condicionantes en el desarrollo de este tipo de fluctuaciones motoras: (4) el

grado de denervación dopaminérgica nigroestriatal, la cual parece ser crucial para la aparición de discinesias puesto que en personas con EP, las discinesias aparecen antes en el lado más afectado motoramente y en modelos animales se ha observado que a mayor denervación, mayor facilidad para desarrollarlas; en ratas lesionadas con 6-OHDA, se ha observado que dosis terapéuticas de L-Dopa causan discinesias solo cuando existe una pérdida dopaminérgica de >80% y la severidad máxima de AIMs aparecen solamente cuando la denervación DA excede el 90% (Guttman *et al.*,1997; Fabbrini 2005; Cenci *et al.*, 2007; Elmyra *et al.*,2008). Finalmente (5) la administración intermitente y crónica de un fármaco con una vida media corta, como la L-Dopa, promueve fluctuaciones en las concentraciones sinápticas de DA, generando estimulación oscilatoria de los receptores postsinápticos, lo que posiblemente desencadene una cascada de cambios plásticos en la arquitectura neuroquímica de los GB (Ebadi *et al.*, 2005).

Así pues, existe una importante relación entre la actividad de los GB y la aparición de discinesias, puesto que el desarrollo de estas últimas se ha atribuido a un desbalance entre la supresión y la promoción de movimiento en las vías de los GB (Cenci *et al.*, 2007). Se cree que especialmente en la vía directa existe actividad excesiva que promueve el desarrollo de DIL; en esta vía participan diversos neurotransmisores no dopaminérgicos en la promoción de estas complicaciones motoras (Brotchie, 2005); particularmente las proyecciones glutamatérgicas de la vía cortico-estriatal proveen la actividad excitatoria mediada por diversos receptores glutamatérgicos (NMDA, AMPA, mGluR, etc.) cuyo número suele incrementar cuando se desarrollan AIMs por lo que existen fármacos que atenúan o bloquean la acción de estos receptores. Tal es el caso de la amantadina, que hasta ahora se considera la única droga que ha mostrado reducir clínicamente la expresión de DIL sin intervenir con los beneficios antiparkinsonianos proporcionados por la L-Dopa (Fabbrini *et al.*, 2007). Existen otros sistemas de neurotransmisores implicados en la generación de DIL, entre los que destaca la participación de receptores adrenérgicos α_2 , 5HT_{1a}, 5HT_{2a}; histaminérgicos H3, receptores para canabinoides CB1 etc.; lo que hace

que todos ellos sean considerados blancos en la creación de terapias antidiscinéticas (Bibbiani *et al.*, 2000; Rascol *et al.*, 2001; Oh *et al.*, 2002). Los mecanismos celulares y moleculares por los que estos sistemas de neurotransmisores se ven involucrados aun no se tiene claro, pero se sabe que participan en procesos que promueven modificaciones en el patrón de disparo de la vía directa de los GB, por lo que el empleo de fármacos que sincronicen tales patrones aun se están desarrollando (Fabbrini *et al.*, 2007).

Por otro lado, se ha observado sobreactivación de la vía indirecta de los GB que teóricamente indicaría que la actividad de los receptores dopaminérgicos de la familia D2 estaría implicada en la generación de DIL (Brotchie, 2005). Sin embargo, existen evidencias experimentales que muestran que la estimulación selectiva de receptores D2 está asociada con la producción de bajos niveles de discinesias en comparación con aquellos fármacos que estimulan tanto a los receptores D1 como a los D2, lo que nos habla de la necesidad de comunicación entre la vía directa y la indirecta aunque no se conoce realmente el mecanismo de dicha interacción, sin embargo, se cree que podría estar involucrada la comunicación eléctrica mediante uniones GAP o la liberación de neuropeptidos de colaterales estriatales (Fabbrini *et al.*, 2007).

Todos los procesos descritos anteriormente son importantes para la elaboración de nuevos tratamientos para reducir este tipo de fluctuaciones motoras, puesto que el manejo correcto de las DIL ha resultado uno de los principales retos en el tratamiento de la EP con respecto a su impacto sobre la calidad de vida de los pacientes ya que aunque la mayoría de los pacientes pasan inadvertidas los AIMs con el tiempo tenderán a agravarse.

Agonistas dopaminérgicos

La L-Dopa continúa siendo el fármaco más eficaz para el tratamiento sintomático de la EP, sin embargo, su relación con la aparición de complicaciones motoras (fluctuaciones y discinesias) limita parcialmente su uso,

en particular en pacientes menores de 70 años y con síntomas leves de la enfermedad. Los agonistas dopaminérgicos (AD) ofrecen una alternativa eficaz y segura a L-Dopa en sujetos jóvenes y su utilización se asocia a una menor incidencia de complicaciones motoras a 5 años de tratamiento. Son útiles tanto en monoterapia en fases iniciales de la enfermedad como asociados a L-Dopa en pacientes con EP avanzada (Jenner, 2002; Cánovas *et al.*, 2011).

La característica principal de los agonistas dopaminérgicos es que su acción farmacológica deriva de su capacidad de activar receptores de DA. Se ha probado que los agonistas de receptores D1, los cuales estimulan la adenilato ciclasa, promueven la generación de discinesias, por lo que no son adecuados terapéuticamente; por otro lado los agonistas de los receptores de la familia D2, que inhiben la adenilato ciclasa, son más eficaces. Aunque por lo general, el uso de la mezcla de agonistas D1 y D2 proporciona un mejor control de los síntomas de la EP (Martínez *et al.*, 1998).

Apomorfina

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

La administración de la APO puede ser vía oral, subcutánea, intranasal sublingual, y rectal, sin embargo, produce efectos adversos graves, tales como hipersalivación, hipotensión, náuseas, vómito y sedación; por lo que su utilidad clínica se ve reducida (Neef *et al.*, 1999). De cualquier modo, se han utilizado inyecciones intermitentes de APO vía subcutánea para controlar las fluctuaciones “off”, producidas por L-Dopa; dicha utilidad se mantiene en muchos

pacientes durante aproximadamente 5 años, aunque se ha reportado que esta vía de administración llega a generar inflamación de la piel formando nódulos dolorosos en la grasa del tejido subcutáneo (paniculitis) (Molina *et al.*, 1999; Radad *et al.*, 2005). En la clínica la APO se utiliza también como herramienta en el diagnóstico de la EP para determinar la respuesta a agentes dopaminérgicos (Bonuccelli *et al.*, 1993). En roedores generalmente se inyecta APO para evidenciar el grado de denervación dopaminérgica inducido por la inyección unilateral de 6-OHDA; la administración de éste agonista dopaminérgico induce rotación contralateral a la lesión a causa de la hipersensibilidad de los receptores dopaminérgicos en el estriado lesionado, de manera que si el animal suma un total de 200 o más giros en un periodo de 30 min indica que existe muerte neuronal en un porcentaje aproximado del 90%. (Hefti *et al.*, 1980; Marin *et al.*, 2006).

Bromocriptina

En 1974 fue propuesto como el primer agonista dopaminérgico para tratar la EP; es utilizada en las etapas iniciales de esta enfermedad para retardar las complicaciones motoras inducidas por L-Dopa (Ramaker *et al.*, 2000). La dosis típica que demuestra eficacia terapéutica es de 20 a 30 mg/día, posee una biodisponibilidad oral absoluta de 10% pues el otro 90% se pierde al ser metabolizado por el hígado y su vida media es de aproximadamente 6 u 8 horas. La administración de bromocriptina presenta los típicos síntomas dopaminérgicos, es decir, náuseas, vómitos, hipotensión, eritromelalgia (síndrome vascular de tipo distónico, caracterizado por coloración roja, calor y dolor principalmente en las extremidades) y raramente alopecia. Este fármaco se utiliza además para trastornos no parkinsonianos como problemas ginecológicos (infertilidad y trastornos menstruales), síndrome neuroléptico maligno, así como para el control del tabaquismo y glucemia (Blum *et al.*, 1980; Ebadi *et al.*, 2005).

Antioxidantes

Se han descrito algunas vías por las cuales, la L-Dopa puede tener efectos adversos; Maharaj y cols., por ejemplo, reportaron en el 2005, que la L-Dopa estimula la peroxidación lipídica *in vitro* en la presencia de hierro y de ácido ascórbico en homogeneizado de cerebro de ratón; y que la dopamina tiene una reacción química con el hierro y el ácido ascórbico, que provoca la inducción de formas hidroxiladas de los productos de la dopamina. En base a que la SNc es el principal núcleo afectado durante la EP y que en ella se han detectado altos contenidos de hierro, es posible inferir que la administración de L-Dopa produciría un estado alterado en cuanto al balance oxidativo de la sustancia nigra, por lo que se ha sugerido que la administración de un antioxidante podría mejorar o retardar el curso de la enfermedad (Adler y Ahlskog, 2000).

Vitaminas A, C y E

Las vitaminas A, C y E son conocidos antioxidantes, capaces de prevenir la peroxidación lipídica actuando como barredores de radicales libres. Fahan, en 1992, sugirió que el tratamiento con altas dosis de vitamina A y C retardaban el uso de L-Dopa o agonistas por 2.5 años y actualmente existen numerosos estudios e investigaciones para evaluar el papel de estas vitaminas en la protección neuronal así como los posibles vínculos entre la deficiencia de estos agentes y la incidencia de EP (Singh *et al.*, 2007). El rol de la vitamina E en la EP ha sido estudiado tanto en pacientes como en modelos experimentales y se han obtenido resultados positivos, por ejemplo, Factor y colaboradores, en 1990, reportaron que pacientes con EP tratados con vitamina E mostraron disminución de los síntomas motores en comparación con los que no recibieron tratamiento.

Coenzima Q10

La coenzima Q10 es un componente intrínseco de la CTE, capaz de mejorar la función mitocondrial e incrementar la producción de ATP, además de que

también posee funciones antioxidantes (Bonuccelli y Del Dotto, 2006). Un estudio realizado por Shults y colaboradores, en 2002, en el cual administro diversas dosis de coenzima Q10 a pacientes con EP durante 16 meses, demostró que los pacientes que recibieron dosis altas de coenzima Q10 presentaron cierta reducción en la tasa de deterioro de la función motora en el UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale) en comparación con los pacientes que recibieron placebo. Sin embargo, este fármaco aún se encuentra en proceso de investigación.

Melatonina

La melatonina o *N*-acetil-5-metoxitriptamina, es una indolamina sintetizada y secretada por la glándula pineal, descrita por primera vez por McCord y Allen en 1917 y aislada por primera vez en 1958 (Arana, 2006). En adultos jóvenes se libera durante la noche, siendo la mayor secreción (260 pmol/L) entre las 12 de la noche y las dos de la madrugada y las mínimas (40 pmol/L) entre el medio día y las dos de la tarde observando además que disminuye con la edad. Esta sustancia es considerada como mensajero químico de transducción de información de fotoperiodos en el cerebro, también es considerado mediador de ritmos reproductivos, circanales, ritmo circadiano, hibernación, sueño-vigilia y temperatura (Vaneck 1998; Simonneaux y Ribelayga 2003; Boutin *et al.*, 2005; Reiter 2005).

La melatonina es sintetizada de forma cíclica a partir de un estímulo luminoso que se transmite por el tracto retino-hipotalámico (tracto RH) que estimula al núcleo supraquiasmático (NSQ) y posiblemente el núcleo paraventricular (NPV) en el hipotálamo; la señal continúa al cerebro anterior, al cordón espinal y al ganglio cervical superior (GCS); el cual posee proyecciones norepinefrinérgicas que estimulan los receptores α y β para norepinefrina de los pinealocitos; estas células son las encargadas de sintetizar a la melatonina a partir del triptófano por la enzima triptófano 5-hidroxilasa produciendo 5-hidroxitriptófano (5-HTP); éste a su vez, es convertido en serotonina (5-HT) o 5-hidroxitriptamina por la 5-HTP

decarboxilasa. Aquí es donde actúa la enzima limitante para la síntesis de melatonina, la serotonina *N*-acetiltransferasa (NAT), la cual, en la fase oscura incrementa de 30 a 70 veces, ésta enzima convierte la serotonina en *N*-acetilserotonina (NAS). Finalmente, la hidroxindol-*O*-metiltransferasa (HIOMT) convierte la *N*-acetilserotonina en melatonina (García-Ruiz, 2008) (Figura 5).

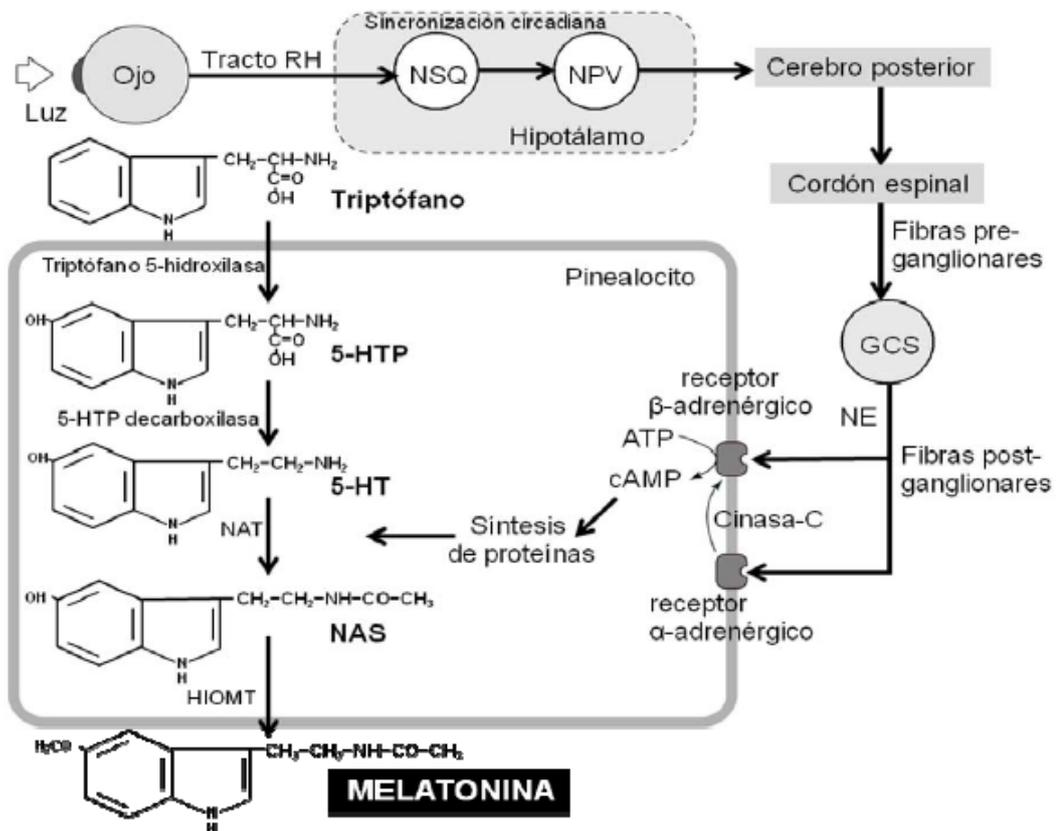


Fig. 5. Síntesis de melatonina (Modificado de Arendt 1998).

La melatonina se metaboliza en el hígado, por hidroxilación en 6-hidroximelatonina; posteriormente se conjuga con ácido glucurónico y ácido sulfúrico, y se excreta por la orina en forma de su principal metabolito, 6-sulfato-hidroximelatonina en estrecha relación con las concentraciones séricas de melatonina (Rufo-Campos, 2002). En humanos, la administración oral de 2 y 4 mg de melatonina tiene una vida media de aproximadamente 1 hora y su biodisponibilidad es de tan solo 15% aproximadamente, pues el otro 85% es metabolizado en el hígado. Al administrar una dosis de 2 mg vía intravenosa, la

biodisponibilidad es mayor, sin embargo, la vida media del fármaco se aproxima también a 1 hora (DeMuro *et al.*, 2000).

Una de las principales características fisicoquímicas de la melatonina es su capacidad de difusión; se trata de una molécula altamente lipofílica capaz de atravesar cualquier membrana celular, de manera que puede actuar en todos los niveles celulares (Costa *et al.*, 1995); inclusive existen estudios en los que se muestra que organelos como el núcleo y la mitocondria poseen la capacidad de almacenarla (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2002; Cajochen *et al.*, 2003).

En 1971, Lanas y colaboradores, demostraron que la melatonina poseía propiedades antioxidantes, más adelante, Tan y colaboradores en 1993, dieron a conocer la importancia de la melatonina como antioxidante endógeno. A partir de entonces ha sido una sustancia ampliamente estudiada, inclusive, existen reportes que la consideran un antioxidante dos veces más eficiente que la vitamina E y cuatro veces más que el GSH y el ácido ascórbico (Sofic *et al.*, 2005). Por otro lado, la melatonina estimula enzimas antioxidantes como la SOD y la GSH, esta última, se encarga de metabolizar el precursor del OH[•], el peróxido de hidrógeno en agua. Además, incrementa la eficiencia de la fosforilación oxidativa, estabiliza membranas celulares, reduce citocinas proinflamatorias y su adhesión molecular; es un quelante de metales, reduce la unión del factor nuclear α B (NF - α B) al ADN e inhibe enzimas pro-oxidantes. Se ha observado que el tratamiento con melatonina disminuye la peroxidación de lípidos generadas por Fe y además disminuye los niveles de Bax y caspasas; de modo que se inhibe la cascada de eventos que conllevan a la muerte neuronal por apoptosis (Sofic *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2006; Maharaj *et al.*, 2007).

Por otro lado, esta indolamina posee un potencial redox muy elevado 0.74V, lo que le confiere un alta capacidad para ceder un electrón a cualquier molécula que se encuentre a su alcance (Tan *et al.*, 2002) eliminando la elevada reactividad de la molécula en cuestión, y por ende su toxicidad; finalmente, la melatonina se transforma en un radical denominado “*radical indonilo*”. Así, es

capaz de neutralizar ERO y RL, tales como radicales peroxilo (ROO^\bullet), OH^\bullet y demás derivados de H_2O_2 , iones de cobre (Cu^{2+}), óxido nítrico (NO^\bullet), anión peroxinitrito (ONOO^-), ácido peroxinitroso (ONOOH), radicales haloperoxilos, y ácido hipocloroso (HOCl) (Mayo *et al.*, 1999; Reiter *et al.*, 2003 Sofic *et al.*, 2005).

Maharaj y colaboradores en el 2007 describen que los metabolitos de la melatonina también poseen actividad antioxidante como el N-acetil-N-formil-5-metoxikinurenamina (AFMK), N-acetil-N²-formil-5-metoxikinuramina (AMK), 3-hidroximelatonina cíclica y 6-hidroximelatonina; aumentando aun más su capacidad antioxidante. Además, existen estudios en donde se muestra que la melatonina incrementa la actividad del complejo I y IV de la cadena respiratoria; lo que hace pensar que podría tener cierto efecto benéfico sobre la homeostasis mitocondrial. Por todo lo anterior, diversos autores han sugerido que el efecto neuroprotector de la melatonina puede contribuir en el tratamiento de enfermedades como la EP. Enfermedad de Alzheimer, epilepsias, isquemias, entre otras en las que se ha visto daño mitocondrial o por estrés oxidativo (Dabbeni *et al.*, 2002; León *et al.*, 2004).

En cuanto al efecto de la melatonina en el tratamiento de la EP, estudios *in vitro* han observado que este fármaco protege a las neuronas DA del daño inducido por la administración de MPTP y protege a las mitocondrias del daño generado por la 6-OHDA en ratas (Mayo *et al.*, 2002; Maharaj *et al.*, 2005); más aún en el 2002, Aguiar y colaboradores observaron que el tratamiento con melatonina restaura los niveles de DA así como de los metabolitos de este neurotransmisor, DOPAC y HVA; tres años después, se reportó que el tratamiento crónico con este fármaco induce incremento de los niveles de RNAm de TH en la SN y en el Área Ventral Tegmental (León-Josefa *et al.*, 2005).

Ahora bien, en nuestro laboratorio hemos observado que el tratamiento con melatonina es capaz de disminuir las alteraciones producidas por la inyección intracerebral unilateral de 6-OHDA; el efecto se caracteriza por recuperación en

el desempeño de actividades motoras, mayor sobrevivencia de las células dopaminérgicas nigrales, menor número de botones sinápticos con edema y mayor prevalencia de contactos sinápticos con espinas, así como normalización en los niveles de peroxidación de lípidos en el núcleo estriado (Gutiérrez, 2007). Posteriormente García-Ruiz (2008) muestra que si se co-administran la L-Dopa y la melatonina además del beneficio citológico se observa mejoría en cuanto al desempeño de actividades motoras, en ratas hembras. Por lo que considera que la melatonina podría ser un candidato para el tratamiento de la EP ya sea como monoterapia o preferentemente en combinación con la L-Dopa.

JUSTIFICACIÓN

Pese a que la L-Dopa es el fármaco más efectivo para tratar los síntomas de la EP, se sabe que su administración a largo plazo puede acelerar la degeneración de las neuronas dopaminérgicas debido a que estimula la peroxidación lipídica provocando en las células estrés oxidativo e induciendo de este modo su muerte (Werner y Cohen, en 1995). La melatonina posee propiedades antioxidantes, además de la capacidad de unirse al hierro, suprimiendo la peroxidación lipídica entre otras características que la convierten en un excelente complemento en el tratamiento contra la EP. Como se señaló previamente la co-administración de L-Dopa/Melatonina puede prevenir las alteraciones conductuales y citológicas que se presentan en modelos animales de la EP; además es importante estudiar el efecto conductual y citológico que tiene la melatonina si es administrada una vez que se ha iniciado el tratamiento con L-Dopa, puesto que la mayoría de las personas que padecen esta enfermedad han iniciado ya este tratamiento. Así mismo, es imperante analizar el efecto de la combinación de los fármacos sobre las discinesias producidas por L-Dopa, para saber si la adición de un antioxidante tan potente como la melatonina disminuye la aparición de dichas fluctuaciones motoras.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la co-administración de melatonina y L-Dopa sobre el desempeño motor, las DIL y la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas de la SNc de ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA tras la administración crónica de L-Dopa seguida por la co-administración de Melatonina en ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA.

OBJETIVOS PARTICULARES

Después de la administración de L-Dopa y/o melatonina en ratas depletadas de DA unilateralmente con 6-OHDA se evaluará:

- ✓ El desempeño de la actividad motora fina mediante la prueba de la escalera.
- ✓ El desempeño de la actividad motora gruesa mediante la prueba de viga.
- ✓ El efecto de ambos fármacos de manera individual y en combinación sobre el desarrollo de DIL.
- ✓ El número de neuronas inmunorreactivas a TH remanentes en la SNc para analizar el efecto neuroprotector.

METODOLOGIA

Se utilizaron 25 ratas macho de la cepa Wistar con peso de 190 ± 10 gr, y se mantuvieron en un periodo de luz y oscuridad de 12:00 hrs con libre acceso a agua y alimento, a excepción de los días en que se evaluó el desempeño motor en la prueba de la escalera.

Prueba de la viga- Se utilizaron 2 vigas de 6 y 12 mm de grosor respectivamente; ambas con una longitud de 2 m y una inclinación de 15° , por donde los animales debían caminar hasta alcanzar su caja hogar, desde el extremo más bajo del aparato. Inicialmente se entreno a los animales; el primer día de entrenamiento se colocó una viga de 24 mm de forma horizontal y en un extremo la caja hogar para que los animales llegasen a ella; se realizó el entrenamiento de esta forma durante 3 ocasiones más y posteriormente otras 2 colocando la viga de forma inclinada; cabe mencionar que estos días no se midió el tiempo de ejecución de los animales sobre las vigas.

A partir del segundo día de entrenamiento los animales pasaron tres veces sobre ambas vigas (6 y 12 mm) dispuestas diagonalmente y finalmente, el

séptimo día de adiestramiento los animales recorrieron ambas vigas una sola vez y se registró el tiempo de ejecución. Los registros temporales se consideraron como evaluación control. Aquellos animales que se negaron a realizar el recorrido sobre la viga o que tardaron más de 120 min fueron excluidos del experimento.

Prueba de la escalera- Esta prueba consistió en colocar a las ratas individualmente dentro de una caja de acrílico, constituida por 2 compartimientos conectados entre sí, uno mayor (21cm de largo, 11 cm de ancho y 12 cm de alto) en el cual la rata puede descansar y moverse con mayor libertad, y el compartimiento menor (16 cm de largo, 7cm de ancho y 12 cm de alto), el cual a cada lado contaba con dos escaleras de 6 peldaños (0.5 cm de alto); cada peldaño tiene una cavidad en la parte central en donde se coloca un pedazo de alimento; además, el compartimiento menor tiene una superficie central (plataforma central de 4.5 cm de alto y 13 cm de largo) donde descansaba la rata y que obstaculizaba el movimiento cruzado de las extremidades superiores para tomar los trozos de comida. En la parte inferior junto a la plataforma central, hay un peldaño de 3cm de alto con la función de impedir el alcance del alimento con las extremidades traseras. (Figura 6).

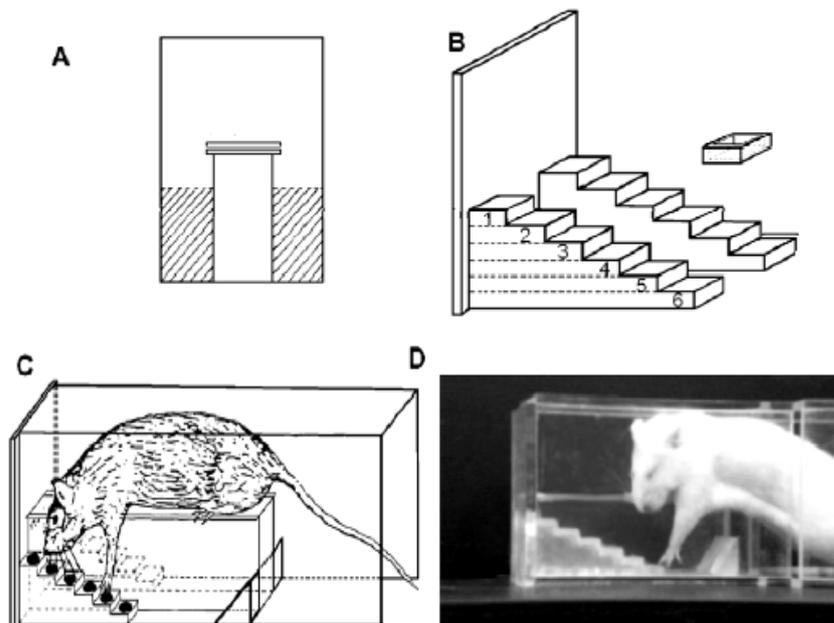


Fig. 6 Dispositivo de acrílico para la prueba de habilidades manuales en la escalera. A, pared anterior de acrílico y plataforma. B, escalera de seis peldaños para colocar fragmentos de comida a ambos lados de la plataforma intermedia. C y D, organismos durante la prueba. Se contó el número de fragmentos comidos por lado en un lapso de 10 minutos. Modificado de Montoya *et al.*, 1991.

Para la realización de esta prueba la cantidad de alimento fue restringida durante los días que duró el entrenamiento (7 días) de manera que el animal se mantuvo al 85% de su peso control. En las primeras sesiones se colocaron las escaleras 1cm por encima de la superficie y se iban bajando de manera progresiva en las sesiones siguientes de acuerdo con el número de pedazos de alimento recogido. Aquellos animales que después de 7 sesiones no tomaron y comieron por lo menos el 60% de las pastillas fueron retirados del experimento (Mayoral, 2008). En esta prueba se registraron el número de veces que cada animal agarró los pedazos de alimento, los llevó a la boca y finalmente los consumió (Samsam *et al.*, 2004).

Es importante señalar que el tiempo de entrenamiento de las diferentes pruebas conductuales (viga de equilibrio y escalera), así como las evaluaciones se llevaron a cabo durante diferentes días, con el objetivo de evitar la influencia del cansancio de los animales sobre su desempeño al momento de realizar las pruebas. Todas las sesiones se llevaron a cabo entre las 18:00 y las 19:00 hrs.

Una vez terminado el entrenamiento, 20 ratas fueron lesionadas quirúrgicamente de la siguiente manera: los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (35mg/kg) por vía intraperitoneal (i.p); posteriormente se fijaron en un aparato estereotáxico y se realizó un trépano en el lado izquierdo del cerebro empleando las siguientes coordenadas AP=3.0 mm; L= 1.6mm y 8.0mm a partir de Bregma (Paxinos y Watson, 1997), para inyectar una mezcla de 4µl de solución salina conteniendo 8 µl de 6-OHDA y 0.2 mg de ácido ascórbico, como antioxidante, en el haz medial del cerebro anterior izquierdo; zona donde convergen los axones dopaminérgicos nigrales en su camino hacia los núcleos blanco. Dos días después de la lesión se evaluó el giro inducido con 0.25 mg/kg de apomorfina, se utilizaron solo los animales que dieron más de 200 giros en un periodo de 30 minutos para garantizar una pérdida dopaminérgica mínima del 90% (Hefti *et al.*, 1980). Las 5 ratas restantes conformaron al grupo control.

24 horas posteriores a la evaluación del giro, se formaron 4 grupos (n=5 c/u) para la administración de los distintos tratamientos vía oral. El primer grupo recibió una dosis de 7.5 mg/kg de L-Dopa/carbidopa comercial (sinemet), el segundo grupo fue tratado con la mezcla de 10 mg/kg de melatonina y 7.5 mg/kg de L-Dopa/carbidopa; el tercer grupo (L-Dopa/Mel (ret)), recibió 7.5mg/kg de L-Dopa/carbidopa durante 30 días; y los siguientes 30 días de este tratamiento se le suministró la misma mezcla que el grupo anterior de L-Dopa/carbidopa/melatonina, el último grupo de ratas lesionadas con 6-OHDA no recibió ningún tratamiento al igual que el grupo control (Figura 7). Cabe mencionar que las evaluaciones conductuales se llevaron a cabo semanalmente a partir del día 7 en que los animales comenzaron a recibir tratamiento.

	GRUPO
I	Control
II	Lesión + L-Dopa
III	Lesión + L-Dopa/Melatonina
IV	Lesión + L-Dopa/Mel (ret)
V	Lesión

Fig. 7 Cuadro en el que se muestran los diferentes grupos del experimento.

15 días después de haber iniciado los tratamientos, se inició la evaluación de la severidad de las DIL de acuerdo a la escala de discinesias en ratas reportada por Cenci y colaboradores en 1998. Para esto, las ratas fueron colocadas de forma individual en cajas de acrílico y fueron observadas y videograbadas cada 20 minutos durante un minuto, por un lapso de 3 horas después de la administración del medicamento habitual; es importante señalar que se realizó un video control 20 minutos antes de la administración del fármaco correspondiente para cada animal. Se evaluaron 4 subtipos de DIL según la ubicación de cada uno:

Locomotoras: movimientos giratorios hacia el lado contralateral a la lesión.

Axiales: desviaciones laterales o torsión de la cabeza, cuello y tronco hacia el lado contralateral a la lesión, estos movimientos también suelen llamarse “posiciones distónicas” o bien, movimientos coreiformes de torsión.

Extremidad: movimientos de la pata delantera contralateral, los cuales pueden ocurrir en el plano sagital cuando el animal tiende a flexionar y extender su pata, en el plano frontal (abducción y aducción) o en ambos (circunducción). Incluye la apertura o cierre de los dígitos y la pronación y supinación de la muñeca; puede tener carácter coreiforme espasmódico o distónico.

Orolinguales: caracterizadas por movimientos de la mandíbula, muecas faciales, protrusión de la lengua. Este tipo de movimiento suelen ser bilaterales, aunque son más pronunciados en el lado contralateral a la lesión. Este subtipo de DIL usualmente es acompañado por mordidas en la piel o en el pelaje y sobretodo en la pata contralateral a la lesión.

El rango de severidad de las DIL fue calificado de acuerdo al tiempo de presentación de cada una pudiendo obtener una calificación de 0 a 4 de la siguiente manera:

Tiempo en segundos	calificación
<10	0
10	0.5
11-20	1.0
21-30	1.5
31-45	2.0
46-60 mov. Interrumpido	2.5
31-45 interrumpe el mov. Con un estímulo externo.	3.0
46-60 interrumpe el mov. Con un estímulo externo y vuelve con el mov.	3.5
60 realiza el mov. todo el tiempo aun cuando se presenta algún estímulo externo	4.0

Es importante señalar que el término AIMs hace referencia a los animales del grupo lesión, pues no recibieron L-Dopa, también se menciona entonces cuando se hace referencia a todos los grupos de éste estudio. Por su parte, el término DIL hace referencia los animales que recibieron L-Dopa en algún momento del tratamiento.

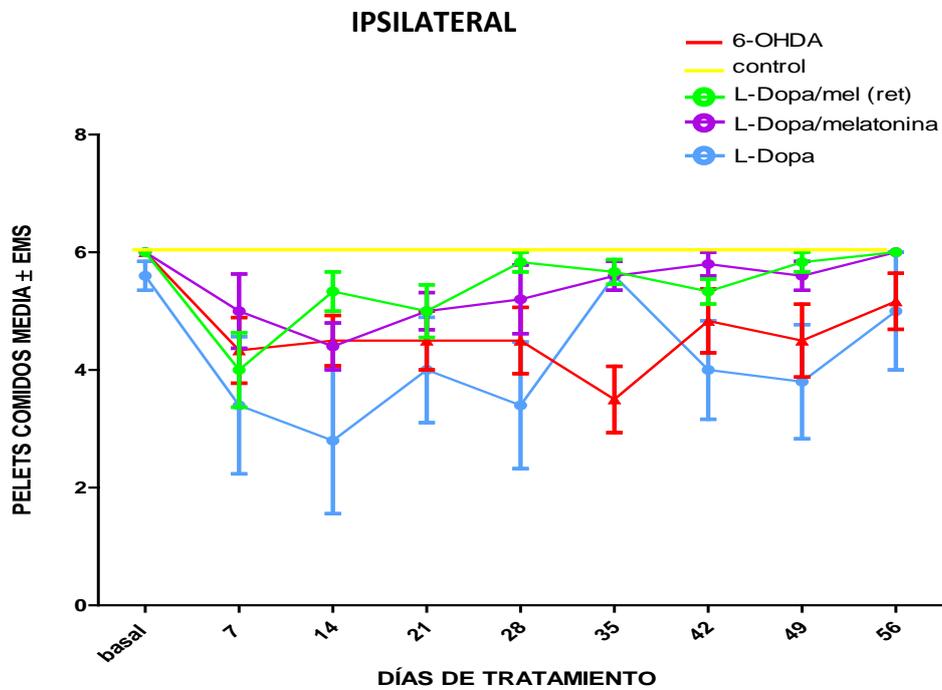
Dos meses después, las ratas fueron sacrificadas por perfusión intracardiaca y se extrajeron los cerebros. Posteriormente se obtuvieron rebanadas del mesencéfalo y se procesaron con la técnica de inmunocitoquímica para TH en rebanadas de 50 micras (anti-TH Millipore 1:1000, revelado con diaminobenzidina) y finalmente se contabilizaron las neuronas remanescentes en la SNc en 7 cortes por animal tanto del lado ipsi como del contralateral a la lesión (Ver apéndice).

Análisis Estadístico: Para la evaluación del conteo citológico y las pruebas de conducta motora fina y gruesa, se realizó un ANOVA de 2 vías, se llevó a cabo un post-test LSD ($P \Rightarrow 0.001$). Para la evaluación estadística de Los AIMs o DIL, se utilizaron estadísticos no paramétricos y la prueba Kruskal Wallis y Dunnet como post-test, además, se realizó un análisis del área bajo la curva, (AUC, por sus siglas en inglés).

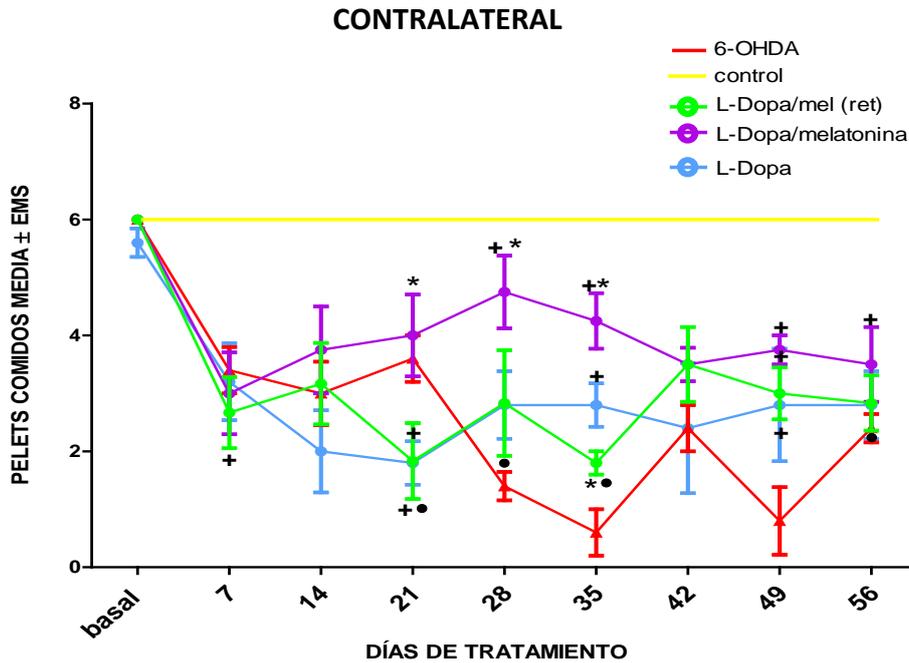
RESULTADOS

Prueba de la escalera:

En esta prueba los animales pertenecientes a los grupos con los diferentes tratamientos ejecutaron de manera similar al grupo control la tarea de tomar y comer los trozos de comida con la pata ipsilateral a la lesión (izquierdo), por lo que no presentan diferencias significativas con el grupo control ni entre ellos, corroborando así la función de “control interno” que se tenía esperada para este lado (Ungerstedt, 1968; Meredith *et al.*, 2008) (Grafica 1).



Grafica 1. Resultados del miembro ipsilateral en la prueba de escalera. No se observan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. El grupo control es representado en todas las gráficas como una línea recta por la homogeneidad de sus datos.

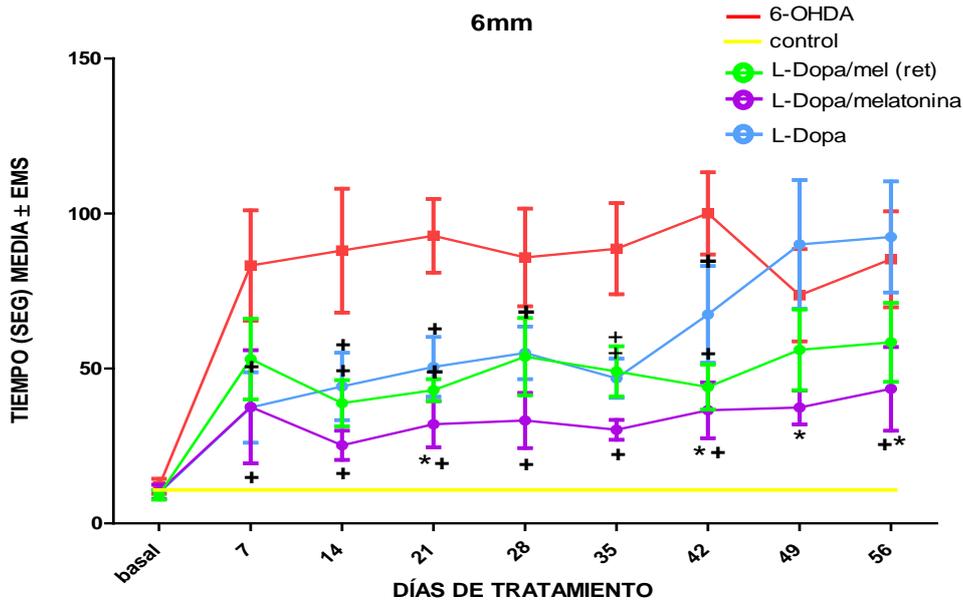


Grafica 2. Resultados del miembro contralateral en la prueba de escalera. Se observa que comparado con el grupo que recibió solo L-Dopa o el grupo que fue únicamente lesionado, el grupo L-Dopa/melatonina presenta un mejor desempeño en la realización de la prueba, principalmente a partir de la evaluación realizada en el día 28 del tratamiento. + vs lesión con 6-OHDA, * L-Dopa/Melatonina y L-Dopa/Melatonina (ret) vs L-Dopa, • L-Dopa/melatonina vs L-Dopa /Melatonina

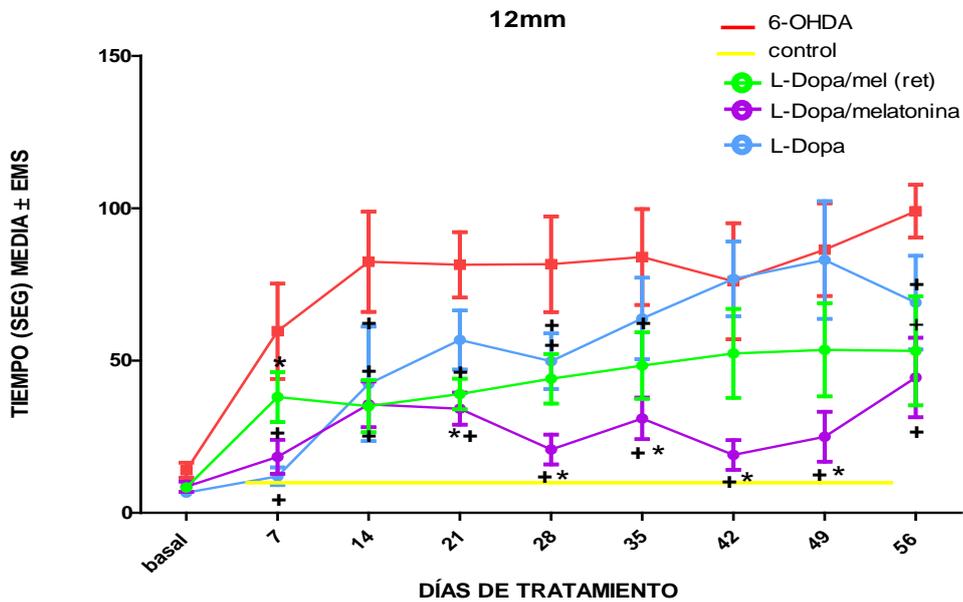
La ejecución de esta tarea con la pata contralateral a la lesión evidencia diferencias entre los tratamientos. El grupo lesionado con 6-OHDA y que no recibió ningún tratamiento presentó déficit en esta prueba, de manera progresiva. Inesperadamente, el grupo al que se le administró L-Dopa se comportó de manera similar al grupo lesión. El grupo al que se le administró durante todo el experimento la mezcla de L-Dopa/Melatonina, manifestó un comportamiento similar a los niveles basales desde los 14 días de tratamiento mostrando en el desempeño diferencia significativa con el grupo que recibió solo L-Dopa a partir de los 21 días de tratamiento y a los 28 con el grupo lesión a partir de ese momento los resultados fueron estables hasta el final del experimento. Finalmente el grupo al que se le administró L-Dopa el primer mes y la mezcla de L-Dopa/Melatonina el mes siguiente se comportó de manera muy similar al grupo de L-Dopa en esta prueba (Gráfica 2).

Prueba de la Viga

En la viga de 6mm el grupo lesionado y sin tratamiento mostró los tiempos más prolongados en el recorrido durante la mayor parte del estudio. El grupo con L-Dopa mostró mejoría significativa con respecto de este grupo hasta los 42 días de tratamiento, en las 2 últimas evaluaciones los animales comenzaron a subir con lentitud comportándose de manera similar al grupo exclusivamente lesionado. El grupo con tratamiento combinado desde el inicio del experimento obtuvo resultados afines al grupo control durante todo el tratamiento, es importante notar que también presenta diferencias significativas con el grupo tratado con L-Dopa a partir de los 42 días de tratamiento, donde este último grupo (L-Dopa) comenzó a disminuir la velocidad de ascenso. Por otra parte el grupo al que se le administró melatonina un mes después de haber ingerido solamente L-Dopa tuvo un comportamiento intermedio entre los 2 grupos anteriormente descritos, no se observan diferencias significativas con ninguno de ellos; pese a que en las últimas evaluaciones tampoco muestra diferencias con el grupo únicamente lesionado, este grupo tratado con L-Dopa y después con L-Dopa/Melatonina muestra un comportamiento mucho más parecido al grupo tratado con L-Dopa/Melatonina que al grupo con solo L-Dopa (Gráfica 3).



Grafica 3. Tiempo de recorrido sobre la viga de 6 mm, Nótese que el grupo con tratamiento combinado exhibe nuevamente el mejor desempeño motor en comparación con el grupo que recibió L-Dopa durante todo el tratamiento y el grupo que solamente fue lesionado. Por otro lado el grupo que fue tratado con la mezcla de L-Dopa/Melatonina un mes después de haber recibido únicamente L-Dopa mostró un comportamiento intermedio entre el grupo tratado con L-Dopa y aquel que recibió la mezcla durante todo el tratamiento.+ vs lesión con 6-OHDA, * L-Dopa/Melatonina y L-Dopa/Melatonina (ret) vs L-Dopa y finalmente • L-Dopa/melatonina vs L-Dopa /Melatonina (ret).



Grafica 4. Tiempo de recorrido sobre la viga de 12 mm. Se observa un comportamiento similar a la viga de 6 cm, pues el grupo con tratamiento combinado durante todo el experimento muestra mejoría significativa con respecto al grupo lesionado y el que fue tratado solamente con L-Dopa, mientras que el grupo que recibió la mezcla (L-Dopa/Melatonina) un mes después de ser tratado con L-Dopa mantiene un desempeño intermedio entre el grupo con L-Dopa y el grupo con L-Dopa/Melatonina durante todo el tratamiento.+ vs lesión con 6-OHDA, * L-Dopa/Melatonina y L-Dopa/Melatonina (ret) vs L-Dopa y finalmente • L-Dopa/Melatonina vs L-Dopa /Melatonina (ret).

En la viga de 12 mm el comportamiento de los diferentes grupos refleja tendencias similares a las descritas en la viga de 6mm, los animales lesionados y que no recibieron ningún tratamiento demoraron más que cualquier otro grupo en llegar a su caja hogar. El grupo al que se le administró L-Dopa obtuvo mejores resultados en el tiempo de recorrido que el grupo lesionado pero solo hasta los 28 días de tratamiento, y durante las evaluaciones posteriores los animales de este grupo subieron con mayor lentitud la viga incrementando el tiempo de recorrido, obteniendo valores muy similares a los del grupo de solo lesión; por otro lado, el grupo al que se le administró la combinación de L-Dopa/Melatonina presentó valores muy semejantes a los niveles basales en todas las evaluaciones del experimento, obteniendo una mejor respuesta que el grupo con L-Dopa a partir del día 21 de tratamiento. Finalmente el grupo al que se le administró melatonina, un mes después de haber recibido solamente L-Dopa, nuevamente tuvo un comportamiento intermedio entre el grupo con tratamiento combinado y al que únicamente se le administró L-Dopa, no obtuvo diferencias significativas con ninguno de los 2 (Gráfica 4).

DIL/AIMs

Los DIL/AIMs que desarrollaron los animales fueron clasificados en cuatro diferentes subtipos topográficos (orolingual, extremidad, axial y giro/locomoción).

Orolinguales:

En el total de AIMs orolinguales producidos durante todo el tratamiento se observó que el grupo con L-Dopa manifestó mayor cantidad de este tipo de DIL en comparación con los demás grupos. El grupo con tratamiento combinado y aquel que tomó melatonina tras un mes de haber recibido solamente L-Dopa presentaron un comportamiento similar, pues ambos grupos mostraron valores significativamente inferiores a los que se observaron en el grupo que recibió solo L-Dopa durante todo el estudio; no hay diferencias significativas entre el grupo que recibió la mezcla de L-Dopa/Melatonina, el que recibió melatonina un mes después de la administración de L-Dopa y el grupo solo lesión (Gráfica 5a).

Extremidades:

En el total de DIL producidas en la extremidad anterior del lado contralateral a la lesión en el grupo con L-Dopa mostró la mayor cantidad de DIL, siendo significativamente distinto a los demás tratamientos, los cuales presentaron menores valores en el desarrollo de este tipo de AIMs no habiendo diferencias significativas entre ellos (Gráfica 5 b).

Axiales/ torsión:

En los valores totales de DIL de tipo axial que se observaron durante todo el periodo de tratamiento (Figura 5c) los animales tratados con L-Dopa se ven afectados severamente en los músculos del cuello y del tronco, pues muestran incremento en la puntuación de AIMs axiales, a diferencia de los animales lesionados y de los grupos en los que se mezcló L-Dopa y melatonina sin importar el tiempo en que se administró la neurohormona. Los grupos que recibieron melatonina no presentaron diferencias significativas con respecto al grupo solo lesión y que no desarrolló este subtipo de AIMs.

Giro/ locomoción:

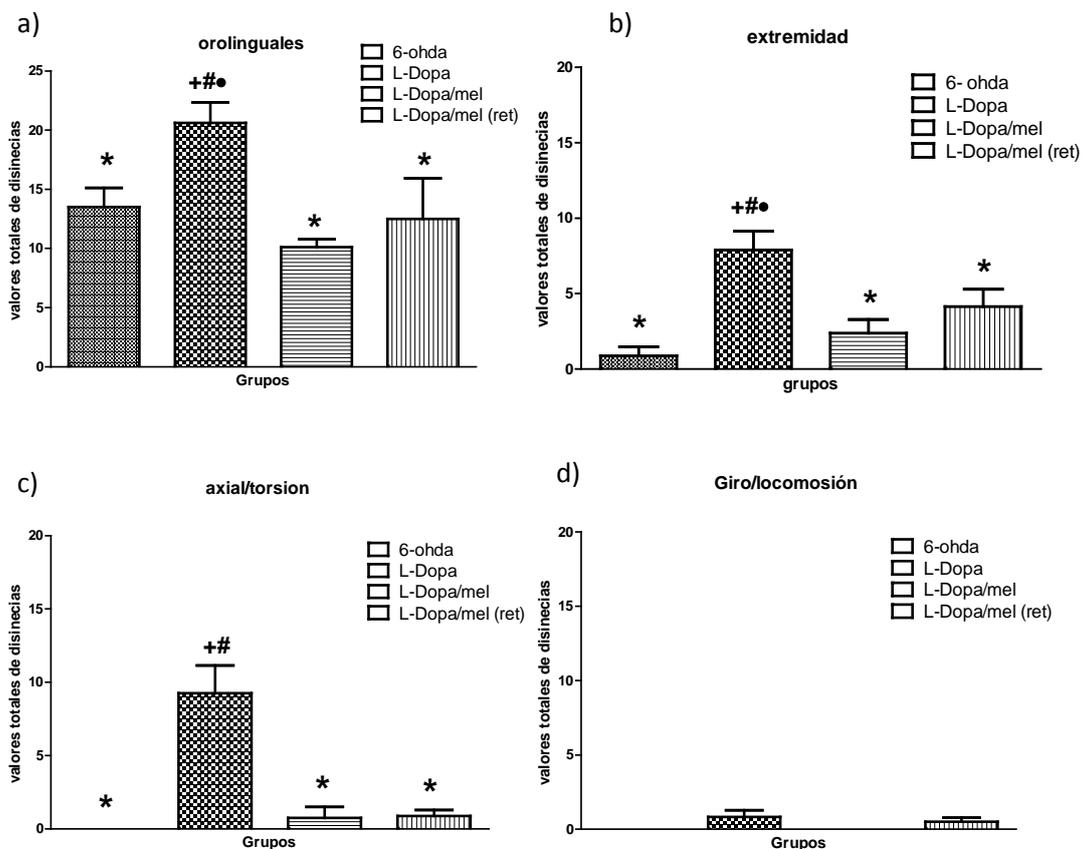
Con respecto a la cantidad total de giros (gráfica 5 d) solamente los grupos que recibieron L-Dopa sin mezclar con melatonina en algún momento del estudio (L-Dopa y L-Dopa/Melatonina (ret)) presentaron este comportamiento. El grupo que recibió L-Dopa en combinación con melatonina durante todo el tratamiento no manifestó esta conducta.

Como era de esperarse el grupo solo lesión, no presento giro, ni tampoco manifestó AIMs axiales. Respecto a este grupo hay que señalar que en relación a la aparición de AIMs totales exhibió movimientos en la extremidad contralateral a la lesión y se observaron discinesias orolinguales, que en algunas evaluaciones incluso tendieron a ser ligeramente mayores que el grupo que recibió L-Dopa/melatonina desde el inicio del tratamiento.

El grupo que tomó L-Dopa/Melatonina desde el inicio del experimento manifestó

pocas discinesias, no mostrando diferencias significativas con respecto al grupo solo lesión, además de que no manifestó giro pese a que se le administró L-Dopa.

Es importante notar que el grupo que recibió melatonina tras un mes de tratamiento con L-Dopa, no alcanzó la cantidad de discinesias que manifestó el grupo que recibió solamente L-Dopa



Grafica 5. Cantidad total de los distintos subtipos topográficos de DIL desarrolladas en las 4 evaluaciones que se realizaron a los grupos en tratamiento. a) Representa los movimientos orolinguales, que se distinguen por movimientos mandibulares, b) movimientos en la extremidad contralateral a la lesión) movimiento axial que involucra la torsión de los músculos del cuello y tronco hacia el lado contralateral a la lesión y d) donde se exponen la cantidad de giros producidos tras la administración de los tratamientos. Es posible observar que el grupo que manifestó mayor cantidad de DIL fue el grupo que recibió únicamente L-Dopa durante todo el tiempo de tratamiento, seguido por el grupo que recibió la mezcla L-Dopa/Melatonina un mes después de la ingesta única de L-Dopa. Por otro lado, aunque el grupo que recibió la combinación de L-Dopa y Melatonina desde el inicio del experimento manifestó DIL, su aparición es significativamente menor en comparación con el grupo tratado solamente con L-Dopa.+vs 6-OHDA; *L-Dopa vs tratamientos; # L-Dopa/Melatonina vs tratamientos y ●L-Dopa/Melatonina (Ret) vs tratamientos.

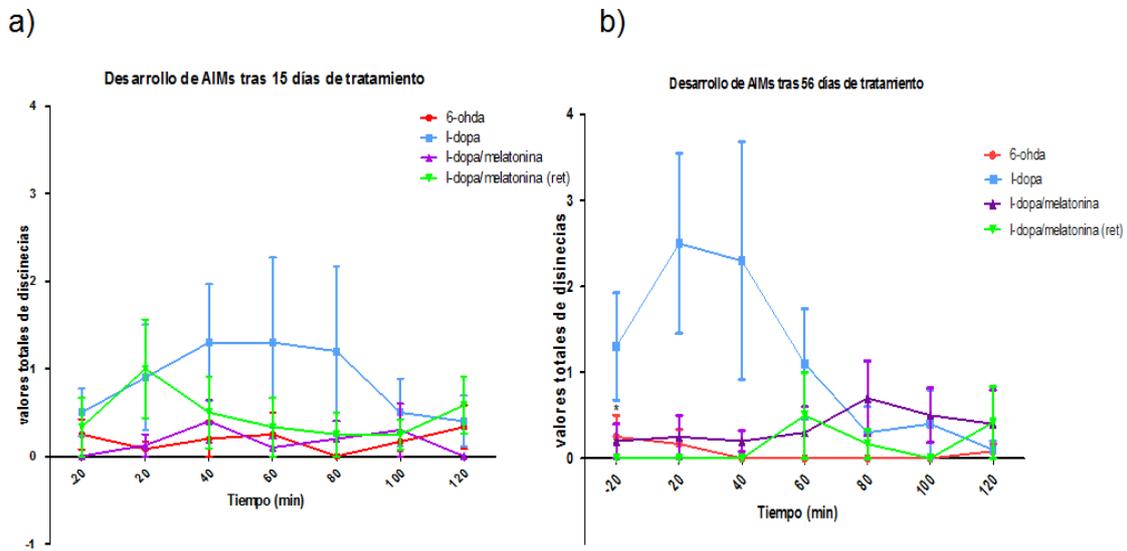
Con el propósito de evaluar las discinesias inducidas por la dosis pico de L-Dopa (DIL) se graficaron las manifestaciones temporales de todos los subtipos de AIMs (orolingual + extremidad + axial/torsión + locomoción), después de la administración de los distintos tratamientos, y pese a que los datos no muestran diferencias significativas al comparar las DIL presentes a los 15 días de tratamiento contra las producidas a los 56 días de tratamiento (gráfica 6), es posible observar las tendencias con respecto al desarrollo discinesias de cada grupo.

La gráfica 6a, muestra el desarrollo de discinesias tras 15 días de tratamiento, se observa que en el grupo al que se le administró únicamente L-Dopa predominan las DIL, siendo más frecuentes desde el minuto 40 hasta el minuto 80, a partir del minuto 100 disminuyen hasta alcanzar niveles basales; el grupo al que se le administró melatonina tras un mes de tratamiento con L-Dopa, desarrolló DIL a los 20 min de haber ingerido L-Dopa, la tendencia a desarrollar este tipo de movimientos difiere en los minutos 40 a 80 con respecto al grupo que solamente ingirió L-Dopa durante todo el tratamiento.

Por otra parte el grupo solo lesión, como era de esperarse, no presentó DIL, pues no ingirió L-Dopa; finalmente el grupo que recibió la combinación de L-Dopa y Melatonina desde el principio del tratamiento se comportó de manera similar al grupo anteriormente descrito, es decir no desarrollo DIL.

En la grafica 6b se observa el desarrollo de AIMs inducidas por L-Dopa durante la cuarta y última evaluación, es decir a los 56 días de tratamiento, se observa que el grupo al que se administró L-Dopa desarrolló aun más DIL que en la primera evaluación, de manera específica en los primeros 40 minutos, después de este periodo tienden a disminuir el desarrollo de éstas. Los tres grupos restantes se comportaron de manera similar entre sí, pues ninguno de ellos desarrolló DIL durante el periodo de evaluación, si bien el grupo con tratamiento combinado desde el principio del estudio presentó una ligera tendencia a aumentar la cantidad de DIL en los minutos 80 y 100 con respecto a los primeros minutos de evaluación; y el grupo al que se le administró melatonina un mes después de haber administrado L-Dopa tuvo un par de

fluctuaciones, ninguna de estas variaciones es tan evidente como las manifestadas por el grupo al que se le administró L-Dopa.



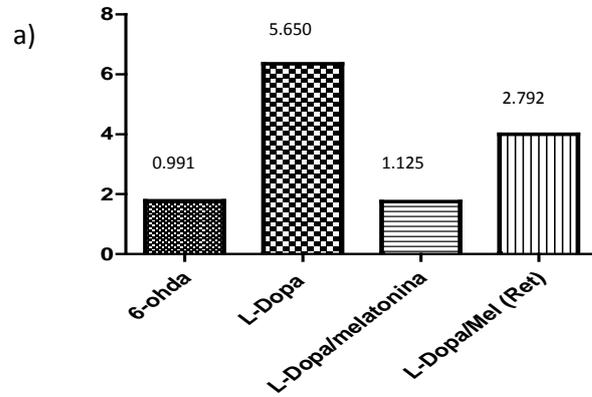
Gráfica 6. En estas gráficas se observa el desarrollo de DIL o AIM durante 120 min de evaluación. En a) se representan los resultados de la primera evaluación y en b) los resultados obtenidos durante la cuarta evaluación. Pese a no haber diferencias significativas, es posible observar ciertas tendencias que sugieren que la mezcla farmacológica reduce la aparición de DIL puesto que el grupo tratado con L-Dopa y melatonina desde el inicio del tratamiento prácticamente no desarrolló DIL en comparación con el grupo tratado solo con L-Dopa

Para evidenciar con mayor claridad la tendencia observada, en La gráfica 7 (a b) se observa el análisis de Área Bajo la Curva (AUC Area Under the Curve), una medida que abarca tanto el pico como la duración de la respuesta. Los datos obtenidos durante la primera evaluación muestran mayor área en el grupo tratado con L-Dopa (5.650) con respecto a los demás grupos del estudio. El grupo que recibió melatonina un mes después de haber sido tratado con L-Dopa presentó un valor total de 2.792, es decir 50.59% menos que el área del grupo anterior. En cuanto a los animales que recibieron la mezcla farmacológica de L-Dopa/Melatonina (desde el inicio del tratamiento, presentaron un área menor en un 80.09% (con un valor de 0.875) con respecto del grupo con L-Dopa y 59.71% menor al grupo que recibió melatonina un mes después de administrar L-Dopa,

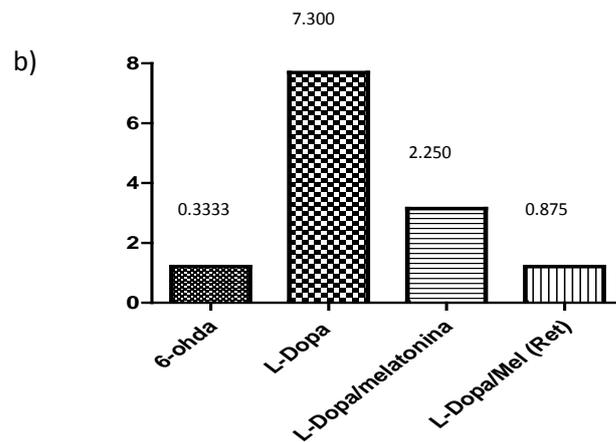
finalmente el grupo solo lesión resultó ser distinto de este grupo, obteniendo la menor área con respecto todos los grupos de este experimento con 0.991.

Durante la segunda evaluación el grupo que recibió L-Dopa durante los 2 meses que duró el estudio aumentó 22.60% la cantidad de DIL con un área total de 7.3 con respecto a la primera evaluación; el grupo que recibió melatonina tras un mes de tomar solo L-Dopa disminuyó repentinamente el valor de su área total 68.66% en comparación con el obtenido durante la primera evaluación con un área total de 0.875, siendo menor que el grupo con L-Dopa 88.02%; por su parte el grupo al que se le administró el tratamiento combinado durante todo el experimento obtuvo un área total en esta última evaluación de 2.25 aumentado 50% el área que obtuvo en la primera evaluación y difiriendo esta vez del grupo con solo L-Dopa un 69.18%. Durante esta cuarta evaluación solo lesión obtuvo un área de 0.333 disminuyendo 66.39% en comparación con el área total de la primera evaluación y siendo 95.44% menor que el área del grupo que consumió L-Dopa.

AUC del desarrollo de DIL durante la 1a ev.



AUC del desarrollo de DIL durante la 4a ev.

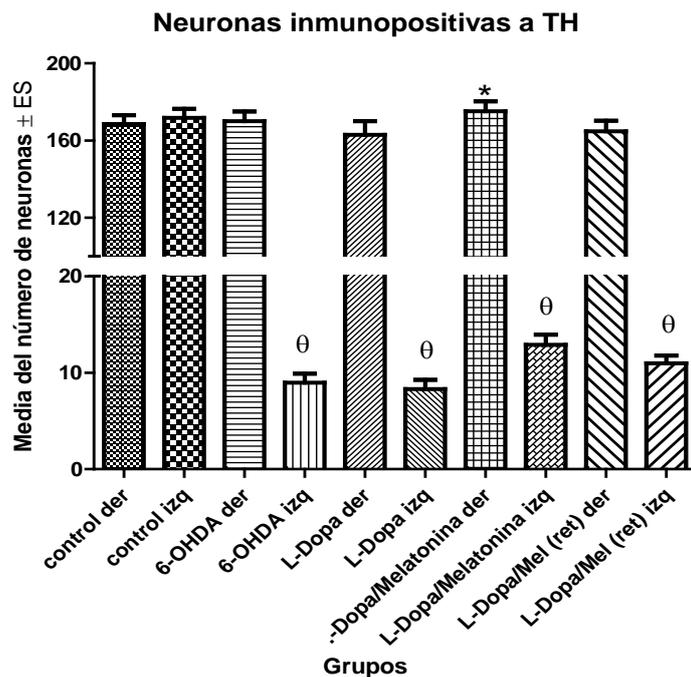


Grafica 7. Área Bajo la curva del desarrollo de DIL totales durante a) la primera evaluación, b) cuarta evaluación, En a) se observa que el grupo tratado con L-Dopa desarrollo la mayor cantidad de DIL seguido del grupo L-Dopa/Melatonina (ret), al que aun no se administraba Melatonina; mientras que el grupo que recibió L-Dopa y melatonina desde el inicio del tratamiento presentó valores menores en comparación con los grupos anteriores, comportándose de forma muy similar al grupo que solamente fue lesionado. En b) el grupo con L-Dopa/Melatonina (ret) disminuyó considerablemente la cantidad de DIL aunque los valores del AUC del grupo que ingirió la mezcla (L-Dopa/Melatonina) desde el inicio del tratamiento tendieron a acrecentarse al igual que los del grupo tratado con L-Dopa durante todo el tratamiento.

Sobrevivencia neuronal:

La gráfica 8 muestra la cantidad de células inmunopositivas para TH encontradas en la SNc de los animales a los que se les administraron los distintos tratamientos. Se observa la esperada disminución de neuronas TH de la SNc izquierda en todos los animales lesionados, no habiendo diferencias significativas entre grupos (aunque en el grupo con tratamiento combinado se observa una ligera tendencia a presentar mayor cantidad de células inmunopositivas a TH). (Figuras 8 A, B, C y D)

En el lado contralateral a la lesión no se observan diferencias significativas entre grupos, a excepción del grupo que recibió el tratamiento combinado, que presenta mayor porcentaje de células inmunopositivas a TH que el grupo tratado únicamente con L-Dopa (Figuras 9A, B, C y D)



Gráfica 8. Neuronas inmunopositivas a TH presentes en los diferentes grupos de animales, tanto del lado contralateral como ipsilateral. No existe diferencia significativa en cuanto a la cantidad de neuronas inmunopositivas a TH en el lado ipsilateral a la lesión entre los grupos tratados, aunque en el grupo tratado con la mezcla farmacológica L-Dopa/Melatonina desde el inicio del tratamiento se observa un ligero incremento de células inmunopositivas a TH. Donde * tratamientos vs L-Dopa y ⊖ tratamientos vs lesión.

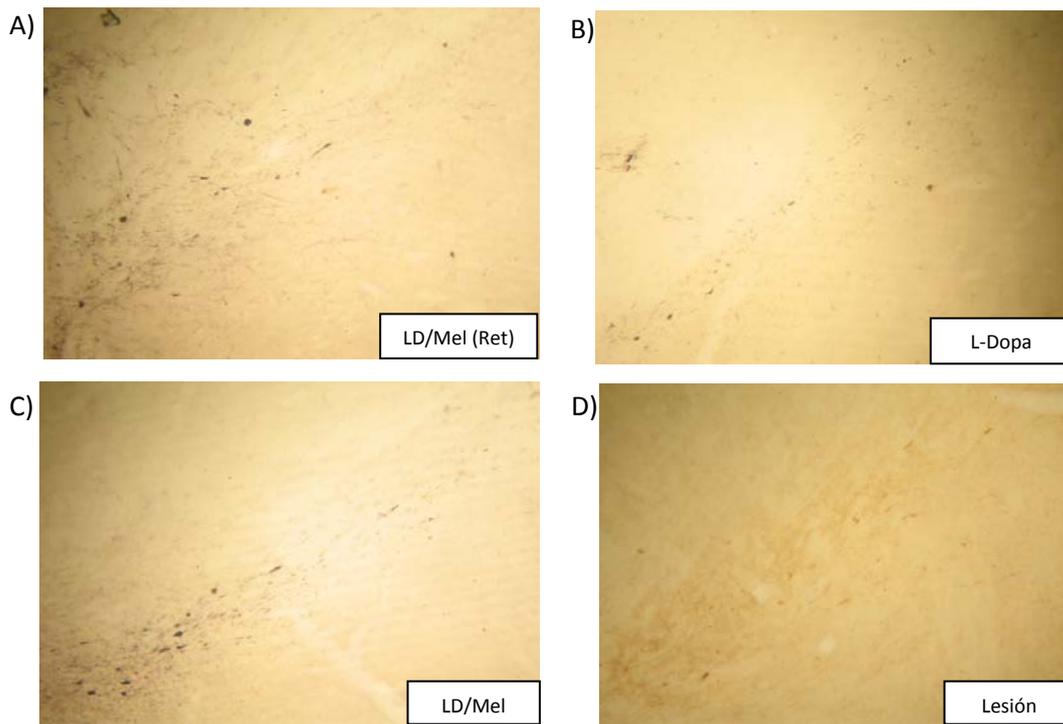


Fig. 8. SNc izquierda (ipsilateral) perteneciente a los animales lesionados con 6-OHDA. Se observa que los grupos con melatonina muestran más neuronas inmunopositivas a TH. A) LD/Melatonina (Ret), B) L-Dopa, C) L-Dopa/Melatonina y D) Lesión.

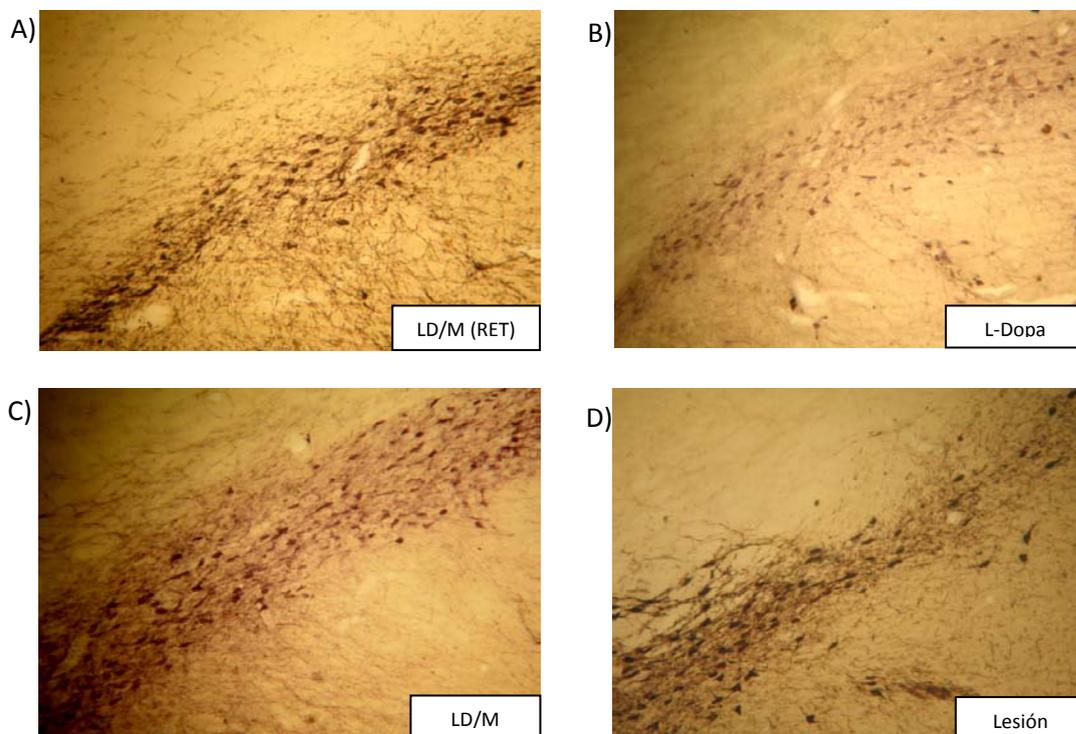


Fig. 9. SNc derecha (contralateral) perteneciente a los animales lesionados con 6-OHDA. Se observa que los grupos con melatonina muestran más neuronas inmunopositivas a TH. A) LD/Melatonina (Ret), B) L-Dopa, C) L-Dopa/Melatonina y D) Lesión.

DISCUSION

Prueba de escalera:

La prueba de escalera ideada por Montoya y colaboradores en 1991, establece un paradigma en donde el entrenamiento es relativamente sencillo y permite coleccionar datos cuantitativos y objetivos para ambas extremidades de forma independiente, además, en esta prueba las ratas se ven obligadas a mantener un control preciso para asir y recoger los trozos de comida. La tarea de utilizar las patas delanteras para llevar un pelet a la boca y comerlo resulta ser una actividad compleja para las ratas y se considera análoga a la habilidad que en actividades similares es observada en humanos; en pacientes con EP y en ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA, la ejecución de este ejercicio es anómala y a pesar de que pueden realizar completa la secuencia de movimientos y obtener el alimento exitosamente, el tiempo de ejecución es más largo y la coordinación de las partes del cuerpo es diferente en comparación con los sujetos sanos. Los movimientos de supinación y pronación son limitados y la fuerza de sujeción o contracción de los dígitos es menor a los sujetos normales (Barneoud *et al.*, 1995; Whishaw *et al.*, 1997; Whishaw *et al.*, 2002) (Figura 7).

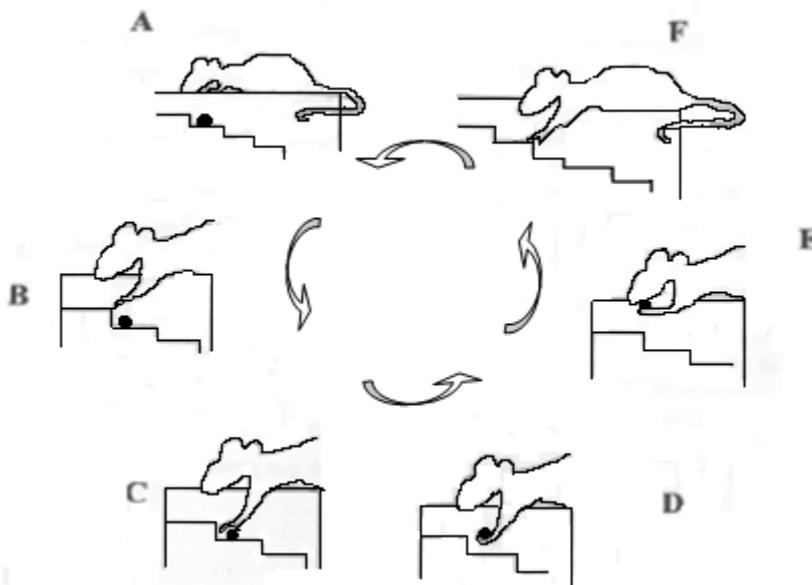


Fig. 9. Pasos que realiza una rata para tomar los trozos de comida A) localiza la comida (olfato) B) Extiende la extremidad delantera C) Abre los dígitos para asir la comida D) Levanta la comida E) La lleva a la boca C) Al terminar el ciclo, la rata intenta localizar trozos de alimento en aquellos escalones en los que ya no hay (modificado de Galván, 2000).

6-OHDA:

La deficiente destreza para asir los trozos de comida en el miembro contralateral de los animales que fueron únicamente lesionados es resultado de la inyección de 6-OHDA en el haz medial que conlleva a la depleción dopaminérgica en el estriado ventral, el cual se relaciona con el deficiente control de las extremidades anteriores manifestándose generalmente por rigidez y acinesia (Salamone *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1999); a los 42 y 56 días de tratamiento se observó una leve mejoría en cuanto a la cantidad de trozos de comida tomados por este grupo, es importante señalar que durante la prueba algunos animales, empujaban el trozo de comida contra alguna de las paredes de la caja mientras lo subían acercando a la vez su hocico para facilitar su consumo; por lo que no siempre realizaban todos los movimientos finos que se esperaban para la ejecución de esta tarea (pronación, supinación y sujeción), coincidiendo con lo reportado por Whishaw y colaboradores en 1997 donde los animales desarrollaron diversas habilidades para sujetar el alimento como aumentar la presión de los dedos, inclinación de la cabeza y frecuentemente utilizaban la lengua y los dientes; es decir desarrollan otras habilidades para obtener la comida.

L-Dopa:

El grupo tratado con L-Dopa hasta los 21 días de tratamiento presentó menor destreza en el miembro contralateral para tomar los trozos de comida incluso en mayor cantidad que en el grupo solo lesión, este comportamiento podría ser consecuencia de las DIL, las cuales se exacerbaron por la ausencia de alimento que incrementó la absorción de la L-Dopa, puesto que las dietas ricas en proteínas interfieren el paso de la L-Dopa a nivel de la Barrera Hematoencefálica (BHE) (Nutt *et al.*, 1984; Pincus *et al.*, 1987). Es importante señalar que las DIL fueron más evidentes los días en que se realizó esta prueba, ya que los animales debían estar privados de alimento, lo que posiblemente facilitó la absorción de L-Dopa, y por consiguiente, las DIL fueron más evidentes dificultando la habilidad de tomar los pellets de los escalones, por el contrario cuando los animales tenían acceso a la ingesta de alimento las discinesias se

presentaron en menor cantidad, seguramente porque la absorción duodenal de la L-Dopa utiliza los mismos mecanismos que para el resto de los aminoácidos aromáticos, por lo que una dieta rica en proteínas dificulta dicha absorción; es por ello que a pacientes con EP se les recomienda que eviten o reduzcan la ingesta de proteínas (Zarranz,2004); además, es importante considerar que la motivación que lleva al animal a coger los trozos de comida es la restricción del alimento (Montoya *et al.*,1991) generando en el animal un estado de ansiedad y promoviendo la realización de movimientos rápidos y poco precisos de las extremidades delanteras, lo que dificulta la prueba (Smith y Metz, 2001).

L-Dopa/Melatonina (Ret)

El grupo al que se le administró melatonina un mes después de haber sido tratado inicialmente con L-Dopa manifestó un comportamiento similar al grupo tratado con L-Dopa en esta prueba, probablemente el tiempo de administración de melatonina es reducido para evidenciar mejoría en la conducta motora fina, pues en la viga si se observa cierta tendencia a mejorar la actividad motriz; por lo que puedo sugerir incrementar el tiempo de tratamiento en futuros experimentos.

L-Dopa/melatonina:

El grupo con tratamiento combinado desde el inicio del experimento mostró tendencia a los niveles basales a partir del día 14 post tratamiento,, a diferencia de los datos obtenidos por García-Ruíz en el 2008, donde el grupo con tratamiento combinado, mostró ser efectivo hasta después de 28 días de tratamiento, por tal motivo puedo decir que el grupo que recibió la mezcla farmacológica promovió mayor actividad en las extremidades contralaterales que los animales de los demás grupos, sobre todo a los 21, 28 y 35 días de tratamiento. Rocchitta y cols. en el 2006, realizaron un estudio en donde evidencian que la melatonina endógena evita la autooxidación de la L-Dopa exógena además observaron que la coadministración de melatonina y L-Dopa aumenta la biodisponibilidad de la L-Dopa en el estriado. De igual forma Maharaj y cols. en el 2005 demostraron que la administración de melatonina decrementa

la producción de 6-OHDA generada por la administración de L-Dopa en el estriado de rata.

Prueba de la viga

La prueba de la viga es un método que permite observar movimientos estereotipados espontáneos, coordinación (Jinnah y Hess, 2004) y deficiencias motoras (función motora gruesa) características de la EP en un modelo animal, al analizar la precisión en que los animales se desplazan sin caer de la viga ascendente manteniéndose en ella (Allbutt y Henderson, 2007).

El dispositivo que utilizamos implicó mayor dificultad para su ejecución por la marcada diferencia en el espesor de las vigas (6 y 12 mm), además de que al colocarse diagonalmente a 15° con respecto al piso requirió mayor esfuerzo para mantener una posición estable (García-Ruíz, 2008). Otros estudios han relacionado el aumento en el tiempo de ascenso sobre vigas inclinadas de distintos grosores con el deterioro en la SNc y la pérdida de inmunoreactividad TH en ratas lesionadas con 6-OHDA en haz medial (mfb) en comparación con animales control (Avila-Costa *et al.*, 2007).

6-OHDA:

Se ha reportado la existencia de una relación dosis dependiente entre la concentración de la toxina inyectada (y por tanto el grado de depleción) y el aumento en el tiempo de inicio del movimiento o latencia y en el tiempo total de transcurso en una viga horizontal (Truong *et al.*, 2006; Allbutt y Henderson, 2007), lo que coincide con los resultados obtenidos en este experimento, donde el grupo solo lesión tendió a incrementar los tiempos de recorrido en ambas vigas; es importante mencionar que los animales de este estudio presentaron rigidez y extrema precaución para ejercer cada movimiento, en este estudio se observó que con frecuencia las ratas se detenían y posteriormente reanudaban el movimiento ascendente; esta interrupción en la secuencia de movimientos es análoga a lo observado en pacientes con EP (Sharma, 2008). Es posible que esta conducta se deba a la sobreexcitación del núcleo subtalámico, que al estimularlos núcleos de salida, éstos promuevan sobreinhibición en el tálamo y

la corteza, lo que produciría deficiencias motoras en las extremidades (Truong *et al.*, 2006), además la estimulación de la SNr bloquea la actividad del Núcleo Pedúnculo pontino (NPP) produciendo rigidez y alteraciones en el paso (Takakusaki, 2008). Allbutt y colaboradores en el 2007 realizaron un estudio en ratas lesionadas unilateralmente en el mfb y evaluaron la conducta motora en una viga de madera donde los animales lesionados resultaron 4 veces más lentos tanto para iniciar el trayecto sobre la viga como en el tiempo para cruzarla, concluyendo que estas alteraciones motoras se correlacionan con la pérdida de las neuronas DA.

L-Dopa:

En ambas vigas, los animales tratados con L-Dopa tendieron a aumentar el tiempo de recorrido sobre ellas, estos resultados concuerdan con datos previamente reportados en nuestro laboratorio en donde las ratas tratadas con L-Dopa mostraron recuperación de la actividad motora en los primeros días de tratamiento (hasta el día 21), pero a partir de los 28 días post tratamiento incrementaron también el tiempo de recorrido (Gutiérrez, 2007; García-Ruiz, 2008), de igual forma Winkler y colaboradores en el 2002 observaron que la L-Dopa producía mejoría en el desplazamiento, independientemente de la aparición de las AIMs hasta los primeros 28 días, sugieren también que la lesión aguda con 6-OHDA interfiere en la mejora que podría brindar la L-Dopa al reducir considerablemente el tiempo de beneficio terapéutico de este fármaco. Se ha reportado además, que pacientes tratados con L-Dopa que mostraron tener beneficio entre los primeros 3 y 6 meses de tratamiento, comenzaban a manifestar deterioro acompañado del incremento constante de complicaciones como inducción de DIL con dosis menores de L-Dopa y movimientos involuntarios después de cierto tiempo con el tratamiento (Otero-Siliceo; 1996). Así mismo, el tratamiento prolongado con L-Dopa produce rigidez y bradicinesia, dejando de ser efectivo y dando paso a los periodos *wearing off*; por tal motivo varios autores han determinado que pese a que la L-Dopa sigue siendo el fármaco más eficiente para contrarrestar los síntomas de la EP; el tratamiento crónico con éste medicamento, desarrolla efectos adversos como las

DIL, las cuales pueden llegar a tener cierto efecto discapacitante (Blanchet *et al.*, 1994; Calabresi *et al.*, 2010).

L-Dopa/Melatonina y L-Dopa/Melatonina (Ret):

Por su parte los animales del grupo tratado con L-Dopa/Melatonina subían empleando tiempos muy semejantes al grupo control. De manera que la melatonina contribuyó a la recuperación de la capacidad de coordinación del movimiento de las extremidades haciendo más fluido y por tanto más rápido el movimiento de ascenso por la viga. Existen reportes sobre reversión de hipocinesia en pacientes con EP tratados con altas dosis de melatonina (Antón-Tay *et al.*, 1971). Incluso se ha observado que la melatonina revierte las DIL generadas por la L-Dopa en ratones lesionados en el estriado (Cotzias *et al.*, 1971), lo que probablemente facilitó el ascenso de los animales por las vigas. Gutiérrez en el 2007 observó que ratas tratadas solamente con melatonina mejoraron el tiempo de recorrido a los 21 días de tratamiento, esta mejoría fue aun más evidente a los 28 días de tratamiento momento en el cual los animales que fueron tratados con L-Dopa comenzaron a elevar el tiempo de recorrido; este hecho no fue tan marcado en el grupo al que se le administró melatonina un mes después de haber ingerido solamente L-Dopa, pues seguramente la administración de la indolamina evitó que se elevara el tiempo de recorrido tanto como sucedió en el grupo que recibió solamente L-Dopa.

DIL/AIMs

Es bien sabido que la L-Dopa es el fármaco más efectivo para tratar los síntomas de la EP en las etapas iniciales, sin embargo, después de varios años de tratamiento la mayoría de los pacientes comienzan a desarrollar efectos adversos, entre los que figuran las discinesias que afectan a más del 50% de los pacientes en tratamiento con L-Dopa (Nutt *et al.*, 2002; Carlsson *et al.*, 2005; Calabresi *et al.*, 2010). En este estudio se observó que el grupo tratado exclusivamente con L-Dopa durante todo el tiempo de experimentación manifestó los 4 subtipos de DIL, siendo las orolinguales las de mayor severidad, y de hecho, fue el único subtipo que manifestaron todos los animales en algún

momento del experimento; Boulet y colaboradores en el 2006 reportan que al estimular el NST de ratas, el umbral para iniciar los movimientos orolinguales es menor que el que se requiere para exhibir los demás subtipos de DIL. Un año después Putterman y cols. propusieron que la expresión de un subtipo u otro de AIMs podría estar relacionado con la dosis de L-Dopa, en donde dosis a partir de 3 mg/kg (considerando que la dosis de L-Dopa utilizada en este estudio fue de 7.5 mg/kg) es suficiente para inducir un incremento significativo sobre el puntaje de AIMs orolinguales y en la extremidad contralateral, mientras que se requieren dosis mayores de 4 mg/kg para desarrollar discinesias axiales o giro, de tal modo que es probable que por ello los demás subtipos de AIMs se presentaron en menor cantidad, sobre todo la conducta de de giro inducida por L-Dopa.

Se ha reportado que la mayor cantidad de discinesias se presentan en los primeros minutos tras la administración la L-Dopa, cuando el fármaco genera los efectos máximos para combatir los síntomas parkinsonianos, de ahí el término discinesias de pico de dosis o de etapa *ON* (Cenci *et al.*, 2009). En la Gráfica 6 se observa que, pese a que no existieron diferencias significativas entre grupos, la tendencia al desarrollo de AIMs a los 15 días del experimento fue mayor entre los 40 y los 80 min post-tratamiento, mientras que a los 56 días esta actividad se manifestó de manera temprana, pues los animales presentaron AIMs incluso antes de la administración del fármaco (minuto -20) y una vez que éste fue administrado, la cantidad de DIL incrementó súbitamente hasta el minuto 40 mientras que a los 15 días de tratamiento apenas comenzaban a manifestarse. La diferencia en cuanto a la cantidad de DIL entre ambas evaluaciones es más notoria en la gráfica 7, donde se observa un área bajo la curva mayor en la última evaluación en un 22.60%. Posiblemente, el tiempo de tratamiento con L-Dopa exacerbó las DIL al incrementar la hipersensibilidad de receptores dopaminérgicos y por este motivo los animales exhibieron DIL más severas incluso antes de la administración del tratamiento; es probable también que el tiempo de beneficio de la L-Dopa disminuyera, por lo que las DIL se manifestaban en un tiempo más corto (Calabresi, 2010), sin embargo, es necesario incrementar el tiempo de tratamiento y observar si esta tendencia se mantiene.

6-OHDA

El grupo solo lesión, presentó AIMs orolinguales y en la extremidad contralateral pese a no haber tomado L-Dopa. Estas alteraciones podrían estar relacionadas con la propia lesión debido a que se han reportado AIMs orolinguales en ratas lesionadas con 6-OHDA que no recibieron tratamiento alguno (Pollack *et al.*, 1999); además de exhibir déficits motores y AIMs en la musculatura axial y en la extremidad delantera contralateral a la lesión similares a las que se desarrollan animales en tratamiento con L-Dopa (Pollack *et al.*, 1999).

Algunos estudios han mostrado que la denervación dopaminérgica generada por la lesión con 6-OHDA induce un incremento en la cantidad de ARNm para met-enkefalina (Gerfen *et al.*, 1991), el cual es aún mayor cuando se administra L-Dopa (Bezard *et al.*, 2001 y Gross *et al.*, 2003). Este péptido, se encuentra en las neuronas del núcleo estriado que proyectan hacia el GPe (vía indirecta), además de que diversos estudios han sugerido que la activación de receptores del subtipo D2 participan en el desarrollo de DIL (Wang *et al.*, 2001; Zappia *et al.*, 2002; Monville *et al.*, 2005), por lo que, la lesión podría promover el desarrollo de AIMs alterando la actividad de la vía indirecta.

L-Dopa/Melatonina

El grupo que recibió la combinación de L-Dopa/Melatonina desde el inicio del tratamiento fue el que menor cantidad de AIMs manifestó, incluso no presentó giro a diferencia de los grupos que recibieron únicamente L-Dopa en algún momento del experimento. De alguna manera la melatonina tiene cierta influencia sobre la aparición de DIL. Se ha reportado que en pacientes esquizofrénicos que manifiestan Discinesias Tardías (DT) la administración de melatonina en dosis de 10 mg/kg al día disminuyen considerablemente la cantidad de DT en comparación con pacientes que recibieron placebo (Adler *et al.*, 1998). Tanto las DT en la esquizofrenia al igual que las DIL en la EP han sido relacionadas con la hipersensibilidad de receptores DA (Cardoso *et al.*, 1997) producto de constantes fluctuaciones en la concentración de DA extracelular en

el núcleo estriado (Calabresi, 2010); es probable que la melatonina disminuya dichas fluctuaciones puesto que algunos estudios han mostrado que la melatonina es capaz de restaurar los contenidos de DA y de sus metabolitos en ratas lesionadas con 6-OHDA, inhibiendo ciertos comportamientos estereotipados como la conducta de giro (Kim *et al.*, 1998; Aguiar *et al.*, 2002), por lo que es probable que la reducción de DIL se deba al efecto neuroprotector de la melatonina sobre las neuronas dopaminérgicas a causa de sus propiedades como antioxidante, barredor de RL y ERO y su capacidad para regular la expresión génica de enzimas antioxidantes; estas características le confieren a las células protección a nivel de membrana mitocondrial y ADN (Reiter *et al.*, 2003; Mayo *et al.*, 2002; Sofic *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2006; Maharaj *et al.*, 2007). Aunado a esto, algunos autores consideran que la melatonina podría actuar como modulador sobre la liberación de DA por el efecto que la indolamina ha mostrado tener sobre los receptores D1 y D2, que son los receptores dopaminérgicos implicados en la conducta motora (Blanchet, 1995). Aunque el papel de ambos receptores sobre la generación de discinesias no es del todo claro, pues se han reportado alteraciones en la expresión, localización y función de ambos receptores en animales que desarrollan discinesias. Los reportes indican que las alteraciones están mediadas por los receptores D1 (Cenci *et al.*, 2007; Calabresi *et al.*, 2008; Calabresi *et al.*, 2010) y otros señalan a los receptores D2 como los principales promotores del desarrollo de DIL (Delfino *et al.*, 2004; Fabbrini *et al.*, 2007). Pese a que la controversia continúa, estudios como el de Taylor y cols. en el 2005 sugieren que tanto D1 como D2 tienen efectos similares en el desarrollo de los diferentes subtipos de DIL. En relación con esto, la melatonina ha mostrado cierta influencia sobre ambos tipos de receptores dopaminérgicos. En cuanto a los receptores D1, la melatonina es capaz de aumentar su número y su afinidad; mientras que sobre los receptores D2 se observó que la melatonina influye sobre el aumento de la afinidad pero no el número de receptores (Aguiar *et al.*, 2002).

Por otro lado, se ha visto que la melatonina atenúa la respuesta excitatoria producida por la liberación de glutamato de la corteza hacia el estriado pues su

administración promueve el decremento en el flujo de calcio en las células estimuladas, además se sabe que esta neurohormona suprime la activación de receptores NMDA (Escames *et al.*, 1996;), los cuales están involucrados en la generación de LTP (Long Term Potenciation, por sus siglas en inglés), este tipo de disparo, se ha visto exacerbado en animales discinéticos; existen estudios que revelan que tras la administración crónica de L-Dopa, el estriado pierde la capacidad de depotenciación para pasar a un LTD (Long Term Depression, por sus siglas en inglés) (Expositio *et al.* 1995; Calabresi *et al.*, 2010), de este modo la melatonina restaura la actividad sináptica fisiológica generada por la denervación DA en el estriado y reduce la excitotoxicidad del ambiente.

L-Dopa/Melatonina (Ret)

El grupo que recibió melatonina un mes después de haber sido tratado únicamente con L-Dopa apoya la efectividad de la melatonina sobre la disminución de DIL, pues aunque los animales manifestaron los 4 subtipos no igualan los valores del grupo que recibió solamente L-Dopa durante todo el experimento. Aunque es importante mencionar que los valores totales de DIL fueron diferentes a los que se observaron en el grupo que recibió solamente L-Dopa en el primer mes de tratamiento. Esta situación puede explicarse en base a que no todos los animales lesionados con 6-OHDA desarrollan discinesias (Cenci *et al.*, 2007; Calabresi *et al.*, 2010). Aún así, en la gráfica 7 se observa cierta tendencia a la reducción del puntaje de AIMs tras la adición de melatonina al tratamiento con L-Dopa en el mismo grupo, pues el valor del área bajo la curva es menor en un 68.66% en la última evaluación con respecto de la primera.

Sobrevivencia Neuronal

La lesión unilateral en el mfb reduce el número de neuronas inmunorreactivas a TH en la SNc ipsilateral en un porcentaje mayor a 90% (Allbutt y Henderson, 2007). En este estudio el número de neuronas inmunoreactivas a TH en el lado ipsilateral a la lesión, disminuyó de igual forma en todos los grupos experimentales. A pesar de que no se observan diferencias significativas entre grupos es posible observar cierta tendencia al incremento de células inmunopositivas a TH en el grupo L-Dopa/Melatonina desde el principio del experimento. García-Ruíz en el 2008 observó incremento marcado en el número de células inmunopositivas a TH en animales tratados con L-Dopa y melatonina por un periodo de 6 meses. Como ya se mencionó, la melatonina es capaz de retrasar el proceso apoptótico (Reiter *et al.*, 2003) y puede incrementar la actividad de la TH por varios procesos entre los que figuran la interacción con el GDNF (Glial Derived Neurotrophic Factor), un potente factor de supervivencia de neuronas dopaminérgicas que puede estimular la síntesis TH, por tanto, al promover la expresión de genes que codifican para GDNF indirectamente también estimula la producción de TH (Sharma *et al.*, 2006). Es posible que se requiera de mayor tiempo de tratamiento para hacer más notorio el incremento en la actividad de la TH en la SNc, no obstante, los resultados conductuales arrojan datos positivos en cuanto a la conducta motora; es probable que estos resultados se evidencien a nivel postináptico, es decir en el núcleo estriado, pues se ha reportado decremento en los niveles de peroxidación de lípidos por la administración de melatonina (Gutiérrez *et al.*, 2007). Es posible entonces, que las neuronas dopaminérgicas remanentes de la SNc aumenten su efectividad reduciendo los niveles de muerte celular.

CONCLUSIONES:

- El Grupo al que se le administró la combinación de L-Dopa/Melatonina desde el inicio del tratamiento manifestó mayor precisión motora, tanto en la prueba de viga como en la escalera, en comparación con el grupo solo lesión y el tratado con L-Dopa.
- La co-administración de L-Dopa y la melatonina ayuda a reducir las alteraciones motoras inducidas por de la administración de L-Dopa, aún iniciado el tratamiento con L-Dopa.
- Es posible que la melatonina favorezca la supervivencia de neuronas inmunoreactivas a TH en la SNc.

REFERENCIAS

Acuña-Castroviejo D., Escames G., Carazo A., Leon J., Khaldy H. and Reiter R. 2002. Melatonin mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr Topics Med Chem.* 2(2):133-151.

Adler C., and Ahlskog J. 2000 Parkinson's Disease and Movement Disorders, Diagnosis and treatment Guidelines for the Practicing Physician. Humana Press Totowa, New Jersey, U.S.A., pp. 474.

Adler L., Edson R., Lavori P., Peselow E., Duncan E., Rosenthal M., Rotrosen J. 1998. Long-term treatment effects of vitamin E for tardive dyskinesia. *Biol Psychiatry.* Jun 15;43(12):868-72.

Afifi A. y Bergman R. 1999. Neuroanatomía funcional. McGraw Hill Barcelona España.

Aguiar L., Vasconcelos S., Sousa F., Viana G. 2002. Melatonin reverses neurochemical alterations induced by 6-OHDA in rat striatum. *Life Sci.*;70(9):1041-51.

Alanis Q. 1996. Historia Natural de la Enfermedad de Parkinson. En Otero-Siliceo. 1996. Parkinson enfoque al futuro. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Fondo de Cultura Económica. México pp. 11-17.

Albin L., Young A. y Penney J. 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neuroscience.* 12(10):366-375.

Alexander G. y Crutcher M. 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in Neuroscience* 13 (7): 226-271.

Alexi T., Borlongan C., Faull R., Williams C., Clark R., Gluckman P. and Hughes P. 2000. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog Neurobiol.* 60(5):409-70.

Allbutt N. y Henderson M. 2007. Use of the narrow-beam test in the rat, 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Methods,* 159:195-202.

Andersen J. 2004. Oxidative Stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature review.* S18.S25.

Antigüedad Z. 2004. Enfermedades Neurodegenerativas. Minusval, Ministerio de trabajo y asuntos sociales. Madrid, España. 144:17-19.

Antón-Tay F., Díaz J., Fernández-Guardiola A. 1971. On the effect of melatonin upon human brain. Its possible therapeutic implications. *LifeScil.* 10(15):841-50.

Aosaki T., Kimura M. y Graybiel A. 1995. Temporal and spatial characteristics of toxically active neurons of the primate's striatum. *J. Neurophysiology* 73(3):1234-52.

Apicella P. 2007. Leading of tonically active neurons of the striatum for reward detection to context recognition. *Trends in Neurosciences*, 30(6): 299-306.

Arana M. 2006. Melatonina, estrés oxidativo y osteointegración en la cavidad oral. Tesis para obtener el grado académico de Doctor en Odontología. Universidad de Granada España.

Arias-Carrión. 2008. Terapia celular para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. *Revista Medica Universitaria*. 52(2) pp. 17-24.

Avila-Costa M., Anaya M., Ordoñez J., Gutiérrez A., Montiel F., Colín-Barenque L. Aley-Medina P., Espinosa-Villanueva J., Reynoso-Erazo L. y Fortoul T. I. 2007. Synaptic Alterations of the striatum: Two different Models of Dopamine deafferentation. *En Neural Synapse Research Trends*. Nova Science Publishers. 310p.

Avila-Costa R., Colin-Barenque L., Espinoza V. y Machado S. 1998. Degeneración del neuropilo del núcleo caudado en la enfermedad de Parkinson y en el modelo experimental provocado con 6-OHDA: Análisis Ultraestructural comparativo. *Patología México* 36: 297-301.

Bahena-Trujillo R., Flores G. y Arias-Montaña J.A. 2000. Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central. *Biomed*. 11:39-60.

Barneoud P., Parmentier S., Mazadier M, Miquet J., Boireau A., Dubédats P., Blanchard J. 1995. Effects of complete and partial lesions of the dopaminergic mesotelencephalic system on skilled forelimb use in the rat. *Neuroscience*. Aug;67(4):837-48.

Barnham K., Masters C., Bush A. 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress *Nature Reviews* 3, 205-214.

Beal M. 2001 Experimental models of Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci*. 2: 325–332.

Beker A.B. and Jont R.J. 1990. Extrapiramidal disease. En: *clinical neurology*. Vol. 3 Chap 38 1-67.

Bertarbet R., Shered T. and Grenamyre J. 2002. Animal Models of Parkinson's disease. *BioEssay* 24: 308-318.

Bezard E., Ravenscroft C., Gross A., Crossman and Brotchie J. 2001. Upregulation of striatal preproenkephalin gene expression occurs before the appearance of parkinsonian signs in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine monkeys, *Neurobiol. Dis.* 8 343–350.

Bibbiani F., Oh J., Chase T. 2000. Serotonin 5-HT1A agonist improves motor complications in rodent and primate parkinsonian models. *Neurology*;57:1829-1834.

Blanchet P., Boucher R. and Bedard P. 1994. Excitotoxic lateral pallidotomy does not relieve L-Dopa induced dyskinesias in MPTP parkinsonian monkey. *Brain Res*, 650 32-39.

Blanchet P., Gomez-Mancilla B., Bédard P. 1995. DOPA-induced "peak dose" dyskinesia: clues implicating D2 receptor-mediated mechanisms using dopaminergic agonists in MPTP monkeys. *J Neural Transm Suppl.*;45:103-12.

Bluml., Leiba S. 1980. Increased hair loss as a side effect of bromocriptine treatment, *N. Engl. J. Med.*, 303:1418.

Bonuccelli U. and Del Dotto P. 2006. New pharmacologic horizons in the treatment of Parkinson disease. *Neurology* 67(Suppl 2):S30–S38

Bonuccelli U., Piccini P., Del Dotto P., Rossi G., Corsini G., Muratorio A. 1993. Apomorphine test for dopaminergic responsiveness: a dose assessment study, *Mov Disord. Apr.*;8(2):158-64.

Boulet S., Lacombe E., Carcenac C., Feuerstein C., Sgambato-Faure V., Poupard A., Savasta M. 2006. Subthalamic stimulation-induced forelimb dyskinesias are linked to an increase in glutamate levels in the substantia nigra pars reticulata. *J. Neurosci.* 26(42):10768-76.

Brotchie J. 2005. Non dopaminergic mechanism in levodopa-induced dyskinesias. *Mov Disorders* 20:919-931.

Cajochen C., Kraüchik. and Wirz-Justice A. 2003. Role of melatonin in the regulation of human circadian rhythms and sleep. *J Neuroendocrinol* 14:432-437.

Calabresi P., Di Filippo M., Ghiglieri V. and Picconi B. 2008. Molecular mechanisms underlying levodopa-induced dyskinesia. *Mov. Disord.*;23 Suppl 3:S570-9.

Calabresi P., Di Filippo M., Ghiglieri V., Tambasco N. and Picconi B. 2010. Levodopa-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease: filling the bench-to bedside gap. *Lancet Neurol.* Nov; 9(11):1106-17.

Cánovas A., Luquin P., García-Ruiz-Espiga., Burguerad J., Campos A., Castrof A., Linazasorog G., López del Valle J., Velai L. y. Martínez-Castrillo J.C 2011. Agonistas dopaminérgicos en la enfermedad de Parkinson. *Neurología.* 237: 1-12.

Cardoso F., Jankovic J. 1997 Dystonia and dyskinesia. *Psychiatr Clin North Am.*(4):821-38.

Carlsson T., Winkler C., Burger C., Muzyczka N., Mandel R., Cenci A., Björklund A. and Kirik D. 2005. Reversal of dyskinesias in an animal model of Parkinson's disease by continuous L-Dopa delivery using rAAV vectors *Brain* (128): 559–569.

Cenci M. and Lingdren. 2007. Advanced in understanding L-Dopa-induced dyskinesias. *Current opinion in neurobiology*; 17:665-671.

Cenci M. and Ohlin KE. 2009. Rodent models of treatment-induced motor complications in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord. Suppl* 4:S13-7.

Cenci M., Lee C., Björklund A. 1998. L-Dopa-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *Eur J Neurosci. Aug*;10(8):2694-706.

Chang W., Wachtel R., Young D. y KangU. 1999. Biochemical and anatomical characterization of forepaw adjusting steps in rat models of Parkinson's disease: studies on medial forebrain bundle and striatal lesions. *Neuroscience*, 88(2): 617-628.

Colín-Barenque L., Fortoul T. 2007. Metals and Toxicological Implications in Health. *Research Signpost* 37/661(2):1-11.

Corti O., Hampe C., Darios F., Ibañez P., Ruberg M. y Bricea A. 2005 Parkinson's Disease. From causes to mechanisms *C.R. Biologies*, 328: 131-142.

Costa E., Lopes R., Lamy-Freund M. 1995. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J Pineal Res. Oct*;19(3):123-6.

Cotzias G., Tang L., Miller S., Ginos J. 1971. Melatonin and abnormal movements induced by L-Dopa in mice. *Science*. 173(3995):450-2.

Cubo E., Gracies J., Benabou R., Olanow C., Raman R., Leurgans S., Goetz C. 2001. Early morning off-medication dyskinesias, dystonia, and choreic subtypes. *Arch Neurol. Sep*;58(9):1379-82.

Dabbeni S., Di Santo S., Franceschini D., Skaper S., Giusti P. 2001. Melatonin protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity in rats: a role for mitochondrial complex I activity. *FASEB J Jan*;15(1):164-170.

Dauer W. and Przedborski S. 2003. Parkinson's disease. Mechanisms and models. *Neuron* 39: 889-909.

Dawson T. and Dawson V. 2003. Molecular Pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science*. 302 (31); 819-822.

Deane K., Jones D., Ellis-Hill C., Clarke C., Playford E., Ben-Shlomo Y. 2008. *Fisioterapia para la enfermedad de Parkinson. (Revisión Cochrane traducida). Issue 3. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.*

Delfino M., Stefano A., Ferrario J., Taravini I., Murer M and Gershanik O. 2004. Behavioral sensitization to different dopamine agonists in a parkinsonian rodent model of drug-induced dyskinesias. *Behav Brain Res*. 152(2):297-306.

DeMuro L., Nafziger N., Blask E., Menhinick M. y Bertino S. 2000. The absolute bioavailability of oral melatonin. *J. Clin. Pharmacol.* 40:781-784.

Deumens R., Blokland A., Prickaerts J., 2002. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA-lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp. Neurol.* 175, 303–317.

Deus J., Pujol J. y Espert R. 1996. Memoria y Ganglios Basales: una revisión teórica. *Psicología Conductual* 4(3): 337-361.

Dexter D., Carter C., Wells F., Javoy-Agid F., Agid Y., Lees A., *et al.* 1989^a. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem*; 2:381–9.

Dexter D., Wells F., Lees A., Agid Y., Jenner P. and Marsden. 1989^b. Increased nigral Iron content and alteration in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J. Neurochem* 52:1830-1836.

Di Giovanni G. y Esposito E. 2007 "The basal Ganglia pathophysiology: Recent Advances. Society transworld Research network. India. 225–252.

Ebadi M. and Ronald F. 2005. *Parkinson's Disease*. CRC PRESS, USA.

Elmyra V. and Robert A. 2008. Levodopa-Induced Dyskinesias in Parkinson's Disease: Etiology, Impact on Quality of Life, and Treatments. *Eur Neurol*;60:57–66.

Esposito I., Mpra F., Zisapel N. and Oaknin S. 1995. The modulatory effect of melatonin on modulatory interaction in the anterior hypothalamus during ageing. *Neuroreport* 6: 2399-2403.

Fabbrini G., Brotchie J., Grandas F., Nomoto M., Goetz C. 2007. Levodopa-induced dyskinesias. *Mov Disord.* Jul 30;22(10):1379-89; quiz 1523.

Feng Z., Qin Chang Yang., and Juan-tian Zhang. 2006. Early melatonin supplementation alleviates oxidative stress in transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Free Radical Biology & Medicine* 40: 101-109.

Ferrer V., Jorge-Fonseca C., Cutido-Clavel L., García-Rodríguez E. y Arce-Gómez. 1999. Radicales libres y su papel en la homeostasis neuronal. *Medisan*; 3 (3):5.11.

Galpern R. y Cudkovicz E. 2007. Coenzyme Q treatment of neurodegenerative diseases of aging. *Mitochondrion*, 7S: S146-S153.

Galván Z. 2000. Papel de la inervación dopaminérgica al Globo Pálido en la actividad motora de la rata. Tesis Doctoral, Dpto. Fisiología; Biofísica y Neurociencias. CINVESTAV-IPN.

García-Miniet R., Alberti-Amador E. and Catellano-Ortega M.R. 2003 Terapia génica ex vivo en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. *Neurol* 36 (11):107-1077.

García-Muñoz M., Reid-L., Arbuthnott G. 2010. Functional Anatomy: Dynamic state in Basal Ganglia Circuits. *Frontiers in Neuroanatomy*.4(144).

García-Ruiz R. 2008. Efecto de la Melatonina y la L-Dopa en ratas lesionadas con 6-OHDA a diferentes tiempos. Tesis para obtener el Título de Biólogo. FES-Iztacala, UNAM.

Gauthier J., Parent M., Levesque M., Parent A. 1999. The axonal arborization of single nigrostriatal neurons in rats. *Brain Res.*, 834(1-2):228-232.

Gerfen C. 1992. D1 and D2 dopamine receptor regulation of striatonigral and striatopallidal neurons. *Seminars in Neuroscience*; 4(2): 109-118.

Gerfen C., McGinty J., Young W. 1991. Dopamine differentially regulates dynorphin, substance P, and enkephalin expression in striatal neurons: in situ hybridization histochemical analysis, *J. Neuroscience* 11: 1016–1031.

Gersenowies J. 2000. Historia de la Anatomía Animal comparada. Lecturas de anatomía animal comparada, Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM.

Gibb W. and Less A. 1991. Anatomy pigmentation ventral and dorsal suboculations o the sustantia nigra and differential cell death in Parkinson's Disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 54: 388-396.

Glinka Y., Tapon K., y Youdimi, M. 1998. Mechanism of inhibition of mitochondrial respiratory complex 1 by 6-Hidroxydopamine and its prevention by ferrioxamine. *Eur. J. Pharmacolo.* 35: 121-129.

Gongora-Alfaro J., Moo-Puc R., Villanueva T.J., Arankowsky-Sandoval G., Álvarez –Celbera F., Pineda-Cortes J., Heredia-López F. y Bata-García J. 2005. La cafeína y los antagonistas de los receptores A2A de la adenosine como posibles adyuvantes de la terapia anticolinérgica en la enfermedad de parkinson. *Rev. Biomed.* 16:99-111.

Gonzales-Fraguela M., Castellano-Benítez O., Gonzales H. 1999. Estrés oxidativo en las neurodegeneraciones *Rev. Neurol*, 504-511.

Gowers W. 1888. *Diseases of the Nervous System*. P. Blakiston, Son & Co, Philadelphia 95(6):603-605.

Grau-Veciana J. 2006. Tratamiento de los síntomas no cognitivos de la enfermedad de Alzheimer. *Rev. Neurol* 48(8) pp. 282-288.

Gross C., Ravenscroft S., Dovero M., Jaber B., Bioulac and E. Bezard. 2003. Pattern of levodopa-induced striatal changes is different in normal and MPTP-lesioned mice, *J. Neurochem.* 84: 1246–1255.

Gurutz L. y Nadège V. 2005. Discinesias inducidas por levodopa en la enfermedad de Parkinson. *Ars Medica*, Madrid 1-71 pp.

Gutiérrez V. 2007. Comparación del Efecto de Diferentes Fármacos en un modelo animal de la Enfermedad de Parkinson. Tesis para Obtener el Grado de Maestra en Ciencias Biológicas. FES-Iztacala UNAM.

Guttman. 1997. 11c RT1-32 PET studies of the dopamine transporter in early dopa-naïve Parkinson's disease: implication for the symptomatic threshold, *Neurology* 48(6), pp 1578-1583.

Hadj-Bouziane F. 2003. Role of the basal Ganglia in conditional associative learning a multidisciplinary research. University Claude Bernard- Lyon.

Hattori N., Wang M., Taka H., Fujimura T., Yoritaka A., Kubo S. and Mochizuki H. 2009. Toxic effects of dopamine metabolism in Parkinson's disease *Parkinsonism and Related Disorders* 15(sup1): S35–S38.

Hefti F., Melamed E., Sahakian B., Wurtman R., 1980. Circling behavior in rats with partial, unilateral nigrostriatal lesions: effect of amphetamine, apomorphine, and L-Dopa. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 12, 185–188.

Heinonen E., Myllyla V., Sotaniemi K., Lamintausta R., Salonen J., Anttila M., Savijarvi M., Kotila M., Rinne U. 1989. Pharmacokinetics and metabolism of selegiline, *Acta Neurol. Scand., Suppl.*, 126:93–9.

Henze C., Earla C., Sautera J., Schimdtm N., Themannb C., Hartamanna A. y Oertel W. 2005. Reactive Oxidative and nitrogen species in the nigrostriatal system following striatal 6-hydroxydopamine lesions in rats. *Brain Research* 1052: 97-104.

Hoehn M. and Yahar M. 1987. Parkinsonism onset, progression and mortality. *Neurology* 17: 427-442. En Otero-Siliceo. 1996. Parkinson enfoque al futuro. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Fondo de Cultura Económica, México. Cap. 1.

Hornykiewicz O. 2006. The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. *J Neural Transm.* 70: 9–15. En Sharma N. 2008. Biographies of disease: Parkinson's Disease. Greenwood Press, USA. 161pp.

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. 2008. Enfermedad de Parkinson. Disponible en la web: <http://www.innn.salud.gob.mx/interior/atencionapacientes/padecimientos/parkinson.html>.

Jankovic J. Levodopa strengths and weaknesses. *Neurology* 2002; 58: S19-32.

Jenner P. Pharmacology of dopamine agonists in the treatment of Parkinson's disease. *Neurology.* 2002;58 Suppl 1:S1—8.

Jeon B., Jackson-Lewis V., and Burke R. 1995. 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: Time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration* 4 , 131 – 137.

Jinnah H. y Hess E. 2004. Assessment of movement disorders in rodents. *En Animal Models of movement disorders.* Academic Press. E. U. A. 824p.

Juri C. y Chaná C. 2006. Levodopa en la enfermedad de Parkinson. ¿Qué hemos aprendido? *Rev Med Chile,* 134:893-901.

Kandel R., Schwartz H. and Jessel M. 2000. Principles of neuroscience. 4^o ed. McGraw Hill Companies. United States of America.

Katzenschlager R., Hughes A., Evans A., Manson J., Hoffman M., Swinn L., Watt H., Bhatia K., Quinn N. and Lees J. 2005. Continuous Subcutaneous Apomorphine Therapy Improves Dyskinesias in Parkinson's Disease: A Prospective Study Using Single-Dose Challenges. *Movement Disorders*. 20(2):151–157.

Kim Y., Joo W., Jin BK, Cho Y., Baik H. and Park C. 1998. Melatonin protects 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. *Neuroreport*. 13;9(10):2387-90.

Kumar N., Van Gerpen J., Bower J., Ahlskog J. 2005. Levodopa-dyskinesia incidence by age of Parkinson's disease onset. *Mov Disord*. Mar;20(3):342-4.

Lai B., Marion, S. A., Teschke, K., Tsui, J. K. C. 2002. Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease, *Parkinsonism Relat. Disord.*, 8:297–309.

Lanas O., Olinescu R., Badescu. 1991. Melatonin involvement in oxidative processes *Endocrinologie*; 29(3-4):147-53.

Langston J., Ballard P. Irwin I. 1983. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine analog synthesis. *Science* 219 , 979 – 980.

Langston J., Forno L., Tetrad J., Reeves A., Kaplan J., and Karluk D. 1999. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of human years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol* 46 , 598 – 605.

Le W. and Appel S. 2004. Mutant genes responsible for Parkinson's disease. *Current opinion in pharmacology*. 4: 79-84.

Lee T., Chau R. and Leong S. 1995. The anatomy of the basal ganglia and Parkinson's Disease: A review. *Singapore Med. J.* 36: 74-76.

Lee W., Lee E., Jeon M., Kang H., Park Y. 2006. Vesicular monoamine transporter-2 and aromatic l-amino acid decarboxylase gene therapy prevents development of motor complications in parkinsonian rats after chronic intermittent l-3,4-dihydroxyphenylalanine administration. *Exp Neurol*. 197(1):215-24.

Leist M. and Nicotera P. 1999. Calcium and cell death. En: Koliastos E.V. and Ratan R. (eds). *Cell death and diseases in nervous system*. Human Press. New Jersey pp. 69-91.

León F. 1996. Etiología de la enfermedad de Parkinson En: Otero-Siliceo. *Parkinson, enfoque al futuro*. Instituto nacional de Neurología y Neurocirugía. Fondo de Cultura Económica. México D.F. 25-34 pp.

León J., Acuña-Castroviejo D., Sainz R., Mayo J., Tan D., Reiter R. 2004. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci.* Jul 2;75(7):765-90.

León-Josefa., Acuña-Castroviejo D., Escames-Germane., Tan Dun-Xian and Reiter. Russel J. 2005. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J. Pineal Res.* 38: 1-9.

Limin L., Yong W., Bo L., Jun J., Zuoli S, Jinming Z., Jiahe T., Xiaomin W. 2009. Evaluation of nigrostriatal damage and its change over weeks in a rat model of Parkinson's disease: small animal positron emission tomography studies with [¹¹C]β-CFT. *Nuclear Medicine and Biology* 36: 941–947.

Linazasoro G. 2005. New ideas on the origin of L-Dopa-induced dyskinesias: age, genes and neural plasticity. *Trends Pharmacol Sci.* Aug;26(8):391-7.

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

Luquin M. 1994. Modelos Experimentales de la Enfermedad de Parkinson. Unidad de Neurología Experimental. Departamento de Neurología Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona España.

Machado F., Bellísimo M. Anselmo-Franci J., Mendes M., Sabino N., Da Cunha C. 2005. Comparison of bilaterally 6-OHDA and MPTP lesioned rats and as models of early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alteration. *Journal of Neuroscience Methods* 148, pp 78-87.

Machado-Salas S. Martinez-Fong D., Cornejo A., Aceves y Kuri J. 1990. Degenerative Ultrastructural changes observed in the neuropil of the caudate nuclei from Parkinson's Disease patients. *Stereotactic Functional Neurosurgery.* 54-55: 297-305.

Maharaj H., Mahara J S., Scheepers M., Mokokong R., Daya S. 2005. L-Dopa administration enhances 6-hydroxydopamine generation. *Brain Research* 163: 180-186.

Marin C., Rodriguez-Oroz M., Obeso J. 2006. Motor complications in Parkinson's disease and the clinical significance of rotational behavior in the rat: have we wasted our time? *Exp Neurol.* Feb;197(2):269-74.

Martínez D. Gómez-Pascual J. Carro P. 1998. Terapéutica farmacológica de los movimientos anormales. *Medicine* 7(103):4809-8822.

Mayo J., Sainz R., Antoli I., Herrera F., Martin V., Rodriguez C. 2002. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci.* Oct; 59(10):1706-13.

Mayoral J. 2008. Efecto de la L-Dopa y del a Melatonina en la conducta motora de ratas lesionadas con 6-OHDA: Modelo de la Enfermedad de Parkinson. Tesis para obtener el título de Licenciado en Psicología Fes-Iztacala UNAM.

- McNeil T., Brown S., Rafols J. y Shulson I. 1998. Atrophy of medium spiny striatal dendrites in advanced Parkinson's disease. *Brain Research* 445: 148-152.
- Meredith G., Sonsalla P., Chesselet M. 2008. Animal Models of Parkinson's Disease Progression. *Acta Neuropathol.* 115(4): 385–398.
- Mínguez-Castellanos y Escamilla-Sevilla. 2005. Terapia celular y otras estrategias neurodegenerativas en la EP. *Rev. Neurol.* 41 (11) 684-683.
- Molina J., Jiménez-Jiménez F., Ortí-Pareja M. 1999. Complicaciones motoras y psiquiátricas en el tratamiento prolongado con levodopa de la enfermedad de Parkinson. *Rev Neurol.* May 16-31;28(10):982-90.
- Montoya C., Campbell-Hope L. y Dunnett S. 1991. The 'Staircase test': A measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *J Neurosci Meth.* 36:219-28.
- Monville C., Torres E., Dunnett S. 2005. Validation of the L-Dopa-induced dyskinesia in the 6-OHDA model and evaluation of the effects of selective dopamine receptor agonists and antagonists. *Brain Res*;68 (1-2):16-23.
- Moore D., West A., Dawson V., Dawson T. 2005. Molecular Pathophysiology of Parkinson's Disease. *Advance on January.* 25:57-87.
- Muller T., Hefter H., Hueber R., Jost W., Leenders K., Odin P. 2004. Is levodopa toxic? *J Neurol*; 251 Suppl 6: VI/44-6.
- Nass R., Przedborsky S. 2008. Parkinson's Disease: molecular and therapeutic insights from model systems. Elsevier Inc. USA. 627pp.
- Neef C., Van L. 1999. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of apomorphine in patients with Parkinson's disease, *Clin. Pharmacokinet*, 37:257–271.
- Nutt J., Carter J., Lea E. and Sexton G. 2002. Evolution of the response to levodopa during the first 4 years of therapy. *Ann Neurol*, Jun;51(6):686-93.
- Nutt J., Woodward W., Hammerstad J., Carter J., Anderson J. 1984. The «on-off» phenomenon in Parkinson's disease. Relation to levodopa absorption and transport. *N Engl J Med*; 310: 483-8.
- Obeso J., Olanow W. and Nut J. 2000b. Levodopa motor complications in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 23: S2-S7.
- Obeso J., Rodríguez-Oroz M., Chana P., Lera G., Rodríguez M., Olanow C. 2000. The evolution and origin of motor complications in Parkinson's disease. *Neurology*; 55: S13-20.
- Obeso J., Rodríguez-Oroz M., Rodríguez M., Lanciego L., Artieda J., Gonzalo N. y Warren O. 2000a. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's Disease. *Trends in Neurocience* 23(suppl.): S8-S19.

Obeso J., Rodríguez-Oroz M., Zamarbide I. 1995. Enfermedades Neurodegenerativas cap. 6 Clínica Universitaria y Facultad de Medicina.

Oh J., Bibbiani F., Chase T. 2002. Quetiapine attenuates levodopa induced motor complications in rodent and primate parkinsonian models. *Exp Neurol*;177:557-564.

Oliveri R., Annesi G., Zappia M., Civitelli D., Montesanti R., Branca D., Nicoletti G., Spadafora P., Pasqua A., Cittadella R., Andreoli V., Gambardella A., Aguglia U., Quattrone A. 1999. Dopamine D2 receptor gene polymorphism and the risk of levodopa-induced dyskinesias in PD. *Neurology*. Oct 22;53(7):1425-30.

Ordoñez L. 2007. Caracterización de un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson por inhalación de manganeso. Tesis para obtener el grado académico de maestro en ciencias biológicas. Facultad de Estudios Superiores UNAM.

Ordoñez-Librado J., Anaya-Martínez V., Gutierrez Valdez A., Colin-Barenque L., Montiel-Flores E. Avila-Costa M., 2010. Manganese inhalation as Parkinson's disease model. *Parkinson's disease*.

Otero-Siliceo E., Abascal-Arias M., y Alanis-Quiroga M. 1996. Parkinson enfoque al futuro. Fondo de cultura Económica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

Paisan-Ruiz., Sarebz A., Lopez de Munain A., Marti I., Martínez Gill A., Marti-Fassa J. and Perez-Tur J. 2005. Familial Parkinson's disease: Clinical and genetic analysis of four basque families *Ann. Neurol.* 57: 365-372.

Parker W., Boyson S., and Parks J. 1989. Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, vol. 26, no. 6, pp. 719-723.

Paxinos G. and Watson G. 1997. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. California, USA.

Per A. 2004. Stuttering and the basal ganglia circuits a critical review of possible relations. *Journal of Communication Disorders.* 37: 325-369.

Perry T. and Yong R. 1986. Idiopathic Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and glutathione metabolism in the substantia nigra of patients. *Neuroscience Lett.* 67: 269-274.

Perumal S., Gopal B., Tordzro K., Cooper B. Cadet L. 1992. Vitamin E Attenuates the Toxic Effects of 6-Hydroxydopamine on Free Radical Scavenging Systems in Rat Brain. *Brain Research Bulletin*, 29:699-701.

Pincus J., Barry K. 1987. Plasma levels of amino acids correlate with motor fluctuations in parkinsonism. *Arch Neurol*; 44: 1006-9.

Pollack A., Yates T. 1999. Prior D1 dopamine receptor stimulation is required to prime D2-mediated striatal Fos expression in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuroscience*.94(2):505-14.

Polymeropoulos M. 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276:2045-7.

Przedborski S., Levivier M., Jiang H., Ferreira M., Jakson-Lewis V., Donaldson D y Togasaki D. 1995. Dose-Depending lesion of the dopaminérgica nigroestriatal pathway induced by intraestriatal injection of 6-hidroxi-dopamine. *Neuroscience*, 67: 631-647.

Putterman D., Munhall A., Kozell L., Belknap J., Johnson S. 2007. Evaluation of levodopa dose and magnitude of dopamine depletion as risk factors for levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *J. Pharmacol Exp Ther.* 323(1):277-84.

Radad K., Gille G., Rausch W. 2005. Short review on dopamine agonists: insight into clinical and research studies relevant to Parkinson's disease. *Pharmacol Rep.*;57(6):701-12.

Rafols J., Fox C. 1976. The neurons in the primate subthalamic nucleus: a Golgi and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.*, 168: 75-112.

Ramaker C., Van de Beek W., Finken M., Van Hilten B. 2000. The efficacy and safety of adjunct bromocriptine therapy for levodopa-induced motor complications: a systematic review. *Mov Disord.* Jan;15(1):56-64.

Rascol O., Arnulf., Peyro-Saint Paul H., *et al.* 2001. Idazoxan, α -2 antagonist, and L-Dopa-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*;16:708-713.

Ravel S., Sardo P., Legallet E. y Apicella P. 2006. Influence of spatial information on responses of tonically active neurons in the monkeys striatum. *J Neurophysiology* 95: 2975-2986.

Redgrave P., Ridriguez M., Smith Y., Rodriguez-Oroz M.C., Lehericy S., Bergman H., Hagid Y., De Long M. R Y Obeso J.A. 2010. Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease *Nature reviews/neuroscience*. Vol 11.

Reiter R. 2003. Melatonin: clinical relevance, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 17 273–285.

Rocchitta G., Rossana M., Esposito E. Marchetti B., Desole M., Miele E. y Serra P. 2006. Endogenous melatonin protects L-Dopa autooxidation in the striatal extracelular compartment of the freely moving rat: potential implication for long-term L-Dopa therapy in Parkinson's disease. *Journal of Pineal Reseach*, 40(3):204-213.

Rufo-Campos C. 2002. Melatonina y epilepsia. *Rev Neurol.* 35(1):S51-S58.

- Saggu H., Cooksey J., Dexter D., Wells F., Lees A., Jenner P. and Marsden C. 1989. A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in parkinsonian substantia nigra. *J. Neurochem.* 53: 692-697.
- Salamone D., Mahan K. y Rogers S. 1993. Ventrolateral striatal dopamine depletions impair feeding and food handling in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44:605-610.
- Samadi P., Bedard P. and Rulliard C. 2006. Opioids and motor complications in Parkinson's disease. *Trends in pharmacological Sciences*, 27 (10): 512-517
- Savit J., Dawson V., Ted M. Dawson. 2006. Diagnosis and Treatment of Parkinson's disease: molecules to medicine *The Journal of Clinical Investigation* 116(7):1744-1754.
- Schapira A., Cooper J., Dexter D., Jenner, P. Clark J., and Marsden C. 1989. "Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease," *The Lancet*, vol. 1, no. 8649, p. 1269.
- Sharma N. 2008. *Biographies of disease: Parkinson's Disease*. Greenwood Press, USA. 161pp.
- Sharma R, McMillan C., Tenn C., Niles L. 2006. Physiological neuroprotection by melatonin in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1068(1):230-6.
- Shastri B. 2003. Neurodegenerative disorders of protein aggregation. *Neurochemistry International*; Volume 43, Issue 1, Pages 1–7.
- Shaw K., Stern G. and Sandler M. 1973. Melatonin and Parkinsonism. *Lancet*, 1(7797):271.
- Shimohama S., Sawada H., Kitamura Y. and Takashi T.. 2003 Disease model: Parkinson's disease. *Trends in Molecular Medicine.* 9 (8):360-365.
- Shults C., Oakes D., Kieburtz K. 2002. Effects of coenzyme Q 10 in early Parkinson disease. Evidence in slowing of the functional decline. *Arch Neurol*;59:1541–1550.
- Simonneaux V. and Ribelayga C. 2003 Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides and other pineal transmitters. *Pharmacol rev.* 55: 325-395.
- Singh N., Viness P and, Choonara Y. 2007. Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 81: 29–44.
- Smith K. y Metz A. 2001. Dietary restriction alters motor function in rats. *Physiology and Behavior*, 85:581-592.

Snow B., Macdonald L., Mcauley D., Wallis W. 2000. The effect of amantadine on levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: a double-blind, placebo-controlled study. *Clin Neuropharmacol.* Mar-Apr;23(2):82-5.

Sofic E., Rimpapa Z., Kundurovic Z., Sapcanin A., Tahirovic I., Rustembegovic A., Cao G. 2005 Antioxidant capacity of the neurohormone melatonin. *J Neural Transm.* Mar;112(3):349-58.

Stocchi F., Olanow C. 2003. Neuroprotection in Parkinson's disease: clinical trials. *Ann Neurol.* 53; Suppl 3:S87-97.

Storz G. and Imlay J. A. 1999. Oxidative Stress. *Current Opinion in Microbiology.*2:188-194.

Tagle P. 2005. Historia de la enfermedad de Parkinson. Cuadernos de Neurología. Departamento de Neurocirugía Pontificia Universidad Católica Chile. Vol. 29.

Takakusaki K., Tomita N., Yano M. 2008. Substrates for normal gait and pathophysiology of gait disturbances with respect to the basal ganglia dysfunction. *J Neurol.* 255 Suppl 4:19-29.

Tan D., Reiter R., Manchester L., Yan M., El-Sawi M., Sainz R., Mayo J., Kohen R., Allegra M., Hardeland R. 2002. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem.* 2(2):181-97.

Taylor J., Bishop C., Walker P. 2005. Dopamine D1 and D2 receptor contributions to L-DOPA-induced dyskinesia in the dopamine-depleted rat. *Pharmacol Biochem Behav.*;81(4):887-93.

Truong L., Allbutt H., Kassiou M., Henderson J. 2006. Developing a preclinical model of Parkinson's disease: A study of behavior in rats with graded 6-OHDA lesions. *Behavioral Brain Research,* 169:1-9.

Trushina E. and McMurray C. 2007. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Neuroscience.* 14;145(4):1233-48.

Ungerstedt U., Arbuthnott G., 1970. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* 24, 485–493.

Ungerstedt U. 1968. 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European Journal of Pharmacology,* 5:107-110.

Ungerstedt, U. 1971. Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system . *Acta Physiol Scand Suppl* 367 , 95 – 122.

Utter A., Basso M. 2008. Some BG disorders manifest almost exclusively as motor difficulties. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 32: 333–342.

- Valente E., Abou-Sleiman P., Caputo V., Muquit M., Hrvey KL, Gispert S., Ali Z., Del Turco D., Bentivoglio A., Healy D., Albanese A., Nussbaum R., Gonzales-Maldonado R., Deller T., Salvi S., Cortelli P., Gilks W., Latchman D., Harvey R., Dallapiccola B., Auburger G. y Wood N. 2004. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*, 304:1158-60.
- Vallone D., Picetti R., Borrelli E. 2000. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev.* 24(1):125-32.
- Vaneck J. 1998. Cellular mechanism of melatonin action. *Physiol. Rev.*, **78**, 687–721.
- Wang J., Liu Z., Chen B. 2001. Association study of dopamine D2, D3 receptor gene polymorphisms with motor fluctuations in PD. *Neurology.* 26;56(12):1757-9.
- Werner P. y Cohen G. 1995. Lipid Peroxidation in brain: interactions of L-Dopa/dopamine whit ascorbate and iron. *Neurodegeneration.* 4 487-494.
- Whishaw Q., Coles K., Pellis M. y Miklyaeva I. 1997. Impairments and compensation in mouth and limb use in free feeding after unilateral dopamine depletions in a rat analog of human Parkinson's disease. *Behavioral Brain Research*, 84: 167-177.
- Whishaw Q., Suchowersky O., Davis L., Sarna J., Metz A. and Pellis M. S. 2002. Impairment of pronation, supination, and body co-ordination in reach-to-grasp task in human Parkinson's disease (PD) reveals homology to deficits in animal models. *Behavioural Brain Research*, 133: 165-176.
- Wichmann T. y DeLong M. 1993 Pathophysiology of parkinsonian motor abnormalities. En: Nrabayashy,H., Nagatzu T., Yanagisawa,m N. y Mizuno, Y. (Eds) *Advances in neurology* Vo. 60. Raven Press, Ltd. New York.
- Winkler C., Kirik D., Björklund A., Cenci M.2002. L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol Dis.*;10(2):165-86.
- Winn P. 1991 Exitotoxins as tools for producing brain lesions. En Conn, P.M. (Comp) *Lesion and Transplants. Methods in Neurosciences* vol. 7 Academic Press Inc.
- Yap-Yan W., Whiteman M., Cheung N. 2007. Chorinative stress: and under appreciated mediator of neurodegeneration? *Cellular Signalling* Volume 19, Issue 2: 219–228.
- Yassa R. y Jeste D. 1992. Gender differences in tardive dyskinesia: A critical rewiev of the literature. *Schizophrenia Bull*; 18: 701-15.
- Yurek D. y Sladek J. 1990 Dopamine Cell replacement: Parkinson's disease. *Annual Reviews in neuroscience* 5: 24-34.

Zappia M., Annesi G., Quattrone A. 2002. Association study of dopamine D2, D3 receptor gene polymorphisms with motor fluctuations in PD. *Neurology*. 12;58(5):837-8.

Zarranz J., Alegre J., Gómez-Esteban J., Lezcano E., Ros R., Ampuero I., Vidal L., Hoenicka J., Rodriguez O., Atarés B., Llorens V., Gomez-Tortosa E., del Ser T., Muñoz D., de Yebenes J. 2004. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol*. 55(2):164-73.

Zesiewicz T., Hauser R., 2001. Neurosurgery for Parkinson's disease. *Semin. Neurol*. 21 (1), 91–101.

Zheng B., Liao Z., Locascio J., Lesniak K., Roderick S., Watt M., Eklund A., Zhang-James Y., Kim P., Hauser M., Grünblatt E., Moran L., Mandel S., Riederer P., Miller R., Federoff H., Wüllner U., Papapetropoulos S., Youdim M., Cantuti-Castelvetri I., Young A., Vance J., Davis R., Hedreen J., Adler C., Beach T., Graeber M., Middleton F., Rochet J., Scherzer C. 2010. "PGC-1 α , a potential therapeutic target for early intervention in Parkinson's disease," *Sci Transl Med*.;2(52):52ra73.

APÉNDICE

Perfusión intracardiaca vía aórtica e inmunocitoquímica anti-TH

Para este propósito, los animales se anestesian con una dosis letal de pentobarbital sódico y se perfunden vía intracardiaca con solución salina al 9% y posteriormente paraformaldehído (4% en buffer fosfatos salina (PBS) 0.1M, pH 7.4) una vez terminada esta labor, se extraen los cerebros y se colocan en el mismo fijador durante por 2 horas y después deberán conservarse en PBS.

Con ayuda de un vibratomo se realizan cortes coronales de 50 μ m de espesor para poder someterlos a la técnica de inmunocitoquímica anti-TH, el proceso de inmunotinción se efectúa por flotación y consistió en los siguientes pasos:

- 1) Se lavan los cortes durante 3 periodos de 10 min cada uno
- 2) Se colocan durante 30 min en PBS conteniendo peróxido de hidrógeno al 0.3% y metanol al 10%, para activar la peroxidasa endógena.
- 3) Posteriormente se lavan durante 3 períodos de 10 min cada uno con agitación.
- 4) Los cortes se sumergen en borohidrido de sodio al 3% de suero normal de cabra y 0.3% de triton durante una hora.
- 5) Se incuba el tejido en una alícuota 1:1000 de anticuerpo primario anti-TH en PBS y 1% de suero normal de cabra por 3 días a 4°C.
- 6) Se vuelve a lavar 3 veces el tejido esta vez con PBS y suero normal de cabra al 1%, de 10 min cada uno, con agitación.
- 7) Se incuba el tejido por 2 hr a temperatura ambiente en AB 2° anti IGg de conejo 1:200 en PBS más 1% de suero normal de cabra con agitación.
- 8) Se incuba el tejido en abidina-biotina 1:200 por 2 hr a temperatura ambiente
- 9) Se lava el tejido en PBS en 3 lavados de 10 mi cada uno, con agitación.
- 10) Incubar el tejido en 3-DIAMINOBENZIDINA al 0.05% y 0.03% de peróxido de hidrógeno.
- 11) Se realizan 3 lavados en PBS de 10 min cada uno, con agitación.
- 12) Se montan los cortes en portaobjetos previamente gelatinizados y se dejan secar durante una semana aproximadamente.
- 13) Se prepara una batería de vasos de Coplin con alcohol a diferentes concentraciones que van del, 70 al 100% y xilol. Se sumergen los portaobjetos con el tejido durante un minuto en cada vaso. Se aplica resina y se coloca el cubreobjetos.