



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA L-DOPA, MELATONINA Y L-DOPA/MELATONINA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON. COMPARACIÓN ENTRE SEXOS

TESIS.

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

ANA LUISA GUTIÉRREZ VALDEZ

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. MARÍA ROSA AVILA COSTA. FES IZTACALA UNAM

COMITÉ TUTOR:

**DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY. FES IZTACALA UNAM
DR. DANIEL MARTÍNEZ FONG. POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS. BIOLOGÍA
EXPERIMENTAL UNAM**

MÉXICO, D.F. MARZO 2015.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA L-DOPA, MELATONINA Y L-DOPA/MELATONINA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON. COMPARACIÓN ENTRE SEXOS

TESIS.

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:
ANA LUISA GUTIÉRREZ VALDEZ**

**TUTOR PRINCIPAL:
DRA. MARÍA ROSA AVILA COSTA. FES IZTACALA UNAM**

**COMITÉ TUTOR:
DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY. FES IZTACALA UNAM
DR. DANIEL MARTÍNEZ FONG. POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS. BIOLOGÍA
EXPERIMENTAL UNAM**

MÉXICO, D.F. MARZO 2015.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 27 de octubre de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **GUTIÉRREZ VALDÉZ ANA LUISA**, con número de cuenta **97541651**, con la tesis titulada **"Efecto de la administración de la L-DOPA, melatonina y L-DOPA/melatonina en un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson. Comparación entre sexos"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ROSA DE LOURDES ÁVILA COSTA**:

Presidente: DRA. SILVIA LETICIA VERDUGO DÍAZ
Vocal: DR. ISMAEL JIMÉNEZ ESTRADA
Secretario: DR. DANIEL MARTÍNEZ FONG
Suplente: DRA. FRANCISCA PÉREZ SEVERIANO
Suplente: DRA. VERÓNICA ANAYA MARTÍNEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 9 de febrero de 2015.

M. del Coro Arizmendi Arriaga
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

AL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS UNAM, POR LA FORMACIÓN
BRINDADA.

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (**CONACYT**), POR EL
APOYO AL SER ACEPTADA EN EL PROGRAMA DE BECARIOS (NÚMERO DE
BECARIO 169050).

A LOS PROYECTOS: PAPIIT-DGAPA-UNAM IN215114, PAPIIT-DGAPA-UNAM
IA2022142, PAPCA-IZTACALA UNAM-2014-16 Y PAPCA-IZTACALA UNAM2014-18

A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR, POR LOS APORTES HECHOS A MI
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

DRA. MARÍA ROSA AVILA COSTA

DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY.

DR. DANIEL MARTÍNEZ FONG.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

iiA ti Papá la persona que más **AMO!!** Que a pesar de esos tiempos adversos, siempre estas al pie del cañon, porque a ti te debo todo lo que soy. Por ser el incondicional abrazo que me motiva.

A mis hermanos: Luis, Angélica y Fabiola porque siempre están ahí cuando más lo necesito, por todo el apoyo y cariño iii**Los adoro!!!**

A mi querida hermana, amiga y cuñada Laura, mil gracias por entrarle al ruedo con todos nosotros, por escucharme, por todo tu apoyo y cariño incondicional.

A mi cuñado Jorge, por ese cariño incondicional, gracias.

A mis niños amados César, Arely, Azael, Angel y Ceci por detenerme en mi alocada carrera, por sus sonrisas, pero sobre todo ipor enseñarme a disfrutar la vida!

A mis tíos Roberto, Tete, Queta, Gerardo, Belem Arturo, Mauri, Beto, Paty, Jared, Geraldin, Jaydin y Andy, de quienes solo he recibido palabras de aliento, apoyo incondicional, pero sobre todo cariño iimuchas gracias a todos, los quiero muchísimo!!

A mi hermano académico el Dr. José Luis, por tu ayuda, por los ánimos en los momentos que quería desistir, todas esas aventuras, el apoyo y cariño, igracias!

A Ricardo, Carmen y Montse por hacer que esas incontables horas de trabajo fueran más amenas, pero sobre todo gracias por su amistad.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Vero, Alicia, Enrique, Laura, Chucho, Paty, Javier, Ari, May, Fernando, Carlos, Abraham, por las enseñanzas, su apoyo, por hacer el trabajo más divertido.

A Mario, por tu amistad y por todos esos momentos.....

A mis amigos Araceli, Aurora, Arturo, César, Israel, Liliana, Erika, José Luis, gracias por todas esas aventuras y años de amistad.

A mis amigas de toda la vida Elsa, Julieta, Lupe y Vero, que a pesar del tiempo seguimos compartiendo etapas, apoyándonos y creando nuevas historias.

Al personal del posgrado en ciencias biológicas, en especial a:
Dr. Ernesto Armando Rodríguez Reyes
Georgina García Morán.

A los miembros del jurado, por su disposición, las correcciones y comentarios para concluir este trabajo.

Dra. Silvia Leticia Verdugo Díaz
Dr. Ismael Jiménez Estrada
Dr. Daniel Martínez Fong
Dra. Francisca Pérez Severiano
Dra. Verónica Anaya Martínez

A Vero Anaya, a quien le bebo parte de este trabajo, por tus comentarios y enseñanzas. Pero principalmente mi agradecimiento infinito por todo tu apoyo, cariño y amistad tanto a nivel académico como personal **iiiTe quiero mucho Vero!!!**

Finalmente quiero hacer un agradecimiento **muy especial** a María Rosa, mi asesora y gran amiga, la persona que más admiro. No me alcanza mi vocabulario para agradecerte por todo el apoyo y cariño que me has brindado en **TODO MOMENTO**. Porque además de enseñarme a amar las neurociencias, me enseñaste que por muy dura que sea la vida siempre hay que disfrutarla al máximo, mil gracias **iiiNo te imaginas lo mucho que te quiero!!!**

A todas esas personas que han formado parte de mi vida, este trabajo tiene un poquito de todos ustedes.....

CON TODO MI CARIÑO, MIL GRACIAS!!!!

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
ANTECEDENTES	4
ENFERMEDAD DE PARKINSON	4
ETIOLOGÍA DE LA EP	5
TRATAMIENTO CON L-DOPA Y SUS COMPLICACIONES MOTORAS	7
MODELO ANIMAL DE LA EP CON 6-OHDA Y EL TRATAMIENTO CON L-DOPA	8
TRATAMIENTO CON MELATONINA	9
DIMORFISMO SEXUAL EN LA EP	11
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS PARTICULARES	14
METODOLOGÍA	15
PRUEBA DE LA ESCALERA	15
PRUEBA DE LA VIGA	16
OVARIECTOMÍA	16
CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA Y TRATAMIENTOS	17
EVALUACIÓN DE MOVIMIENTOS INVOLUNTARIOS ANORMALES (MIAs)	18
PREPARACIÓN DEL TEJIDO HISTOLÓGICO	20
INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-TIROSINA HIDROXILASA (TH)	20
IMPREGNACIÓN ARGÉNTICA POR EL MÉTODO DE GOLGI	21
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
RESULTADOS	21
PRUEBA DE LA ESCALERA	21
PRUEBA DE LA VIGA	26
MOVIMIENTOS INVOLUNTARIOS ANORMALES (MIAs)	33
CÉLULAS INMUNOPOSITIVAS A TH	37
ESPINAS DENDRÍTICAS	40
DISCUSIÓN	43
PRUEBA DE LA ESCALERA	43

PRUEBA DE LA VIGA.....	46
MOVIMIENTOS INVOLUNTARIOS ANORMALES	49
CÉLULAS INMUNOPOSITIVAS A TH.....	54
ESPINAS DENDRÍTICAS.....	58
COMPARACIÓN ENTRE SEXOS	61
CAMBIOS EN EL ESTRIADO CONTRALATERAL.....	67
CONCLUSIONES.....	69
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

ABREVIATURAS

6-OHDA 6-hidroxidopamina

BDNF Factor neurotrófico derivado de cerebro

CAT Catalasa

COMT Catecol-O-metiltransferasa

DA Dopamina

DAT Transportador de dopamina

DIL Discinesias Inducidas por Levodopa

EP Enfermedad de Parkinson

GB Ganglios Basales

GDNF Factor neurotrófico derivado de células gliales

GRd Glutación reductasa

GSH Glutación

GSH-Px Glutación Peroxidasa

H₂O₂ Peróxido de hidrógeno

L-DOPA Levo-dihidroxifenilalanina

MAO Monoaminoxidasa

MIAs Movimientos Involuntarios Anormales

MPTP 1-Metil-4, Fenil-1, 2, 3, 6-Tetrahidropiridina

NE Núcleo estriado

NOSn Óxido Nítrico Sintasa Neuronal

NST Núcleo subtalámico

O⁻² Anión Superóxido

OH • Radical Hidróxilo

ON • Óxido Nítrico

ROS Especies Reactivas de Oxígeno

SNc Substancia Nigra compacta

SOD Superóxido Dismutasa

SQ Semiquinona

TH Tirosina Hidroxilasa

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo que produce alteraciones motoras debido a la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra parte compacta (SNc). La levo-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) es el fármaco más empleado para el tratamiento de la EP por su eficacia clínica. Sin embargo, a largo plazo produce discinecias inducidas por L-DOPA (DIL), varios estudios sugieren que la L-DOPA puede auto-oxidarse e incrementar la condición pre-existente de estrés oxidativo; por lo anterior decidimos adicionar al tratamiento un potente antioxidante: la melatonina. Por otra parte se ha reportado que las hormonas esteroideas tienen efecto neuroprotector en el sistema nigro-estriatal. Nuestro objetivo fue determinar si la melatonina sola o en combinación con la L-DOPA protege contra la pérdida de dopamina nigro-estriatal y alteraciones motoras inducidas por la neurotoxina selectiva 6-OHDA en un modelo experimental de EP, y comparar los resultados con los animales tratados solamente con L-DOPA, asimismo determinar las diferencias entre sexos. Para ello, los experimentos se llevaron a cabo en ratas macho, hembras intactas (con ovarios, es decir con estrógenos) y hembra ovariectomizadas (ovx), las cuales fueron lesionadas con 6-OHDA en el haz medial. Los fármacos se administraron por vía oral, diariamente por 6 meses; los efectos sobre la conducta motora fina fueron evaluados por la habilidad de los animales de utilizar las extremidades anteriores en la prueba de la escalera y la coordinación motora en la prueba de la viga, la severidad de las DIL fueron evaluados por medio de la prueba de movimientos involuntarios anormales (MIAs). A nivel citológico se analizó el número de células inmunopositivas a tirosina hidroxilasa (TH) y el número de espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas. Nuestros resultados muestran que independientemente del sexo, las ratas tratadas con la co-administración de L-DOPA/melatonina tuvieron el mejor desempeño motor y disminuyeron los DIL, posiblemente por el incremento en el número de células dopaminérgicas y la conservación de las espinas dendríticas, lo cual implica la preservación de la sinaptología del estriado. Además, observamos diferencias significativas entre sexos en el análisis de la conducta motora, mostrando que las hembras intactas tratadas con L-DOPA o melatonina presentaron mayor recuperación en comparación con los machos y hembras ovx y presentaron conservación de las neuronas dopaminérgicas y de las espinas dendríticas, mostrando que los estrógenos tienen efecto neuroprotector. Nuestros resultados sugieren que la co-administración de L-DOPA/melatonina puede ser un posible candidato para el tratamiento de la EP para prevenir o retrasar los daños causados por la L-DOPA. Asimismo, los estrógenos pueden ejercer efecto benéfico contra el desarrollo y progresión de la enfermedad, y esto podría ser utilizado como coadyuvante en el tratamiento de la EP.

ABSTRACT

Parkinson disease (PD) is a neurodegenerative disorder that affects movement due to substantia nigra pars compacta (SNc) dopaminergic neurons progressive degeneration. L-DOPA is the most common drug in PD treatment due its clinical efficacy. However, long-term treatment frequently induces the development of L-DOPA-induced dyskinesias (LID), several evidences suggest that L-DOPA can increase the oxidative stress pre-existing condition, for that reason we add melatonin as a potent antioxidant. Moreover it has been reported that steroid hormones are neuroprotective in the nigro-striatal system. Thus, we conducted this study to determine the ability of melatonin alone or in combination with L-DOPA to protect nigro-striatal dopaminergic loss and motor impairment induced by 6-OHDA (6-hydroxydopamine) in a rat model of PD, comparing the results with L-DOPA only treated rats, as well as determine differences between sexes. The experiments were carried out in male, intact female (with estrogen) and ovariectomized (ovx) female rats underwent 6-OHDA-induced lesion in the medial forebrain bundle. The drugs were administered orally daily for 6 months; the motor behavior were assessed by skilled forelimb use in a staircase test and stepping ability while walking on beams, the severity of LID were assessed using measures of abnormal involuntary movements (AIM). At the cellular level, the number of TH-positive immune cells and dendritic spines of the striatal medium-size spiny neurons were evaluated. Our results show that independently of the sex, the rats treated with the co-administration of L-DOPA/melatonin had the best performance in the motor tasks and decreased LIDs, through the increase in the number of dopaminergic cells and conservation of dendritic spines, which in turn imply the well-preserved synaptology of a less denervated striatum. In addition, we observed differences between sexes in the analysis of motor behavior showing that intact female rats treated with L-DOPA or melatonin had a significantly better recovery than males and ovx females and exhibited conservation of dopaminergic cells and dendritic spines, showing that estrogen have neuroprotective effect. Our results suggest that co-administration of L-DOPA/melatonin could be a possible candidate for the treatment of PD to prevent or slow the damage caused by L-DOPA. Also, the estrogens may exert beneficial effect against the development and progression of the disease and this could be used like in adjunct treatment of PD.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo y progresivo de los ganglios basales (GB), dicha enfermedad deja al paciente incapacitado para ejecutar correctamente movimientos voluntarios. Esta patología ocupa el segundo lugar entre las enfermedades degenerativas del sistema nervioso que afecta a personas de edad avanzada, se observa aproximadamente en el 1% de la población con edad por arriba de los 55 años (Brailowsky y García, 1996). Actualmente se considera que dicha enfermedad se presenta en 150 a 200 casos por cada 100,000 habitantes por año; en México, 50 de cada 100,000 habitantes pueden padecerla y su prevalencia podría incrementarse en las próximas décadas debido al aumento en la esperanza de vida (Góngora *et al.*, 2005; Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, 2008), por lo que es importante seguir la línea de investigación de dicha enfermedad (Ebadi *et al.*, 1996).

ANTECEDENTES

Enfermedad de Parkinson

La EP fue descrita por primera vez por el médico y geólogo James Parkinson en 1817 en su publicación "*Essay on the shaking palsy*" (Ensayo sobre la parálisis agitante), basado en las observaciones de seis casos clínicos, como movimientos involuntarios con disminución de la fuerza muscular en segmentos que están en reposo. Los pacientes con EP presentan cuatro signos clínicos principales: bradicinesia (lentitud del movimiento), temblor en reposo, rigidez muscular y alteración de la postura (el paciente presenta inclinación de la cabeza en posición erecta, tronco dirigido hacia adelante, hombros caídos, brazos flexionados, manos delante del cuerpo y rodillas flexionadas -Gilmans, 1994; Alanis, 1996; García, 2003; Tolosa *et al.*, 2006; Jankovic, 2008; Lees *et al.*, 2009-). Las líneas de expresión de la cara son fijas, y no muestran respuesta emocional espontánea (Gilmans, 1994).

En 1966 Hornykiewicz analizó cerebros de pacientes con EP y reportó disminución significativa de Dopamina (DA), serotonina y noradrenalina principalmente en el núcleo estriado (NE) y la sustancia *nigra* (SN), además puntualizó que de las tres aminas biogénicas, la más reducida era la DA (Hornykiewicz, 1993; 2006). Posteriormente se demostró que las

neuronas que estaban degenerando principalmente eran las neuronas dopaminérgicas de la porción de la sustancia *nigra compacta* (SNc) (Yurek y Sladek, 1990; Gibb y Less, 1991). De esta forma una de las características más relevantes de la EP es la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, con la consecuente disminución en los niveles de DA en los núcleos inervados por ésta, principalmente el núcleo estriado, el cual juega un papel muy importante en la actividad motora (Bové *et al.*, 2005); la integridad de esta población de neuronas mesencefálicas determina la evolución de los síntomas, por lo cual su pérdida es la principal característica histopatológica de la enfermedad (Appel, 1981; Damier *et al.*, 1999).

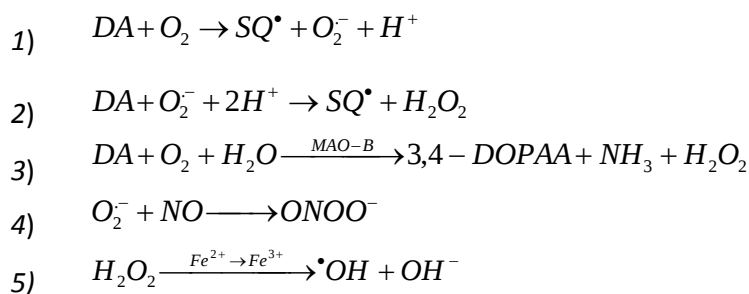
Etiología de la EP

La etiología del proceso degenerativo que afecta las neuronas dopaminérgicas en la EP es desconocida (Yap *et al.*, 2007; Stott y Barker, 2014), por lo que se han establecido numerosas hipótesis para tratar de explicar su origen; la hipótesis de mayor aceptación es la del estrés oxidativo (Miglioriore *et al.*, 2002), que propone que durante el metabolismo aerobio se producen de forma incidental e incontrolable especies reactivas de oxígeno (ERO) y radicales libres (RL) que una vez generadas promueven reacciones que dañan a las macromoléculas. Este daño es irreversible, se acumula con el tiempo y da como resultado la pérdida gradual de la capacidad funcional de las células (González *et al.*, 1999).

La generación excesiva de ERO en el sistema nervioso produce peroxidación de lípidos, debido a que los RL reaccionan con el doble enlace de los lípidos insaturados como el ácido linoleico y araquidónico generando así peroxi-radicales (4-Hidroxinonenal, acroleína y malondialdehído) (González *et al.*, 1999; Barnham *et al.*, 2004; Yap *et al.*, 2007). Lo cual origina pérdida de la fluidez membranal, disminución del potencial de membrana y aumento en la permeabilidad de los iones de Ca^{2+} (Ferrer *et al.*, 1999), lo cual puede generar 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). Aunado a esto, el cerebro humano contiene niveles bajos de enzimas antioxidantes y en ciertas áreas como los GB existen grandes cantidades de Fe y otros metales de transición que constituyen factores importantes en la generación de ERO (González, 1999; Yap *et al.*,

2007). En estudios post-mortem realizados en cerebros de pacientes con EP, se mostró que las neuronas dopaminérgicas de la SNc son particularmente vulnerables al estrés oxidativo, indicando aumento de peroxidación de lípidos (Dexter *et al.*, 1989; Shastri, 2003), disminución en los niveles de Glutatión Peroxidasa (GSH-Px), incremento en los niveles de Fe^{++} , el cual funciona como catalizador de la reacción de Fenton y por tanto promueve la generación de RL resultando en estrés oxidativo crónico provocando la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Dexter *et al.*, 1989).

En la EP el estrés oxidativo recibe especial atención, debido al potencial que tiene la DA para oxidarse y formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y otras ERO (Kolesnikova y Serebrovskaya, 2003; Hattori *et al.*, 2009). Por ejemplo, durante su auto-oxidación, la DA es convertida a semiquinona " $SQ^\bullet$ " y anión superóxido " $O_2^{\bullet-}$ " (1), el cual puede reaccionar con otras moléculas de DA y formar $SQ^\bullet$ y " H_2O_2 " (2) o reaccionar con óxido nítrico y formar el altamente tóxico peroxinitrito " $ONOO^-$ " (4). El H_2O_2 también es formado mediante el metabolismo enzimático de la DA por la monoaminoxidasa "MAO" (3), así, el H_2O_2 generado durante estas reacciones en presencia de Fe^{2+} (5), genera radical hidroxilo " $OH^\bullet$ " a lo cual se le denomina reacción de Fenton (Barzilai *et al.*, 2001; Kolesnikova y Serebrovskaya, 2003).



Estas hipótesis sirven de alguna manera, para explicar algunas de las anormalidades relacionadas con la EP. Sin embargo, ninguna de éstas explica clara y completamente la cascada de eventos responsables de dicha enfermedad (Stott y Barker, 2014).

Tratamiento con L-DOPA y sus complicaciones motoras

El fármaco más empleado en el tratamiento de la EP es la L-DOPA (Levodopa) debido a su capacidad para disminuir las alteraciones motoras; es indudable que el uso de este fármaco mejora la calidad de vida de los pacientes, por lo que hasta el momento este precursor dopaminérgico es el fármaco sintomático más efectivo en el tratamiento de la EP, sin embargo, el progreso de la enfermedad continúa (Biagio y Bernardi, 2005) y después de varios años de tratamiento farmacológico el beneficio es frecuentemente limitado por los efectos secundarios como son los movimientos involuntarios anormales (MIAs) inducidos por la L-DOPA (-DIL- Luquin *et al.*, 1992; Rajput *et al.*, 2000; Linazasoro, 2005), que son una inevitable consecuencia del tratamiento crónico, generalmente se presenta en el 40% de los pacientes durante los primeros 4 - 6 años de tratamiento, esta proporción aumenta a más del 80% entre 8 y 15 años de tratamiento (Ahlskog y Muentner, 2001).

Las DIL son movimientos involuntarios sin sentido, irregulares y repetitivos de las extremidades, tronco y la cara, los cuales son incapacitantes, impactando en la calidad de vida física (Obeso *et al.*, 2000), social y económica de los pacientes (Dodel *et al.*, 2001). Las DIL abarcan muchos tipos de movimientos, incluyendo corea (movimientos irregulares, bruscos, involuntarios y rápidos) y distonías (contracciones musculares que causan torceduras y movimientos repetitivos o posturas anormales) (Cheshire y Williams, 2012), correspondiendo con la concentración más alta de L-DOPA en el cerebro, por lo que se conocen como “discinecias de pico de dosis” (Gurutz y Nadège, 2005; Ebadi y Ronald, 2005; Calabresi *et al.*, 2010). Cuando la concentración de L-DOPA asciende o desciende se presentan las “discinesias bifásicas”, en las cuales las complicaciones motoras aparecen al inicio y al final del efecto de una dosis de L-DOPA presentándose un efecto: discinecia-mejora-discinecia, aunque a veces solo aparecen al inicio o al final y se caracterizan por la presencia de movimientos estereotipados que principalmente afectan a las extremidades inferiores (Gurutz y Nadège, 2005; Fabbrini *et al.*, 2007). Finalmente las “distonías off” se presentan cuando la concentración de DA es muy baja, como es común al inicio del día cuando aún no se toma la primer dosis de L-DOPA (Calabresi *et al.*, 2010).

Las discinesias suelen estar relacionadas con diversos factores que favorecen su aparición como la degeneración de la vía nigroestriatal, la edad de inicio de la sintomatología

parkinsoniana, las dosis de L-DOPA y el tiempo de tratamiento, así como la regularidad de su uso, dichas condiciones determinan la intensidad y tipo de las DIL (Kummar *et al.*, 2005; Calabresi *et al.*, 2010). Un factor menos estudiado es el sexo de cada individuo; estudios muestran que las DIL son significativamente mayores en mujeres que en hombres. Aún no está claro por qué, las mujeres son más susceptibles que los hombres a desarrollarlas pero se propone que los estrógenos pueden ser la base de esta susceptibilidad (Brann *et al.*, 2007; Pavon *et al.*, 2010). Así, el tratamiento con la L-DOPA genera concentraciones de DA muy variables en el cerebro, produciendo la estimulación pulsátil de los receptores postsinápticos estriatales de DA. Además, los procesos fisiológicos para compensar la deficiencia de DA involucran alteraciones en el metabolismo, la expresión génica, angiogénesis estriatal y modificaciones de la plasticidad sináptica aberrante (Linazasoro *et al.*, 2004; Lindgren *et al.*, 2009).

Se ha reportado que la administración de L-DOPA a largo plazo puede acelerar la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (Michel y Heftil, 1990; Jenner, 1995; Wolters *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 2004), debido a que la auto-oxidación de la L-DOPA puede generar moléculas citotóxicas que generan ERO así como 6-OHDA (Borah y Mohanakumar, 2009a; 2010; 2012), la cual produce la muerte de las neuronas catecolaminérgicas (Ungerstedt, 1968). Por ello se propone que la pérdida neuronal puede ser causada por mecanismos de oxidación (Michel y Heftil, 1990; Walkinshaw y Waters, 1995; Asanuma *et al.*, 2003; Borah y Mohanakumar, 2012).

Modelo animal de la EP con 6-OHDA y el tratamiento con L-DOPA

Para imitar la deficiencia dopaminérgica observada en los pacientes con EP, se han empleado diversas toxinas en una amplia variedad de especies animales induciendo con ello alteraciones motoras registrables y reproducibles (Betarbet *et al.*, 2002). Una de las neurotoxinas más utilizada es la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Ungerstedt, 1968; Obeso, 1995), la cual se inyecta estereotáxicamente en el haz medial del cerebro anterior (Ungerstedt, 1968; Ungerstedt, 1971) y es incorporada a las neuronas por el sistema de recaptura de DA de alta afinidad (DAT), una vez dentro actúa inhibiendo el complejo I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial, de este modo reduce la generación de ATP (Glinka *et*

al., 1998; Lotharius, *et al.*, 1999), y causa la producción de ERO induciendo subsecuentemente la degeneración de las terminales axónicas y de los cuerpos neuronales (Otero-Siliceo, 1996), lo que trae como consecuencia las características motoras típicas de la enfermedad como acinesia, rigidez, temblor y alteraciones posturales y de la marcha, que son más evidentes en el lado contralateral al hemisferio más degenerado (Schwartz y Huston, 1996), dando así lugar al modelo experimental de la EP. A pesar de que es uno de los modelo más empleado, aun no se caracterizan completamente los mecanismos celulares y moleculares de la toxicidad de la 6-OHDA (Hernández-Baltazar *et al.*, 2013).

Para reproducir las DIL, las ratas lesionadas con este modelo son tratadas crónicamente con dosis terapéuticas de L-DOPA, provocando que el 80% de los animales manifiesten gradualmente movimientos involuntarios anormales (MIA) (Andersson *et al.*, 1999; Lundblad *et al.*, 2002; Picconi *et al.*, 2003) que afectan los músculos faciales, de las extremidades y el tronco (Winkler *et al.*, 2002; Spinnewyn *et al.*, 2011). Estos movimientos reproducen el curso del tiempo de “pico de dosis” de las discinesias en la EP, y afectan predominantemente el lado contralateral a la lesión (Lee *et al.*, 2000; Winkler *et al.*, 2002).

Como se mencionó, se considera que el estrés oxidativo desempeña un papel significativo en la neurodegeneración que ocurre en la EP, más aún, el fármaco más utilizado puede producir RL que afectan a las neuronas dopaminérgicas remanentes en la SNc. 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). Por ello decidimos utilizar un antioxidante como la melatonina, que actualmente no se utiliza en el tratamiento de la EP, pero se ha propuesto ampliamente como estrategia terapéutica debido a las características que a continuación se mencionan.

Tratamiento con melatonina

La melatonina es una sustancia ampliamente estudiada debido a que se le han atribuido importantes propiedades antioxidantes (Reiter *et al.*, 2003), inclusive se ha reportado que es un antioxidante dos veces más eficiente que la vitamina E y cuatro veces más que el Glutatión (GSH) y el ácido ascórbico (Kundurovic y Sofic, 2006). Varios estudios reportan que

la melatonina protege las células debido a que neutraliza el H_2O_2 , ON^- , O_2^- y NOO^- (Reiter, 2000a; Reiter *et al.*, 2000b); los metabolitos de la melatonina también presentan propiedades antioxidantes (Reiter *et al.*, 2003), más aún, puede inducir genes que codifican para enzimas antioxidantes como el GSH-Px, glutatión reductasa (GSH-Rx), glutailcisteina sintasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenada (G6PD), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) (Hardeland y Pandi-Perumal, 2005; Hardeland *et al.*, 2006; Bondy y Sharman, 2007) y disminuye los niveles de peroxidación de lípidos (Harms *et al.*, 2000; Khaldy *et al.*, 2003).

Estudios *in vivo* e *in vitro* muestran que la melatonina incrementa la actividad del complejo I y IV de la cadena respiratoria. Por lo que se ha sugerido que dicha acción puede contribuir al efecto protector en la EP (Dabbeni-Sala *et al.*, 2001; León *et al.*, 2004), 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).

En animales depletados de DA con 6-OHDA y tratados con melatonina se observa protección de los complejos mitocondriales, incremento de la expresión génica de las enzimas antioxidantes (Mayo *et al.*, 2002), restauración en los niveles de DA, así como sus metabolitos DOPAC (ácido 3,4-dihidroxifenilacético) y HVA (ácido homovalínico) (Aguiar *et al.*, 2002), incremento de los niveles de RNAm de la enzima Tirosina Hidroxilasa (TH) en la SN (León *et al.*, 2005) y produce recuperación significativa del déficit motor inducido por la lesión con 6-OHDA (Singh *et al.*, 2006; Gutiérrez-Valdez, 2007; Gutiérrez-Valdez *et al.*, 2012a, 2012b).

Un extenso y variado número de trabajos realizados tanto en personas adultas como en niños han demostrado que la melatonina tiene muy baja toxicidad (Campos-Rufo, 2002). En estudios realizados bajo la supervisión de la U.S. National Toxicology Program, se encontraron escasos indicios de toxicidad en ratas tratadas durante toda la gestación con dosis muy elevadas de melatonina (entre 10 y 200 mg/kg/día). En este grupo se estudió la mortalidad prenatal, el peso corporal fetal y la incidencia de malformaciones fetales, y se observó que la melatonina no presenta toxicidad significativa en ninguna de las variables analizadas (Acuña- Castroviejo *et al.*, 2006).

Por otro lado, resultados recientes en nuestro laboratorio mostraron que animales lesionados con 6-OHDA y tratados de forma crónica (30 días) con 7.5 mg/kg de L-DOPA presentaron recuperación del desempeño motor en los primeros días de tratamiento, posteriormente los animales manifestaron deterioro motor evidente, lo cual es homólogo a lo que ocurre en los pacientes tratados con L-DOPA a largo plazo. En este mismo experimento, los animales lesionados y tratados con 10 mg/kg de melatonina tuvieron recuperación gradual de la conducta, siendo más evidente a los 28 días de tratamiento (en este mismo tiempo, los animales tratados con L-DOPA presentaron deterioro motor evidente). A nivel citológico encontramos que los animales lesionados con y sin administración de L-DOPA presentaron pérdida drástica de células dopaminérgicas, importantes alteraciones ultraestructurales, y altos niveles de peroxidación de lípidos; a diferencia del grupo de animales lesionados y tratados con melatonina, el cual se caracterizó por presentar mayor supervivencia de células dopaminérgicas, menor número de botones con edema y prevalencia de contactos sinápticos con espinas así como bajos niveles de peroxidación de lípidos (Gutiérrez-Valdez, 2007; Gutiérrez-Valdez *et al.*, 2012b).

Dimorfismo sexual en la EP

Como se mencionó, la EP es asociada con la edad avanzada, por lo que la mayoría de las mujeres que desarrollan dicha enfermedad son post-menopáusicas. Al respecto se ha observado que mujeres jóvenes con EP que aún presentan ciclos menstruales regulares manifiestan síntomas motores severos cuando los niveles de estrógenos son bajos (Quinn *et al.*, 1986; Kompoliti *et al.*, 2000), proponiendo así el efecto neuroprotector de los estrógenos (Rubin, 2007; Sánchez *et al.*, 2010).

La neuroprotección producida por los estrógenos en las mujeres con EP es asociada con factores que estimulan la producción de estrógenos durante la vida (Ragonese *et al.*, 2004; Brann *et al.*, 2007; Gatto *et al.*, 2014). Estudios recientes proponen que el retraso en la aparición de la EP en mujeres se asocia al número de embarazos y vida fértil, lo cual podría explicar las observaciones epidemiológicas de baja incidencia de EP en mujeres con respecto a los hombres 2:3 (Sánchez 2010; Yadav *et al.*, 2012). Por otra parte, en estudios clínicos también se ha observado mayor incidencia de ciertas enfermedades que están

directamente relacionadas con el sexo, por ejemplo como la tuberculosis (Stival *et al.*, 2014), enfermedad de las arterias coronarias (Bellasi *et al.*, 2007) y accidentes cerebrovasculares (Tai *et al.*, 2011), proponiendo que dicha diferencia es debida a los hormonas esteroideas (García-Segura *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2014).

Más aún, existen estudios que muestran que las mujeres con EP presentan retraso en la aparición de los síntomas motores en comparación con los hombres (Pavon *et al.*, 2010).

Para determinar si los estrógenos tienen efecto sobre las neuronas dopaminérgicas, Leranth y cols. (2000), utilizaron primates no humanos jóvenes los cuales fueron ovx (sin ningún tipo de daño neurológico) y sus resultados mostraron que tanto los primates ovx y los machos presentaron menor número de neuronas dopaminérgicas en comparación con las hembras con ovarios intactos. En roedores machos se observa mayor susceptibilidad a la neurotoxina 6-OHDA en comparación con las hembras, las cuales se caracterizaron por presentar menor pérdida de células dopaminérgicas y recuperación de la conducta motora (Tamás *et al.*, 2006). Dichos estudios, apoyan el efecto neuroprotector de los estrógenos en el sistema nigro-estriatal (Bourque *et al.*, 2009; Gillies *et al.*, 2014).

Así durante los últimos años la evidencia acumulada sugiere que la exposición a estrógenos disminuye el riesgo, y retrasa el principio y desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y la EP (Morale *et al.*, 2006; Gillies *et al.*, 2014). Estudios muestran de células dopaminérgicas expuestas a glutamato, O_2^- , y H_2O_2 , los estrógenos presentan actividad antioxidante (Sawada *et al.*, 1998; Sawada y Shimohama, 2000), asimismo, tienen la capacidad de incrementar la expresión de la enzima TH para la síntesis de DA (Kipp *et al.*, 2006), incrementan la densidad de espinas dendríticas (Brocca *et al.*, 2013), activan factores neurotróficos y de esta manera producen neuroprotección (Sawada y Shimohama, 2000; Kipp *et al.*, 2006).

Más aún, en un estudio realizado en nuestro laboratorio se reportó que animales inyectados con 6-OHDA en el haz medial, presentan edema de los botones pre-sinápticos, pérdida de espinas dendríticas, aumento en las sinapsis perforadas y pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNc. Dichas alteraciones fueron sexo-dependientes, es decir, el daño

fue menor y estadísticamente diferente en las hembras con respecto a los machos, pudiéndose atribuir esta diferencia a la presencia de los estrógenos (Flores-Martínez, 2005); por ello, es factible pensar que los estrógenos podrían disminuir el riesgo y/o retrasar el desarrollo de la EP.

De acuerdo a lo anterior, es importante explorar las diferencias entre sexos sobre las alteraciones motoras y los tratamientos debido a que los mecanismos de neuroprotección de los estrógenos podrían dar lugar a terapias diferenciales en la EP.

JUSTIFICACIÓN

La L-DOPA sigue siendo el fármaco más empleado en el tratamiento de la EP debido a su eficacia clínica, pero cuando se administra a largo plazo tiene efectos adversos como las discinecias; debido probablemente a que la L-DOPA puede auto-oxidarse e incrementar el estrés oxidativo y de esta manera acelerar la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. En estudios previos de nuestro laboratorio utilizamos la melatonina debido a su eficacia como antioxidante, la cual fue administrada durante 30 días, los animales presentaron recuperación de las alteraciones motoras, citológicas y disminución en los niveles de peroxidación de lípidos inducidos por la neurotoxina 6-OHDA; por ello consideramos relevante probar si la combinación de L-DOPA/melatonina administrada por tiempo prolongado (6 meses) podría ejercer efecto benéfico sobre las alteraciones motoras y citológicas, y comparar su efecto con la administración de L-DOPA y la melatonina.

Por otra parte, como se mencionó, la mayoría de las mujeres que desarrollan la EP son post-menopáusicas, y debido a que los estrógenos presentan efecto neuroprotector es importante determinar las diferencias entre sexos en la evolución de los síntomas y las respuestas a los diferentes tratamientos, ya que podrían generar nuevas estrategias terapéuticas diferenciales basadas en hormonas.

Todo lo anterior es con el fin de proponer un tratamiento novedoso que se pueda utilizar en los pacientes con EP para ayudar a mejorar su calidad de vida.

HIPÓTESIS

La melatonina tiene propiedades antioxidantes, por lo que la co-administración de L-DOPA/melatonina podría evitar la auto-oxidación de la L-DOPA y con ello prevenir los DIL, favorecer la supervivencia celular en la SNc y la conservación de las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del NE.

Por otro lado existen evidencias de que los estrógenos tienen efecto neuroprotector, por lo que las ratas hembra con ovarios, podría atenuarse el daño en comparación con los machos y las hembras ovx y responder mejor a los tratamientos.

OBJETIVO GENERAL

Comparar el efecto de la administración crónica de L-DOPA, melatonina y la co-administración de L-DOPA/melatonina en ratas macho, hembras intactas y hembras ovariectomizadas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA.

Objetivos particulares

Comparar el efecto de la administración crónica de los tres tratamientos sobre:

- La ejecución de la conducta motora fina, evaluada mediante la prueba de la viga de equilibrio y la prueba de la escalera.
- El desarrollo de LID evaluada con la prueba de movimientos involuntarios anormales (MIAs)
- La sobrevivencia de neuronas inmunopositivas a TH en la SNc
- El número de espinas dendríticas en las neuronas espinosas medianas del estriado

METODOLOGÍA

Prueba de la escalera

Los experimentos se llevaron a cabo en ratas ♀ y ♂ de la cepa Wistar, con peso inicial de 180-200 g. Con la prueba de la escalera evaluamos la habilidad motora fina de las extremidades delanteras de los animales, la cual depende del nivel de integridad del sistema dopaminérgico (Brizard *et al.*, 2006). En resumen, la escalera es un dispositivo plástico con una plataforma intermedia entre dos escaleras de 6 escalones a cada extremo (figura 1) que contienen fragmentos de su comida habitual, las ratas tenían que tomar los fragmentos de comida y comerlos. Para la realización de esta prueba los animales fueron previamente entrenados y la cantidad de alimento fue restringida a 10-15 g de su comida habitual al final de cada día para mantener su peso corporal al 90% de su nivel de alimentación libre, los animales fueron colocados en el dispositivo una vez al día durante 10 minutos por siete días, y se registró el número de aciertos –tomar los pedazos de alimento, llevarlos a la boca y comerlos- y se utilizaron aquellos animales que comieron mínimo el 80% de las pastillas (Galvan, 2000).

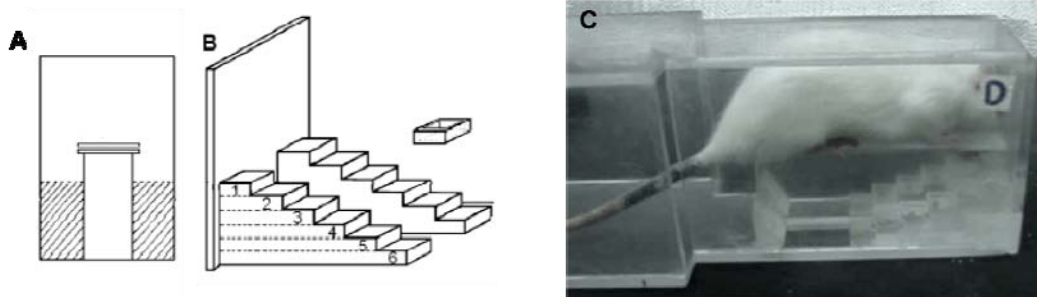


FIGURA 1. Dispositivo de acrílico para la prueba de habilidades manuales en la escalera. A, pared anterior de acrílico y plataforma. B, escalera de seis peldaños para colocar fragmentos de comida a ambos lados de la plataforma intermedia. C, representación de un animal dentro del dispositivo durante la ejecución de la prueba, donde se observa que la rata utiliza su extremidad izquierda para tomar la pastilla y comerla. Se contó el número de aciertos (fragmentos comidos) por cada lado en un lapso de 10 minutos. Modificado de Montoya *et al.*, 1991.

Prueba de la viga

La prueba de la viga de equilibrio nos permitió registrar el deterioro motor en términos del deseo de iniciar el movimiento, lentitud, balance y de la rigidez muscular (figura 2). En el entrenamiento se utilizó un aparato de madera con dos pedestales a los cuales va unida una viga de madera de 2m de largo con una inclinación de 15°. Se utilizaron vigas de 6 y 12mm de grosor por donde los animales debían caminar hasta alcanzar su caja hogar desde la parte más baja del aparato. Se registró con un cronómetro el tiempo total en que los animales tardaban en atravesar cada viga las cuales fueron colocadas en orden aleatorio. Se escogieron para experimentación aquellas ratas que subieron cada viga sobre su canto en menos de 120 segundos en el quinto día de entrenamiento consecutivo.

Al término de los entrenamientos se realizó una evaluación control en las diferentes pruebas motoras.



FIGURA 2. Prueba de la viga de equilibrio

Ovariectomía

La ovariectomía se llevó a cabo bajo anestesia con pentobarbital (35 mg/kg, intra peritoneal –ip–), se rasuró la porción dorsal y se realizó una incisión dorsal-medial de aproximadamente 1.5 cm a nivel de la piel. Posteriormente se jaló la piel hacia un flanco del animal para disectar la musculatura abdono-torácica a la altura del ovario, se separó el ovario y tejido graso circundante unido a la trompa de falopio, se ligó con sutura absorbente y se cortó el ovario distalmente para mantener la ligadura y separar únicamente el ovario.

Este mismo procedimiento se realizó en el otro flanco del animal. Al finalizar la incisión se suturó y se dejaron recuperar durante dos semanas con el propósito de igualar los niveles bajos de estrógenos después de la menopausia (Quesada *et al.*, 2004; Sarkaki *et al.*, 2008; Baraka *et al.*, 2011) y determinar las diferencias entre sexos en la evolución de las alteraciones motoras y las respuestas a los diferentes fármacos.

Cirugía estereotáxica y tratamientos

Las ratas macho, hembras intactas (c/ov) y hembras ovx fueron anestesiadas con pentobarbital (35 mg/kg ip) y colocadas en el aparato estereotáxico (Kopf instruments, EUA) para la lesión. Se les inyectó 4 µl de solución salina al 0.9%, que contenían 0.2 mg de ácido ascórbico (para evitar la autooxidación de la toxina), y 8 µg de 6-OHDA (Sigma Chemical, EUA) en el haz medial del cerebro anterior del hemisferio izquierdo con las coordenadas: AP=3.0 mm respecto a la línea interaural, L=1.6 mm respecto a bregma y V=8.0 mm respecto a la duramadre (Paxinos y Watson 1986). Los animales del grupo control (n=5) fueron inyectados en el mismo sitio con 4 µl de solución vehículo. A las 48 hrs se les administró apomorfina ip (0.25 mg/kg) para inducir giro y sólo se utilizaron aquellos animales que presentaron 200 giros o más durante 30 minutos (Ungerstedt y Arbuthnott, 1970). Esto fue con el propósito de seleccionar los animales con aproximadamente el 90% de pérdida de DA estriatal y de más del 80% de pérdida de neuronas dopaminérgicas inmunopositivas a TH en la SNc (Hudson *et al.*, 1993; Moore *et al.*, 2001). 24 horas posteriores a la prueba de giro, las ratas macho, hembras c/ov y hembras ovx recibieron diariamente los diferentes fármacos como se describe en la tabla 1, por vía oral. El tiempo de tratamiento de los fármacos se decidió en base a que 6 meses de una rata es equivalente a 15 años de evolución en los pacientes.

Es importante mencionar que las dosis empleadas de 10 mg/kg de melatonina fue en base a revisión bibliográfica donde se muestra que tiene efectos neuroprotectores, además en estudios previos, nosotros utilizamos esta misma dosis encontrando efecto neuroprotector sobre las neuronas dopaminérgicas y disminución de los niveles de peroxidación de lípidos (Gutiérrez-Valdez, 2007, 2012; Torres-Esquivel, 2012). Asimismo empleamos dosis bajas de 7.5 mg/kg de L-DOPA/carbidopa comercial (Sinemet) la cual es utilizada en la clínica (Picconi *et al.*, 2003; Lindgren *et al.*, 2007).

Las evaluaciones conductuales se realizaron cada 7 días durante el primer mes, posteriormente cada 14 días hasta los 6 meses. Cabe señalar que los animales fueron evaluados después de 4 horas de la toma del medicamento con el propósito de que las discinesias no influyeran en la ejecución de los animales, asimismo las evaluaciones se realizaron en diferentes días para cada prueba con el fin de evitar la fatiga.

GRUPO	INYECCIÓN EN EL HAZ MEDIAL	TRATAMIENTO
I	Solución vehículo	Solución vehículo (n=5)
II	6-OHDA	Solución vehículo (n=5)
III	6-OHDA	7.5 mg/kg L-DOPA (n=5)
IV	6-OHDA	10 mg/kg melatonina (n=5)
VI	6-OHDA	7.5 mg/kg L-DOPA +10 mg/kg melatonina (n=5)

TABLA 1. Protocolo de administración de los fármacos a ratas ♂, ♀ intactas y ♀ ovx, por vía oral durante 6 meses.

Evaluación de Movimientos Involuntarios Anormales (MIAs)

Después de haber iniciado los diferentes tratamientos, la severidad de los MIAs fueron evaluados mensualmente de acuerdo a la escala Cenci (Cenci y Lundblad, 2007). Para esto, las ratas fueron colocadas de forma individual en cajas de acrílico y fueron observadas y videograbadas durante un minuto cada 20 minutos, 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 toma del fármaco. Se evaluaron 4 subtipos de MIAs de acuerdo a su distribución topográfica (figura 3):

- 1) Locomotoras: movimientos giratorios hacia el lado contralateral a la lesión.
- 2) Axiales: desviaciones laterales o torsión de la cabeza, cuello y tronco hacia el lado contralateral.

- 3) 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.
- 4) 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 sobre todo en la pata contralateral a la lesión.

#

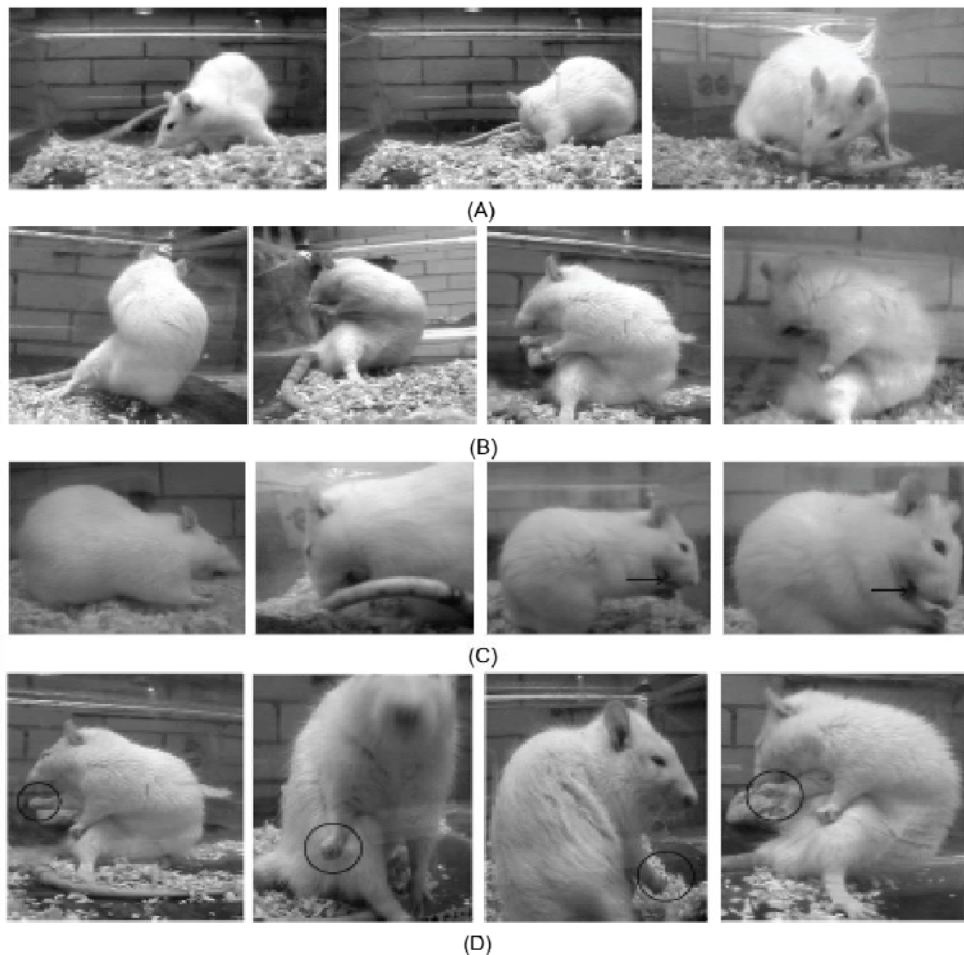


FIGURA 3. Secuencias de videos, donde se muestra los MIAs de acuerdo a su distribución topográfica: los locomotores (A); axiales (B); orolinguales (C), y de extremidades anteriores (D). #

La severidad de los diferentes subtipos de MIAs que presentaban durante un minuto de observación fueron calificadas del 0 al 4, así el valor de severidad 0 fue asignado cuando los animales no manifestaron ningún tipo de DIL, el valor 1, cuando los animales presentaron menos del 50% del tiempo de observación; el valor 2, fue asignado a aquellos animales que presentaron las alteraciones por más del 50%, el valor 3, cuando los animales manifestaban discinesias todo el tiempo pero eran interrumpidas por algún estímulo externo como un sonido o un ligero golpe en la caja; el valor máximo fue 4, y fue asignado a los animales que presentaron MIAs todo el tiempo aún cuando se presentara algún estímulo externo (Cenci *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000; Lundblad *et al.*, 2002). En el caso de movimientos con severidad intermedia la escala permite la asignación de valores fraccionarios como 0.5, 1.5, 2.5 y 3.5 con el propósito de obtener mayor sensibilidad y precisión (Lundblad *et al.*, 2002).

Preparación del tejido histológico

Al término de los tratamientos (6 meses) los animales se sacrificaron mediante perfusión intracardiaca por vía aórtica bajo anestesia profunda con pentobarbital. Primero se perfundió con solución salina al 0.9% y después con solución fijadora con glutaraldehído/paraformaldehído al 2% en solución buffer de fosfatos (PB) 0.1 M. Los cerebros fueron removidos y embebidos en la misma solución fijadora por una hora.

Inmunohistoquímica anti-tirosina hidroxilasa (TH)

Se realizaron cortes histológicos del mesencéfalo ventral a nivel de la SNc de 50 μm con un vibratomo (Pelco 101, Ted Pella Inc, EUA) para el marcaje con el anticuerpo para TH (1:1000, Chemicon International Inc. CA, EUA) con el método ABC (Vector Lab MI, EUA) para la detección de neuronas catecolaminérgicas. Se realizó el conteo de neuronas inmunopositivas a TH en la SNc del lado ipsi y contralateral a la lesión por microscopía de luz, con una cámara (Cannon PC1087) acoplada a un microscopio óptico (Nikon, Japón). Con ayuda del software Motic Image Plus 2.0ML se delimitó el área de conteo en la SNc (1500 μm^2) en cada hemisferio, se contaron 7 cortes del mesencéfalo por cada rata (Avila-Costa *et al.*, 2004).

Impregnación argéntica por el método de Golgi

Los cerebros se procesaron por el método de Golgi rápido. Se obtuvieron cortes coronales de 90 µm que contenían el núcleo estriado. El análisis consistió en el conteo de las espinas dendríticas en una longitud de 10 µm en 4 dendritas secundarias de 10 neuronas espinosas medianas (Avila-Costa *et al.*, 2004).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante la prueba de ANOVA de dos vías, seguido por la prueba de comparación múltiple de Tukey, el nivel de significancia fue de $P < 0.05$. Para las discinesias fueron expresadas como la media de los valores totales de cada MIA y además, se les realizó un análisis del área bajo la curva (ABC). Los análisis se realizaron con el software Graph Pad Prism 5.0 para Mac (CA, EUA).

RESULTADOS

Prueba de la escalera

Como es bien sabido la ejecución de la actividad motora es cruzada, nosotros lesionamos el lado izquierdo (lado ipsilateral a la lesión) afectando el lado derecho (lado contralateral a la lesión), por ello solo se muestran los resultados del miembro contralateral a la lesión.

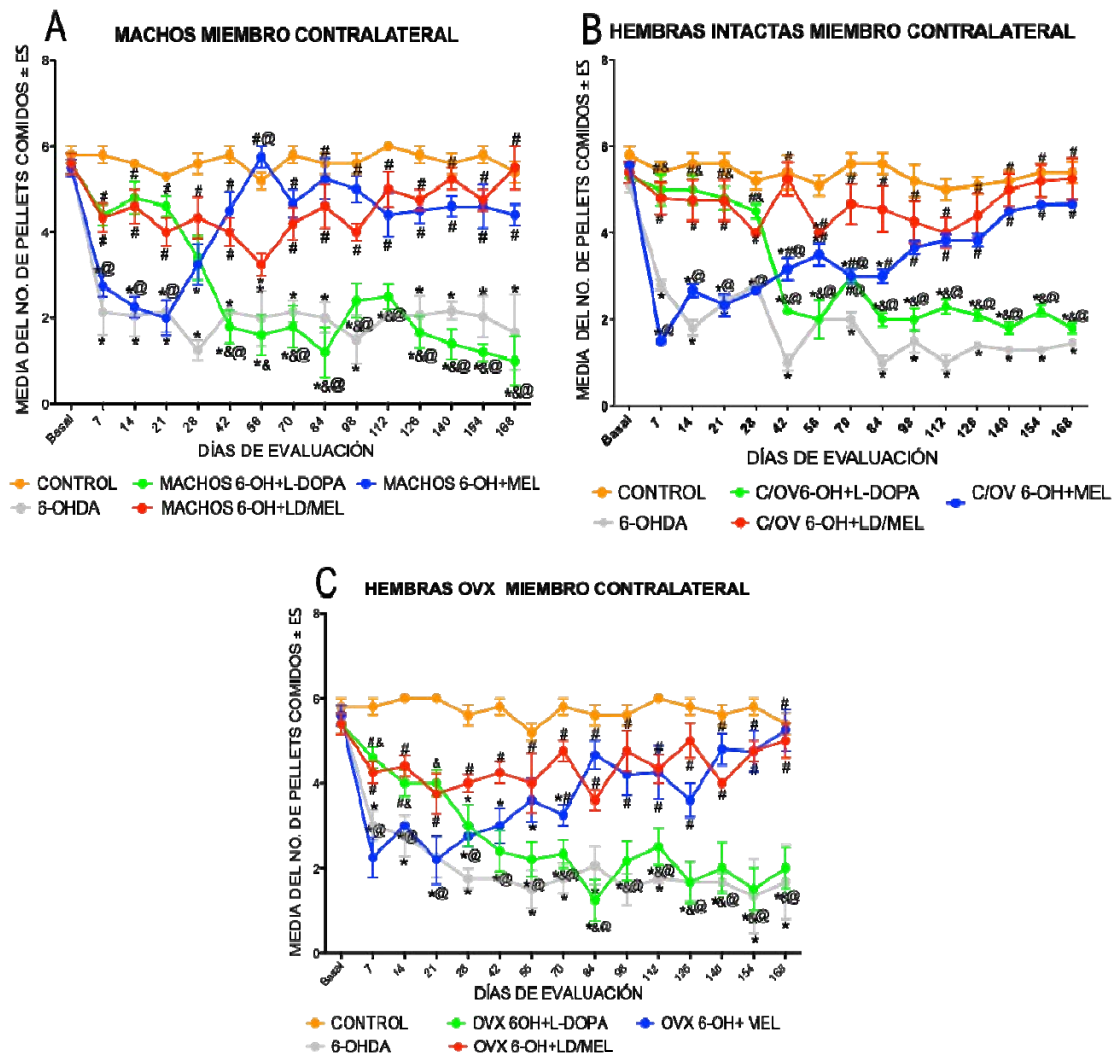
Para observar el efecto de los diferentes fármacos, los datos de los animales machos hembras c/ov y hembras ovx fueron graficados por separado (gráfica 1A, 1B y 1C respectivamente).

Como podemos observar en las gráficas 1 A, B y C todos los animales del grupo control mantuvieron prácticamente el mismo número de aciertos a los basales durante todo el estudio. Asimismo, cualitativamente pudimos observar que los animales presentaron los movimientos típicos para lograr tomar las pastillas: 1) se preparaba para tomar el alimento, 2) estiraba el miembro, 3) tomaba la pastilla (movimiento de pronación), 4) retiraba y giraba la muñeca (supinación), 5) comía el pellet (Clarke *et al.*, 2007); cada componente se observó en los animales control durante todas las evaluaciones.

Todos los animales con 6-OHDA sin tratamiento mostraron alteraciones en la conducta motora en todas las evaluaciones mostrando disminución drástica del número de aciertos, a diferencia de todos los animales con 6-OHDA+L-DOPA, quienes presentaron recuperación de la conducta hasta los 21-28 días de tratamiento, posteriormente presentaron alteración de la conducta motora comportándose como los animales 6-OHDA sin tratamiento (gráficas 1 A, B y C). Asimismo, de manera cualitativa observamos que dichos animales realizaban pocos esfuerzos para alcanzar las pastillas, no presentaban los movimientos típicos para tomar las pastillas, ya que sus movimientos eran torpes al intentar tomar la pastilla de los escalones, presentaban alteraciones al orientar la pastilla para llevarla hacia la boca, los animales parecían incapaces de extender los dígitos y utilizaban sus dientes para y retirar la pastilla y comerla.

La actividad motora de todos los animales con 6-OHDA+melatonina al principio presentó valores similares a los animales con 6-OHDA sin tratamiento, posteriormente tuvieron recuperación gradual de la conducta alcanzando los valores de los animales control, asimismo, es importante mencionar que presentaron mayor coordinación, y presentaron los movimientos típicos para lograr tomar las pastillas y comerlas, similares a los animales control.

Todos los animales con 6-OHDA+L-DOPA/melatonina presentaron mejoría en su desempeño motor desde el inicio del tratamiento, perdurando este efecto hasta el final del estudio, es decir el número de aciertos fue similar al de los animales del grupo control (gráficas 1A, B y C). Además se pudo observar que los animales presentaron los 5 movimientos típicos para lograr el objetivo al tomar las pastillas.

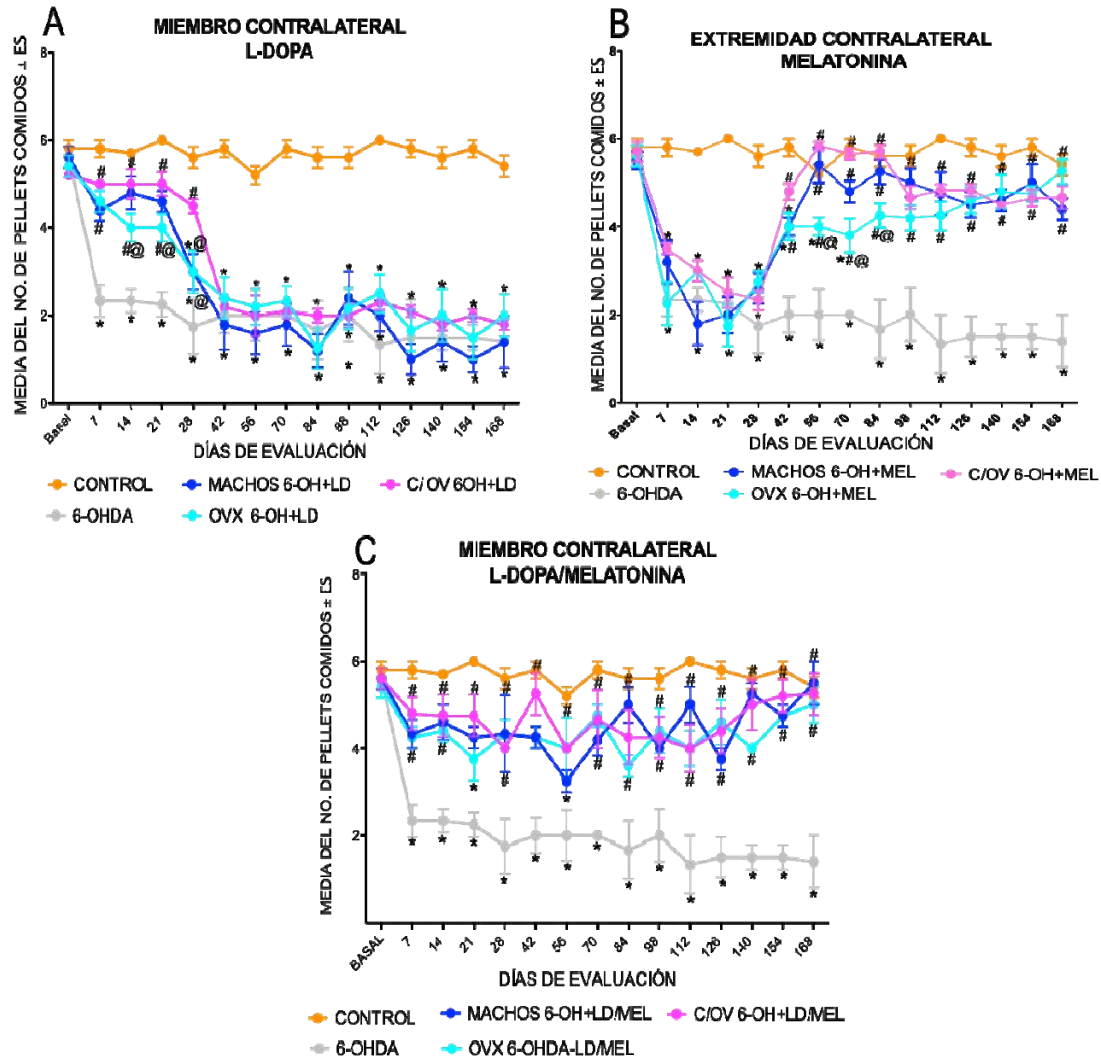


GRÁFICA 1. Resultados obtenidos en la prueba de la escalera con el miembro contralateral a la lesión, se registró el número de aciertos de los animales machos (A), hembras intactas (c/ov; B) y hembras ovariectomizadas (ovx; C) lesionados con 6-OHDA, 6-OHDA+L-DOPA (6-OH+LD), 6-OHDA+melatonina (6-OH+MEL) y 6-OHDA+L-DOPA/melatonina (6-OH+LD/MEL). Se observa que todos los animales 6-OHDA+L-DOPA mejoran su actividad motora durante los primeros 28 días de tratamiento y posteriormente se deteriora, mientras que todos los animales 6-OHDA+melatonina presentaron recuperación motora gradual. Interesantemente todos los animales 6-OHDA+L-DOPA/melatonina mejoraron desde el inicio del tratamiento permaneciendo así durante todo el estudio. * Grupos experimentales vs control; # Tratamientos vs Lesión con 6-OHDA; & 6-OHDA+L-DOPA vs 6-OHDA+melatonina; @ 6-OHDA+L-DOPA y 6-OHDA+melatonina vs 6-OHDA+L-DOPA/melatonina. $P < 0.05$.

Con el propósito de llevar a cabo la comparación entre sexos, los datos de las ratas machos, hembras c/ov y hembras ovx fueron graficados por tratamiento (gráfica 2). Las ratas machos, hembras c/ov y hembras ovx con 6-OHDA+L-DOPA mantuvieron la actividad de su extremidad contralateral similar al grupo control por aproximadamente 21 días, a partir de entonces los animales macho y hembras ovx disminuyeron su actividad alcanzando valores similares a los animales 6-OHDA sin tratamiento. Notablemente, las hembras c/ov presentaron retraso en el deterioro motor a partir de los 28 días, en comparación con los machos y hembras ovx con 6-OHDA+L-DOPA (gráfica 2A).

Los animales machos, hembras c/ov y hembras ovx con 6-OHDA+melatonina, mostraron disminución en el número de aciertos durante los primeros 28 días de tratamiento similar a los animales 6-OHDA sin tratamiento, posteriormente mejoraron su actividad. Es importante destacar que los animales machos y las hembras c/ov 6-OHDA+melatonina mejoraron su actividad, alcanzando valores similares a los animales control a partir de los 42 días de tratamiento, a diferencia de las hembras ovx que alcanzaron los valores del grupo control a los 82 días de tratamiento, es decir que los animales macho y las hembras c/ov se recuperaron más rápido en comparación con las hembras ovx (Gráfica 2B).

Todos los animales con 6-OHDA+L-DOPA/melatonina presentaron desempeño motor similar a los animales del grupo control durante los 6 meses de tratamiento y no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sexos (Gráfica 2C).



GRÁFICA 2. Comparación entre sexos en la prueba de la escalera del miembro contralateral a la lesión, se registró el número de aciertos para la comparación de los animales machos, hembras intactas (c/ov) y ovariectomizadas (ovx) lesionados con 6-OHDA+L-DOPA (A), 6-OHDA+melatonina (B) 6-OHDA+L-DOPA/melatonina (C). Es importante hacer notar que las hembras c/ov con 6-OHDA+L-DOPA (6-OH+LD) presentan retraso en el deterioro motor en comparación con los machos y las hembras ovx (A), los animales machos y hembras c/ov con 6-OHDA+melatonina (6-OH+MEL) se recuperan más rápido en comparación con las hembras ovx (B), finalmente los animales del grupo que recibieron 6-OHDA+L-DOPA/melatonina (6-OH+LD/MEL), presentan recuperación de la conducta desde el inicio del tratamiento. * Grupos experimentales vs control; # Tratamientos vs Lesión con 6-OHDA; @ hembras c/ov con tratamiento vs machos y hembras ovx. $P < 0.05$.

Prueba de la viga

En las gráficas 3 A, B y C se muestra el efecto de los diferentes tratamientos en los animales machos, hembras c/ov y hembras ovx en la prueba de la viga, donde se registró el tiempo que tardaron en recorrer la viga de 12 mm de grosor.

Los animales con 6-OHDA sin tratamiento incrementaron significativamente el tiempo de recorrido en comparación con los animales del grupo control, permaneciendo así durante todo el estudio. Asimismo, los animales del grupo lesión presentaron ciertas características motoras como: rigidez y mucha torpeza en sus movimientos al recorrer la viga, las ratas se dedicaban principalmente a explorar, el caminar era muy lento en comparación con la evaluación control y la mayoría de los animales no pudieron recorrer la viga en el plazo establecido, dichas alteraciones motoras son análogas a los comportamientos observados en los pacientes con EP (Allbutt y Henderson, 2007).

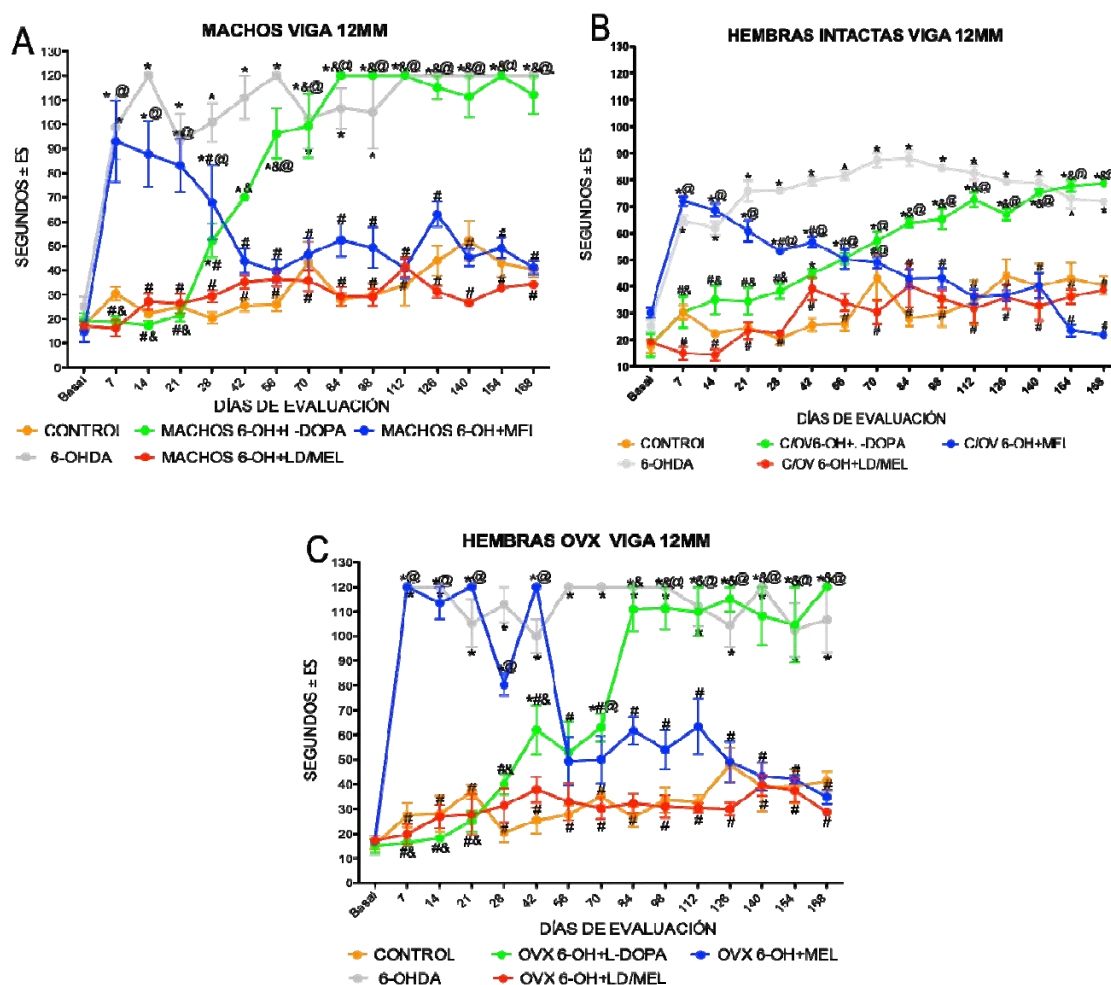
Todos los animales del grupo 6-OHDA+L-DOPA mostraron mejoría estadísticamente significativa en la actividad durante aproximadamente 21-28 días, es decir presentaron tiempos de recorrido similares al grupo control, posteriormente los animales incrementaron el tiempo de recorrido, comportándose de manera similar al grupo exclusivamente 6-OHDA sin tratamiento.

Las ratas con 6-OHDA+melatonina, al inicio del tratamiento presentaron incremento en el tiempo de recorrido hasta aproximadamente los 28 días, presentando valores de recorrido similares a los animales 6-OHDA, posteriormente a los 42 días (tiempo en que el tratamiento solo con L-DOPA deja de ser efectivo), los animales mejoraron su actividad motora observado por la disminución en el tiempo de recorrido, alcanzando los valores de los animales del grupo control.

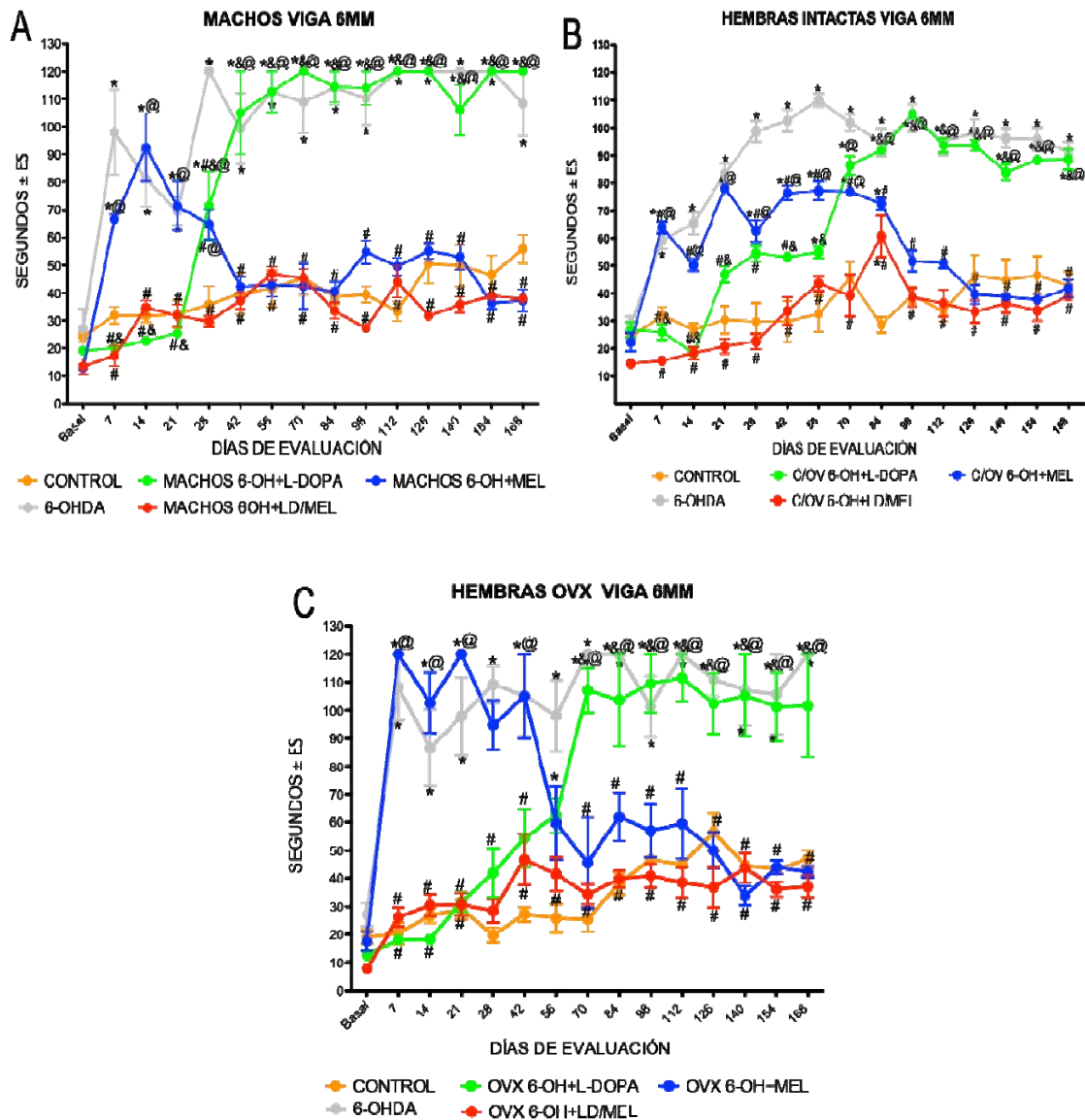
De manera sorprendente las ratas con la co-administración 6-OHDA+L-DOPA/melatonina presentaron actividad motora similar a los animales control durante todo el estudio (gráfica 3).

Los tiempos en la viga de 6mm de grosor refleja la misma tendencia que la viga de 12mm, mostrando que los animales con L-DOPA después de 28 días de tratamiento incrementaron el tiempo de recorrido, mostraron un comportamiento similar a los animales con 6-OHDA.

Los animales con 6-OHDA+melatonina presentan recuperación entre los 42 y 56 días de tratamiento. Nuevamente podemos observar que la co-administración de L-DOPA/melatonina mejoró la conducta motora de los animales durante todo el estudio (gráfica 4).



GRÁFICA 3. Tiempo de recorrido sobre la viga de 12 mm de los animales machos (A), hembras intactas (c/ov; B) y hembras ovariectomizadas (ovx; C) lesionados con 6-OHDA, 6-OHDA+L-DOPA, (6-OH+LD) 6-OHDA+melatonina (6-OH+MEL) y 6-OHDA+L-DOPA/melatonina (6-OH+LD/MEL). Se observa que todos los animales 6-OHDA+L-DOPA mejoran su actividad motora durante los primeros 28 días de tratamiento y posteriormente incrementan drásticamente el tiempo de recorrido. Todos los animales 6-OHDA+melatonina presentaron recuperación motora gradual. De manera sorprendente todos los animales 6-OHDA+L-DOPA/melatonina presentaron tiempos de recorrido similares a los animales control. * Grupos experimentales vs control; # Tratamientos vs Lesión con 6-OHDA; & 6-OHDA+L-DOPA vs 6-OHDA+melatonina; @ 6-OHDA+L-DOPA y 6-OHDA+melatonina vs co-administración 6-OHDA+L-DOPA/melatonina. P < 0.05.

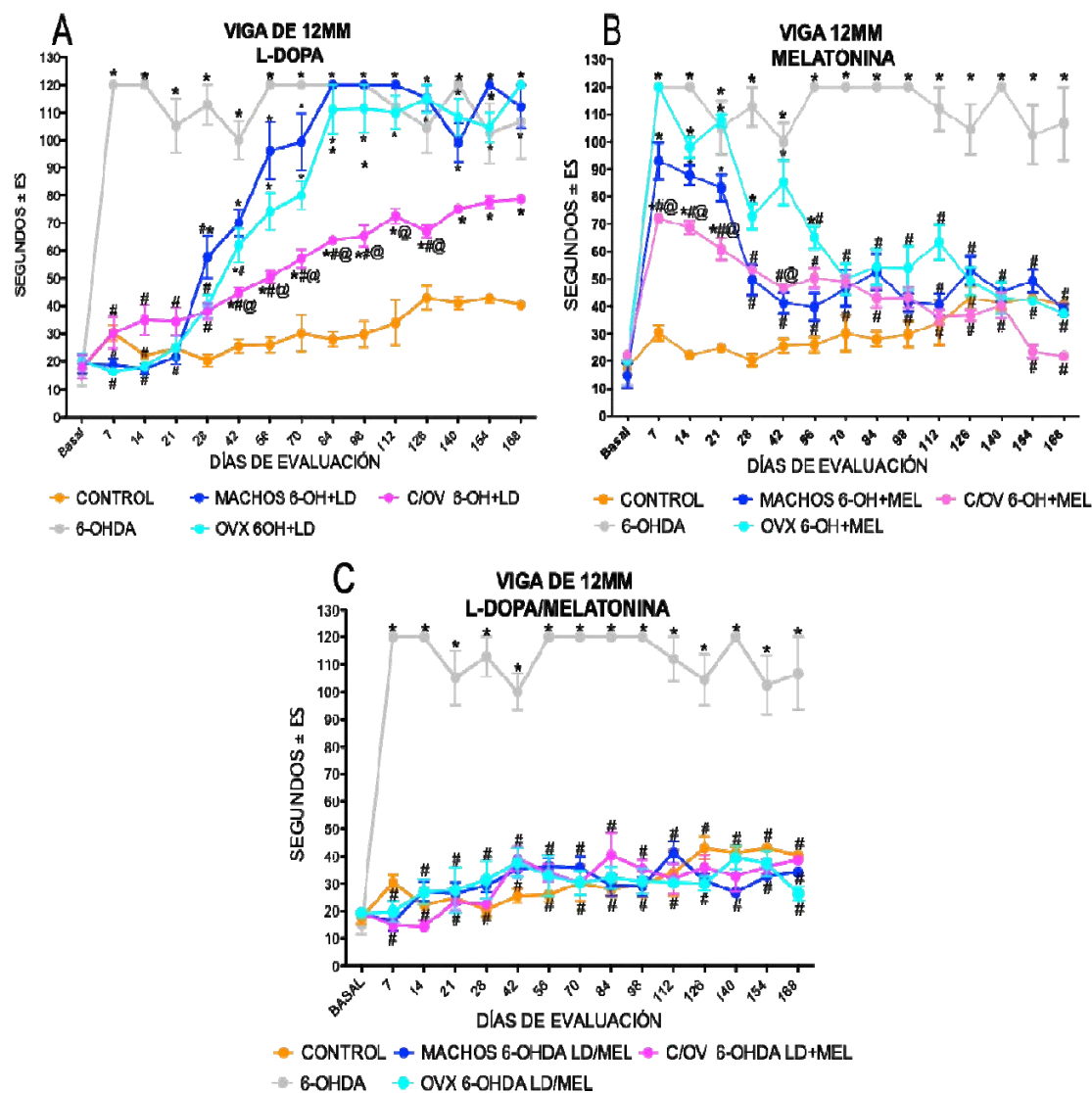


GRÁFICA 4. Tiempo de recorrido sobre la viga de 6mm de los animales machos (A), hembras intactas (c/ov; B) y hembras ovariectomizadas (ovx; C) lesionados con 6-OHDA, 6-OHDA+L-DOPA, (6-OH+LD) 6-OHDA+melatonina (6-OH+MEL) y 6-OHDA+L-DOPA/melatonina (6-OH+LD/MEL). Se observa que todos los animales 6-OHDA+L-DOPA después de 28 días de tratamiento incrementan drásticamente el tiempo de recorrido. Los animales 6-OHDA+melatonina presentaron recuperación motora gradual. Nótese que los animales que recibieron 6-OHDA+L-DOPA/melatonina mejoraron la conducta motora durante todo el estudio * Grupos experimentales vs control; # Tratamientos vs Lesión con 6-OHDA; & 6-OHDA+L-DOPA vs 6-OHDA+melatonina; @ 6-OHDA+L-DOPA y 6-OHDA+melatonina vs co-administración 6-OHDA+L-DOPA/melatonina. $P < 0.05$.

Con respecto a la comparación entre sexos en el tiempo de recorrido en la viga de 12mm, los animales machos, hembras c/ov y hembras ovx con 6-OHDA+L-DOPA mostraron valores similares al grupo control durante los primeros 21 días, cabe señalar que los animales machos y hembras ovx con 6-OHDA+L-DOPA disminuyeron la rapidez de su ascenso llegando a valores similares al grupo con 6-OHDA al día 42 de tratamiento, a diferencia de las ratas hembras c/ov 6-OHDA+L-DOPA que mostraron un comportamiento similar a los animales con 6-OHDA a partir de los 126 días de tratamiento, es decir, que los animales hembras c/ov 6-OHDA+L-DOPA mostraron retraso en el deterioro motor en comparación con los machos y hembras ovx 6-OHDA+L-DOPA (gráfica 5A).

Los animales machos y hembras ovx con 6-OHDA+melatonina incrementaron el tiempo de recorrido como los animales lesionados con 6-OHDA sin tratamiento hasta los 21 días de tratamiento, a diferencia de las ratas hembras c/ov 6-OHDA+melatonina que incrementaron el tiempo de recorrido pero no fue tan drástico; posteriormente a los 28 días de tratamiento, los animales macho y las hembras c/ov con 6-OHDA+melatonina presentaron valores similares a los animales control, a diferencia de las hembras ovx que alcanzaron valores de los animales control hasta los 70 días de tratamiento, es decir que los machos y las hembras c/ov 6-OHDA+melatonina se recuperaron más rápido en comparación con las hembras ovx (gráfica 5B).

Es importante hacer notar que todos los animales tratados con la co-administración de 6-OHDA+L-DOPA/melatonina presentaron tiempos de recorrido similares a los animales del grupo control durante los 6 meses de tratamiento, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre sexos (gráfica 5C).

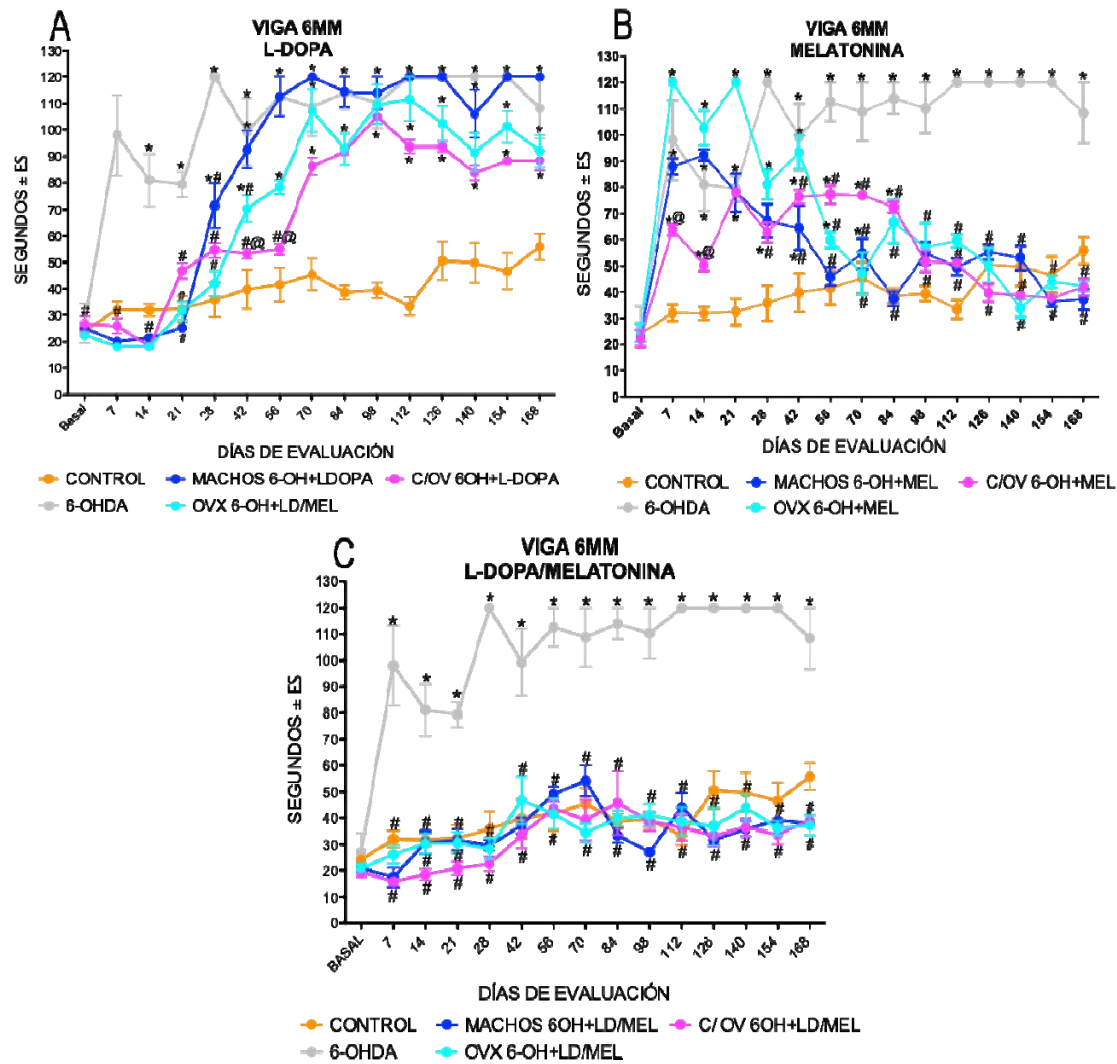


GRÁFICA 5. Comparación entre sexos en el tiempo de recorrido sobre la viga de 12 mm. De manera interesante observamos que las hembras intactas con 6-OHDA+L-DOPA (c/ov 6-OH+LD), a partir de los 42 días de tratamiento presentan retraso en el deterioro motor en comparación con los machos y hembras ovx 6-OHDA+L-DOPA (A). Las hembras intactas (c/ov) y los machos con 6-OHDA+melatonina (6-OH+MEL) alcanzaron valores de los animales control a los 28 días, a diferencia de las hembras ovx que se recuperaron hasta los 70 días de tratamiento (B), todos los animales con 6-OHDA+L-DOPA/melatonina (6-OH+LD/MEL) presentaron recuperación de la conducta desde el inicio del tratamiento perdurando este efecto durante todo el experimento. * Grupos experimentales vs control; # Tratamientos vs Lesión con 6-OHDA; @ hembras c/ov vs machos y hembras ovx $P < 0.05$.

En la viga de 6mm los animales presentaron un comportamiento similar a la viga de 12mm, donde nuevamente observamos que las hembras con c/ov 6-OHDA+L-DOPA presentaron retraso en el deterioro motor en comparación con los machos y hembras ovx con 6-OHDA+L-DOPA (gráfica 6A).

Las hembras c/ov con 6-OHDA+melatonina presentaron menor tiempo de recorrido en los primeros 21 días comparado con los machos y las hembras ovx con 6-OHDA+melatonina, posteriormente empezaron a disminuir los tiempos de recorrido llegando a los valores de los animales control aproximadamente a los 70-98 días de tratamiento (gráfica 6B).

Finalmente, todos los animales que recibieron 6-OHDA+L-DOPA/melatonina presentaron tiempos de recorrido similares a los animales control durante los 6 meses de evaluación (gráfica 6C).



GRÁFICA 6. Comparación entre sexos en el tiempo de recorrido sobre la viga de 6 mm. Nuevamente observamos que las hembras intactas (c/ov) con 6-OHDA+L-DOPA (6-OH+LD), presentan retraso en el deterioro motor en comparación con los machos y hembras ovx 6-OHDA+L-DOPA (A). Las hembras intactas (c/ov) y los machos con 6-OHDA+melatonina (6-OH+MEL) se recuperan más rápido a diferencia de las hembras ovx (B), todos los animales con 6-OHDA+L-DOPA/melatonina (6-OH+LD/MEL) presentaron recuperación de la conducta desde el inicio del tratamiento perdurando este efecto durante todo el experimento. * Grupos experimentales vs control; # Tratamientos vs Lesión con 6-OHDA; @ hembras c/ov vs machos y hembras ovx. $P < 0.05$

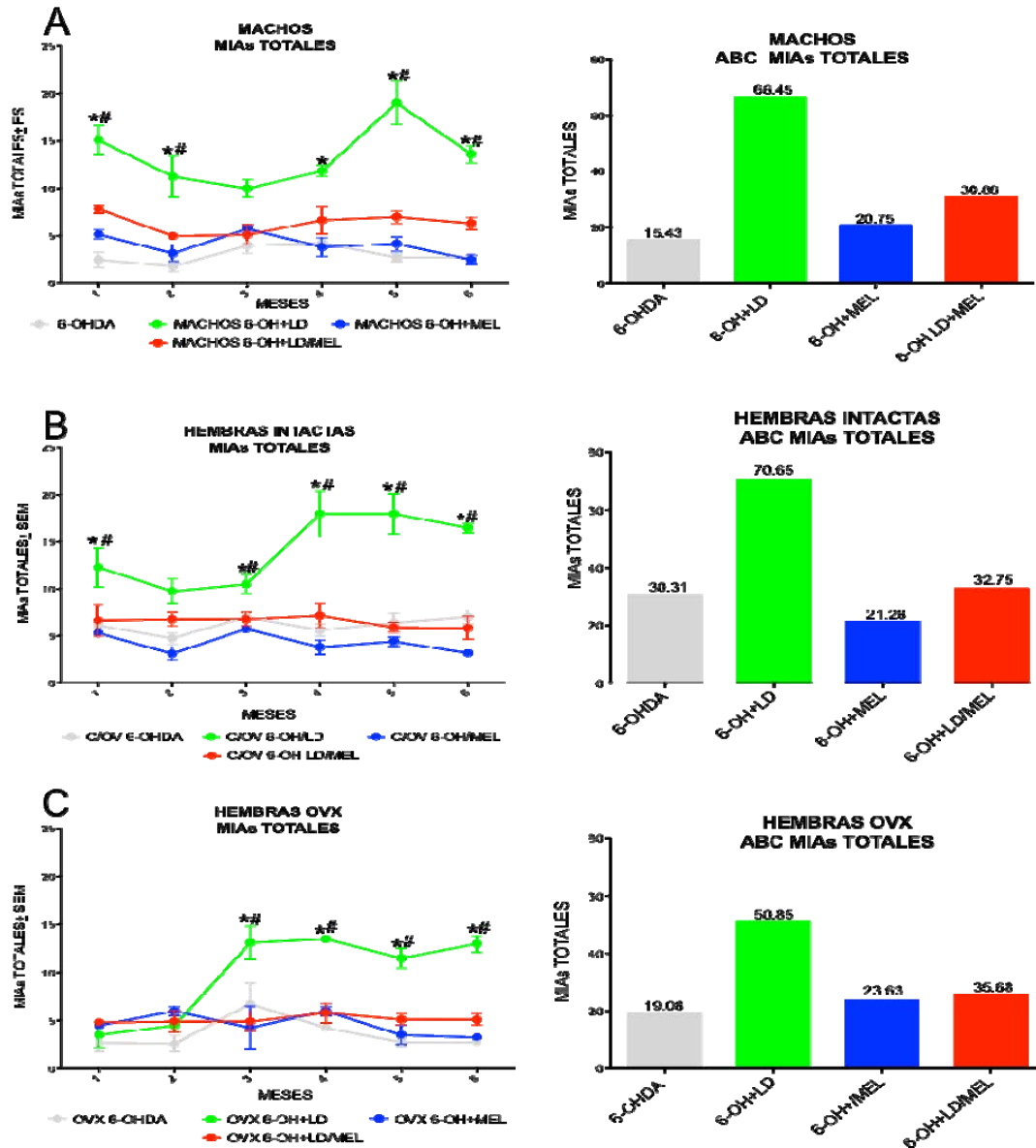
Movimientos Involuntarios Anormales (MIAs)

Los MIAs que desarrollaron los animales fueron clasificados en cuatro diferentes subtipos: orolingual, extremidad, axial y locomoción, con el fin de obtener un panorama general, se realizó la sumatoria de todos los subtipos de MIAs (orolingual + extremidad + axial + locomotora), asimismo con el objeto de hacer más evidente los resultados se realizó un análisis del Área Bajo la Curva (ABC).

Está bien establecido que en la ausencia de lesión, los roedores intactos no desarrollan MIAs después del tratamiento crónico con L-DOPA (Smith *et al.*, 2012), por ello el análisis de las discinesias inducidas por L-DOPA sólo fue llevado a cabo en animales lesionados.

Al comparar el efecto de los diferentes fármacos encontramos que todos los animales lesionados con 6-OHDA sin tratamiento y todos los animales 6-OHDA+melatonina presentaron bajos puntajes de MIAs y no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, además presentaron valores similares de ABC, a diferencia de los animales con 6-OHDA+L-DOPA que desde el primer mes de evaluación presentaron incremento en el puntaje total de MIAs e incremento drástico en el ABC, lo cual es equivalente a las discinesias inducidas por L-DOPA observadas en humanos y primates (Lundblad *et al.*, 2002).

Sorprendentemente todos los animales que recibieron la co-administración de 6-OHDA+L-DOPA/melatonina desarrollaron puntajes de MIAs y valores de ABC similares a los animales exclusivamente con 6-OHDA sin tratamiento y los animales 6-OHDA+melatonina, es decir, que este grupo a pesar de que recibieron L-DOPA, no presentaron la cantidad de discinesias que manifestaron los animales que se les administró exclusivamente L-DOPA (gráficas 7 A, B y C).

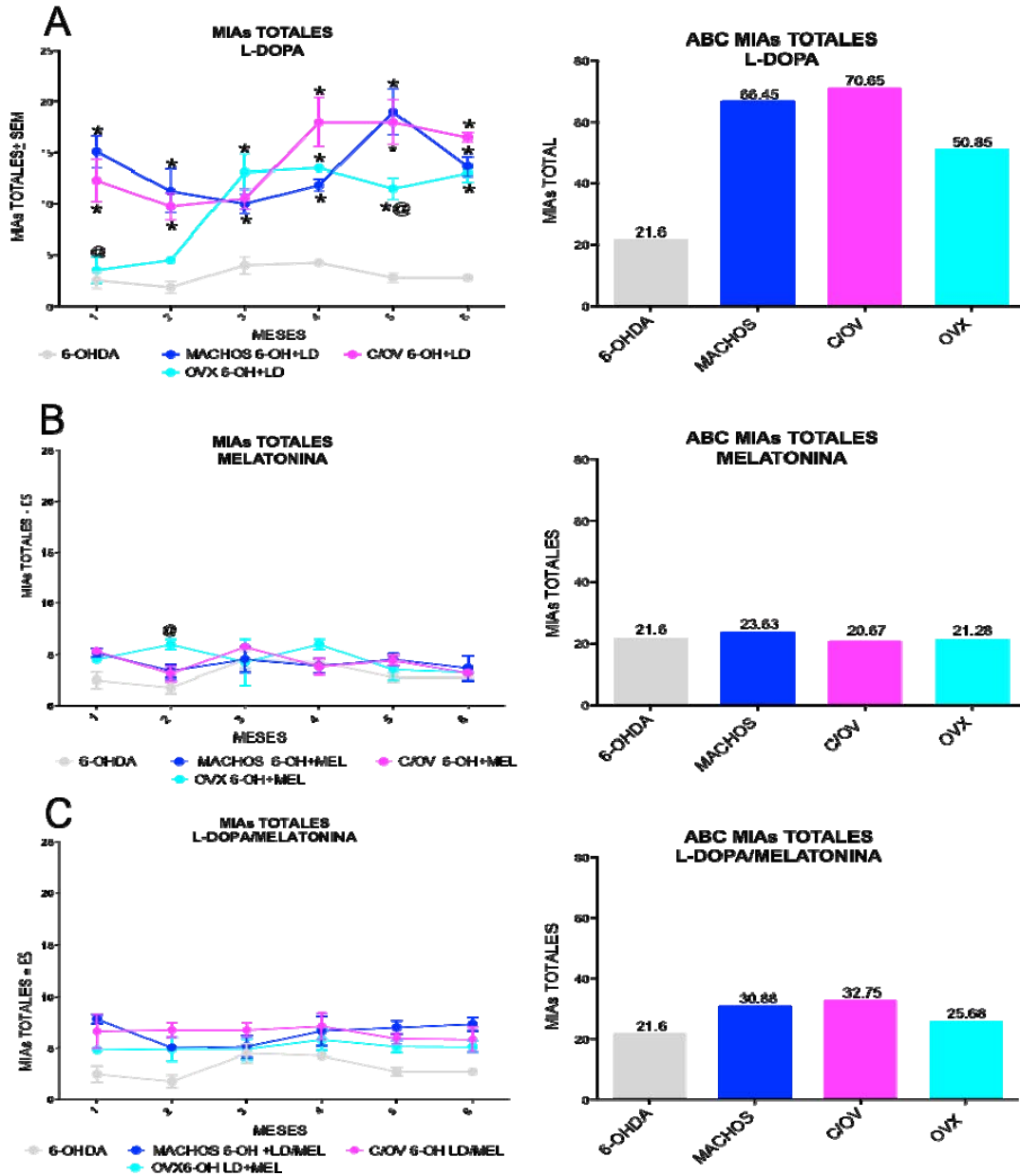


GRÁFICA 7. Del lado izquierdo se muestran las gráficas de MIAs totales (movimientos orolinguales + axiales + extremidad + giro) durante los 6 meses de tratamiento y a la izquierda se muestran las gráficas del análisis del Área Bajo la Curva (ABC), de los animales machos (A), hembras intactas (c/ov; B) y hembras ovariectomizadas (ovx; C) lesionadas con 6-OHDA que recibieron los diferentes tratamientos; nótese que todos los animales con 6-OHDA+L-DOPA (6-OH+LD) presentaron mayor puntuación de MIAs totales, así como mayor ABC en comparación con los animales con 6-OHDA sin tratamiento y 6-OHDA+melatonina (6-OH+MEL). De manera sorprendente todos los animales con 6-OHDA+L-DOPA/melatonina (6-OH+LD/MEL) no presentaron la cantidad de discinesias y el ABC que manifestaron los animales que se les administró exclusivamente L-DOPA. * 6-OHDA+L-DOPA vs 6-OHDA y 6-OHDA+melatonina; # 6-OHDA+L-DOPA vs 6-OHDA+L-DOPA/melatonina. $P < 0.05$.

Con respecto a los MIAs totales en la comparación entre sexos, observamos que las hembras ovx con 6-OHDA+L-DOPA comenzaron a desarrollar MIAs a partir de los tres meses de tratamiento a diferencia de los machos y hembras c/ov 6-OHDA+L-DOPA, los cuales mostraron MIAs a partir del primer mes de evaluación, es decir, que las hembras ovx 6-OHDA+L-DOPA, presentaron retraso en el desarrollo de MIAs, posteriormente los 3 grupos presentaron puntaje similar de MIAs y no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sexos, con respecto al análisis de ABC observamos que las hembras ovx 6-OHDA+L-DOPA presentaron menor área (56.85) con respecto a los machos 6-OHDA+L-DOPA (66.45) y hembras c/ov 6-OHDA+L-DOPA (70.65; gráfica 8A).

Las ratas macho, hembras c/ov y hembras ovx con 6-OHDA+melatonina desarrollaron bajos puntajes de MIAs similares a los animales con 6-OHDA sin tratamiento y no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sexos, asimismo presentaron valores similares de ABC (23.63, 20.67 y 21.28 puntos, respectivamente; gráfica 8B).

Es importante hacer notar que los animales macho, hembras c/ov y hembras ovx con 6-OHDA+L-DOPA/melatonina, desde la primera evaluación manifestaron bajos puntajes de MIAs y no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sexos, asimismo presentaron valores similares de ABC (30.88, 32.75 y 35.68 puntos, respectivamente; gráfica 8C).



GRÁFICA 8. Comparación entre sexos de los MIAs totales. Del lado izquierdo se muestran las gráficas de MIAs totales (movimientos orolinguales + axiales + extremidad + giro) durante los 6 meses de tratamiento y a la izquierda se muestran las gráficas del análisis del Área Bajo la Curva (ABC) en la comparación de los animales machos, hembras intactas (c/ov) y ovariectomizadas (ovx) con 6-OHDA+L-DOPA (A), 6-OHDA+melatonina (B) y 6-OHDA+L-DOPA+melatonina (C). Nótese que las hembras ovx 6-OHDA+L-DOPA (6-OH+LD) desarrollaron MIAs a partir de los tres meses de tratamiento, asimismo presentan menor ABC en comparación con los machos y hembras c/ov con 6-OHDA+L-DOPA (A). Los animales que recibieron 6-OHDA+melatonina (6-OH+MEL; B) ó la co-administración de 6-OHDA+L-DOPA/melatonina (6-OH+LD/MEL; C) presentaron bajos niveles de MIAs y ABC, similares a los animales lesionados con 6-OHDA sin tratamiento. *6-OHDA+L-DOPA vs 6-OHDA sin tratamiento; @ hembras ovx vs machos y hembras c/ov $P < 0.05$.

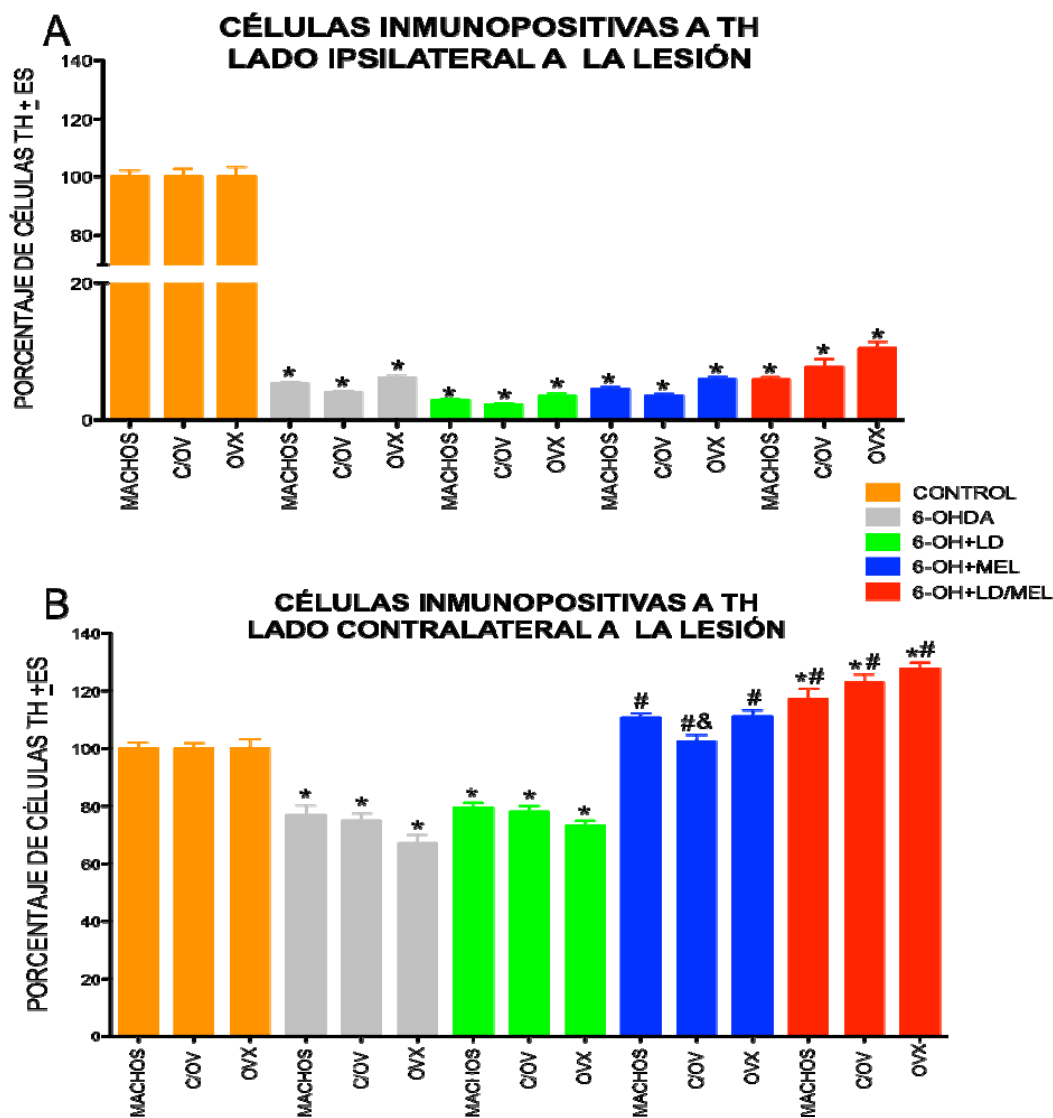
Células inmunopositivas a TH

La presencia de neuronas inmunopositivas a TH en la SNc nos da indicios de la conservación de las neuronas dopaminérgicas.

En nuestros resultados podemos observar que los animales machos, las hembras c/ov y las hembras ovx control presentaron valores similares en el número de células inmunopositivas a TH, tanto del lado ipsilateral como del contralateral a la lesión (gráficas 9A y B; figura 4) y no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

En la gráfica 9A se muestra la pérdida drástica de neuronas dopaminérgicas en la SNc del lado ipsilateral a la lesión, donde se observa que los machos, hembras c/ov y hembras ovx inyectados con 6-OHDA presentaron supervivencia de neuronas del 5.31%, 3.97% y 6.14% respectivamente, similar a los animales hembras c/ov y hembras ovx 6-OHDA+L-DOPA (2.8%, 2.2% y 3.46%) y 6-OHDA+melatonina (4.4%, 3.45% y 5.9%). Cabe señalar que los machos, hembras c/ov y hembras ovx que recibieron 6-OHDA+L-DOPA/melatonina presentaron mayor porcentaje de células del 5.9%, 7.67% y 10.46% respectivamente; sin embargo, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Con respecto al lado contralateral a la lesión, en la gráfica 9B se observa que los animales macho, hembras c/ov y hembras ovx con 6-OHDA así como todos los animales con 6-OHDA+L-DOPA presentaron disminución de aproximadamente 20% de pérdida neuronal, comparados con los grupos control; y no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos ni entre sexos. Los animales macho, hembras c/ov y hembras ovx con 6-OHDA+melatonina, presentaron mayor número de células similar a su grupo control, en comparación con los animales 6-OHDA y 6-OHDA+LDOPA no mostrando diferencias estadísticamente significativas entre sexos. Sorprendentemente los animales macho, hembra c/ov y hembra ovx con la co-administración de 6-OHDA+L-DOPA/melatonina presentaron mayor porcentaje de células inmunopositivas para TH (17.13%, 22.8% y 27.2%, respectivamente) con respecto a su grupo control, y no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sexos.



GRÁFICA 9. Porcentaje de células inmunopositivas a TH en la SNc ipsilateral (A) y contralateral (B) a la lesión, de los animales a los que se les administraron los distintos tratamientos. Observamos que todos los grupos experimentales presentaron disminución drástica de células en el lado ipsilateral a la lesión (A). En el lado contralateral a la lesión, todos los animales 6-OHDA y 6-OHDA+L-DOPA presentaron disminución de células, a diferencia de los animales 6-OHDA+melatonina que presentaron mayor cantidad de neuronas, no mostrando diferencias estadísticamente significativas con su grupo control. Es importante hacer notar que todos los animales que recibieron la co-administración 6-OHDA+L-DOPA/melatonina presentaron mayor porcentaje de células dopaminérgicas que su respectivo control. * Grupos experimentales vs control; # 6-OHDA+melatonina y la co-administración 6-OHDA+L-DOPA/melatonina vs Lesión con 6-OHDA y 6-OHDA+L-DOPA; & 6-OHDA+melatonina vs 6-OHDA+L-DOPA/Melatonina; P < 0.05.

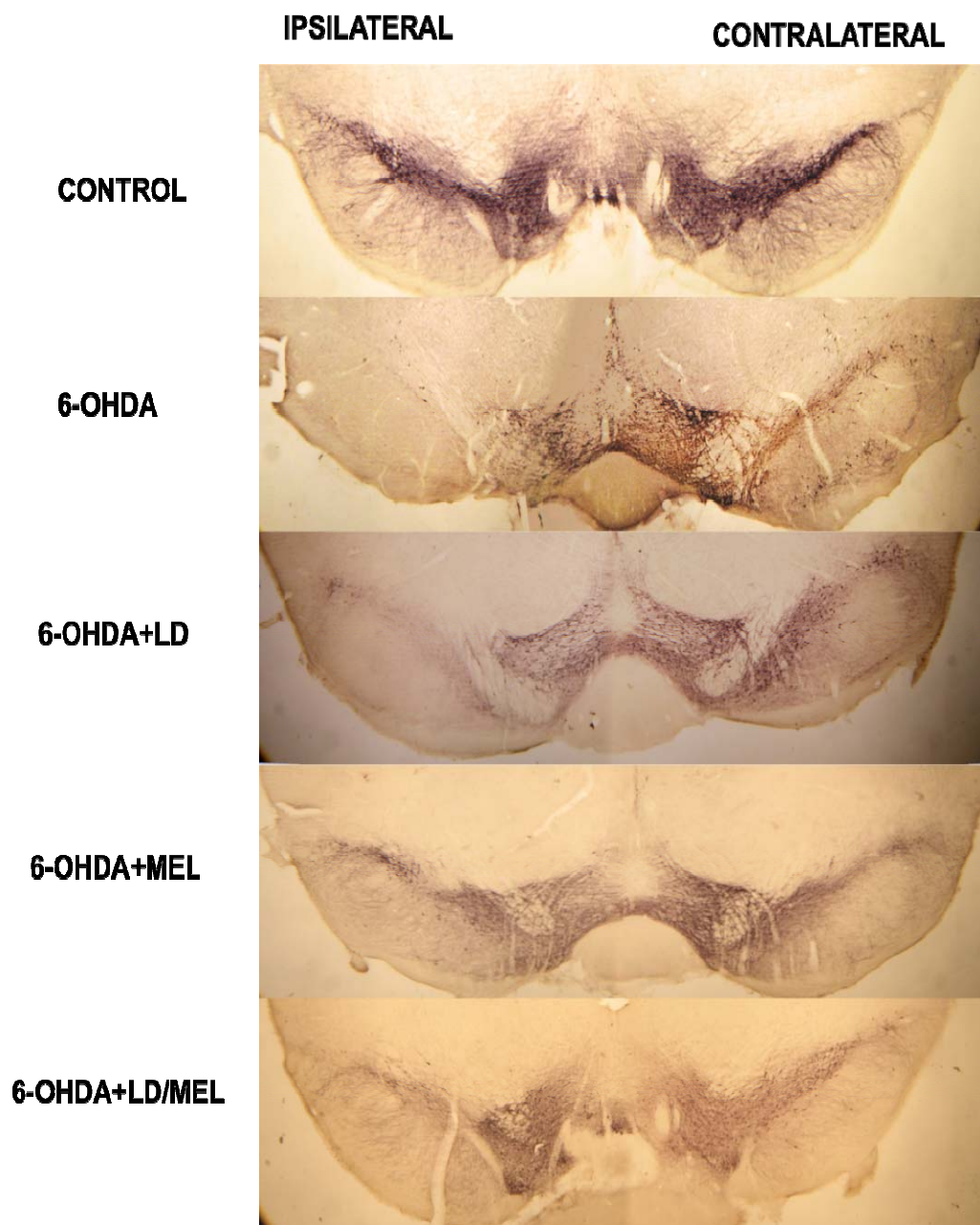


FIGURA 4. Cortes representativos a nivel del mesencéfalo donde se muestran las neuronas inmunopositivas a TH en la SNc de los diferentes grupos. Nótese que en el lado contralateral los animales que recibieron 6-OHDA+melatonina (6-OHDA+MEL) presentan valores similares a los animales control; sorprendentemente los animales que recibieron la co-administración de 6-OHDA+L-DOPA/melatonina (6-OHDA+MEL/LD) presentan mayor número de células en el lado contralateral a la lesión con respecto a los animales control (Magnificación 100X).

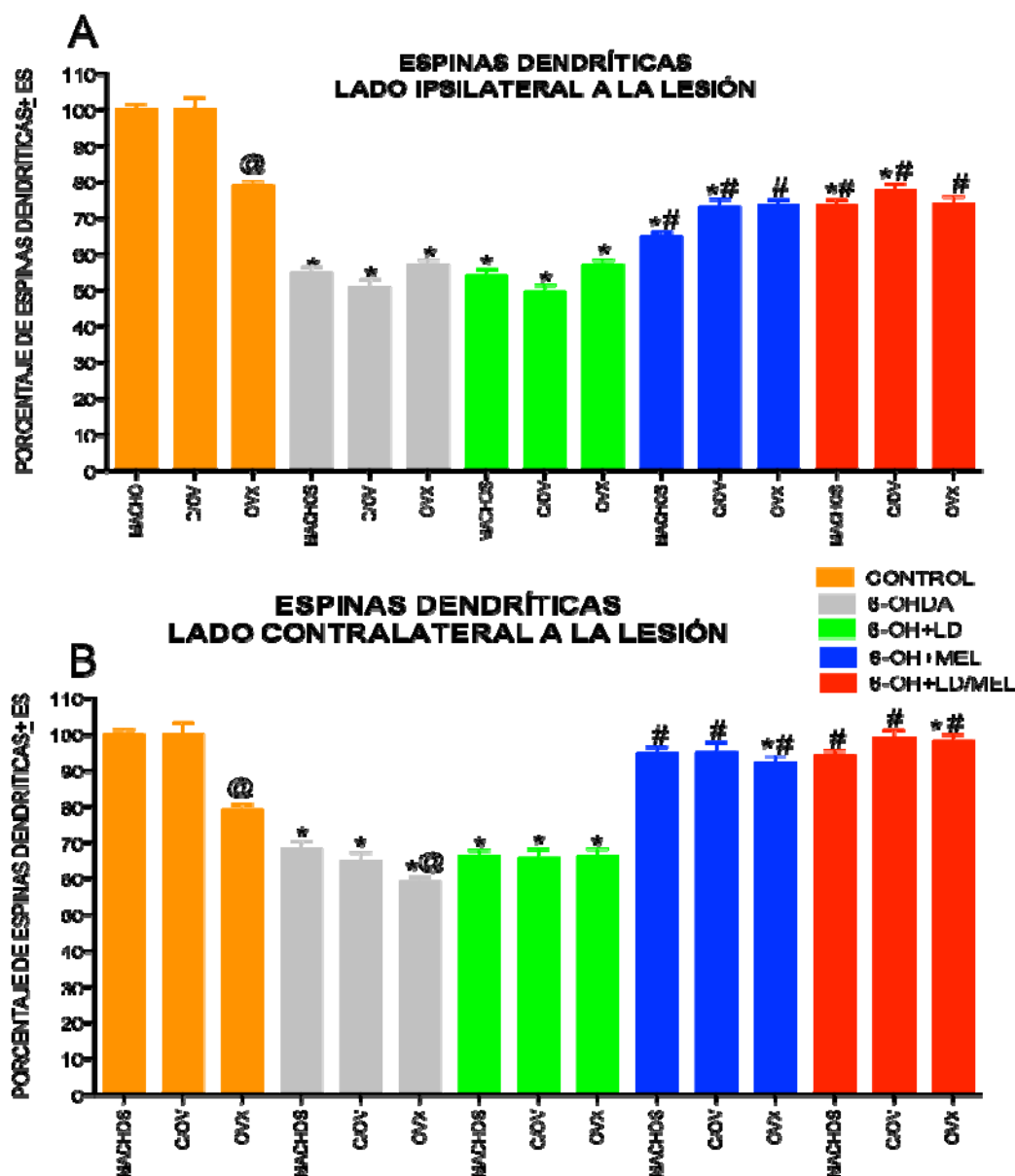
Espinas dendríticas

Al realizar el conteo de las espinas dendríticas observamos que los animales machos y las hembras c/ov control presentaron promedio de 8.02 ± 1.4 y 7.94 ± 3.23 respectivamente y en el lado ipsilateral a la lesión mostraron promedio de 8.15 ± 1.58 y 7.97 ± 3.47 respectivamente y no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, es importante mencionar que los valores del lado ipsilateral así como el lado contralateral a la lesión fueron tomados como 100%; las hembras ovx control mostraron disminución del 21.3% de espinas dendríticas del lado ipsilateral y 20.94% del lado contralateral a la lesión en comparación con los machos y hembras c/ov control (gráficas 10A y B), cabe mencionar que este grupo no presentó ningún tipo de alteraciones motoras en las pruebas evaluadas (gráfica 1C y 3C).

En el lado ipsilateral a la lesión los animales macho, hembras c/ov y hembras ovx con 6-OHDA sin tratamiento y los animales que recibieron 6-OHDA+L-DOPA presentaron pérdida drástica de espinas dendríticas, a diferencia de los animales que recibieron 6-OHDA+melatonina y la co-administración de 6-OHDA+L-DOPA/melatonina que mostraron mayor número de espinas dendríticas y no mostraron diferencias significativas entre grupos ni entre sexos (gráfica 10A y figura 5).

Con respecto al lado contralateral a la lesión, se observa que las ratas hembras ovx y lesionadas con 6-OHDA sin tratamiento presentaron mayor pérdida de espinas dendríticas en comparación con los machos y las hembras c/ov con 6-OHDA, mostrando diferencias estadísticamente significativas, es decir que los estrógenos ayudaron a proteger las espinas dendríticas. Todos los animales de los grupos tratados con 6-OHDA+L-DOPA mostraron pérdida de espinas dendríticas, mostrando valores similares a los animales exclusivamente lesionados con 6-OHDA sin tratamiento, no mostrando diferencias estadísticamente significativas entre grupos ni entre sexos. Interesantemente, las ratas macho y hembra c/ov con 6-OHDA+melatonina así como los animales machos y hembras c/ov con 6-OHDA+L-DOPA/melatonina presentaron valores similares en el número de espinas dendríticas al grupo control. Las hembras ovx con 6-OHDA+melatonina y hembras ovx 6-OHDA+L-DOPA/melatonina, presentaron mayor porcentaje de espinas dendríticas en comparación

con su grupo control, es decir, presentaron incremento en el número de espinas dendríticas similares a los animales macho y hembra c/ov control (gráfica 10 B).



Gráfica 10. Porcentaje de espinas dendríticas de las dendritas secundarias de las neuronas espinosas medianas del núcleo estriado del lado ipsilateral (A) y contralateral (B) a la lesión. Nótese que los animales que recibieron 6-OHDA+melatonina (6-OH+MEL) y la co-administración 6-OHDA+L-DOPA/melatonina (6-OH+LD/MEL) presentaron mayor número de espinas dendríticas tanto del lado ipsilateral y contralateral a la lesión en comparación con los animales con 6-OHDA y 6-OHDA+L-DOPA (6-OH+LD). * Grupos experimentales vs control; # 6-OHDA+melatonina y la co-administración 6-OHDA+L-DOPA/melatonina vs Lesión con 6-OHDA y 6-OHDA+L-DOPA; @ hembras ovx con 6-OHDA vs machos y hembras c/ov con 6-OHDA P< 0.05

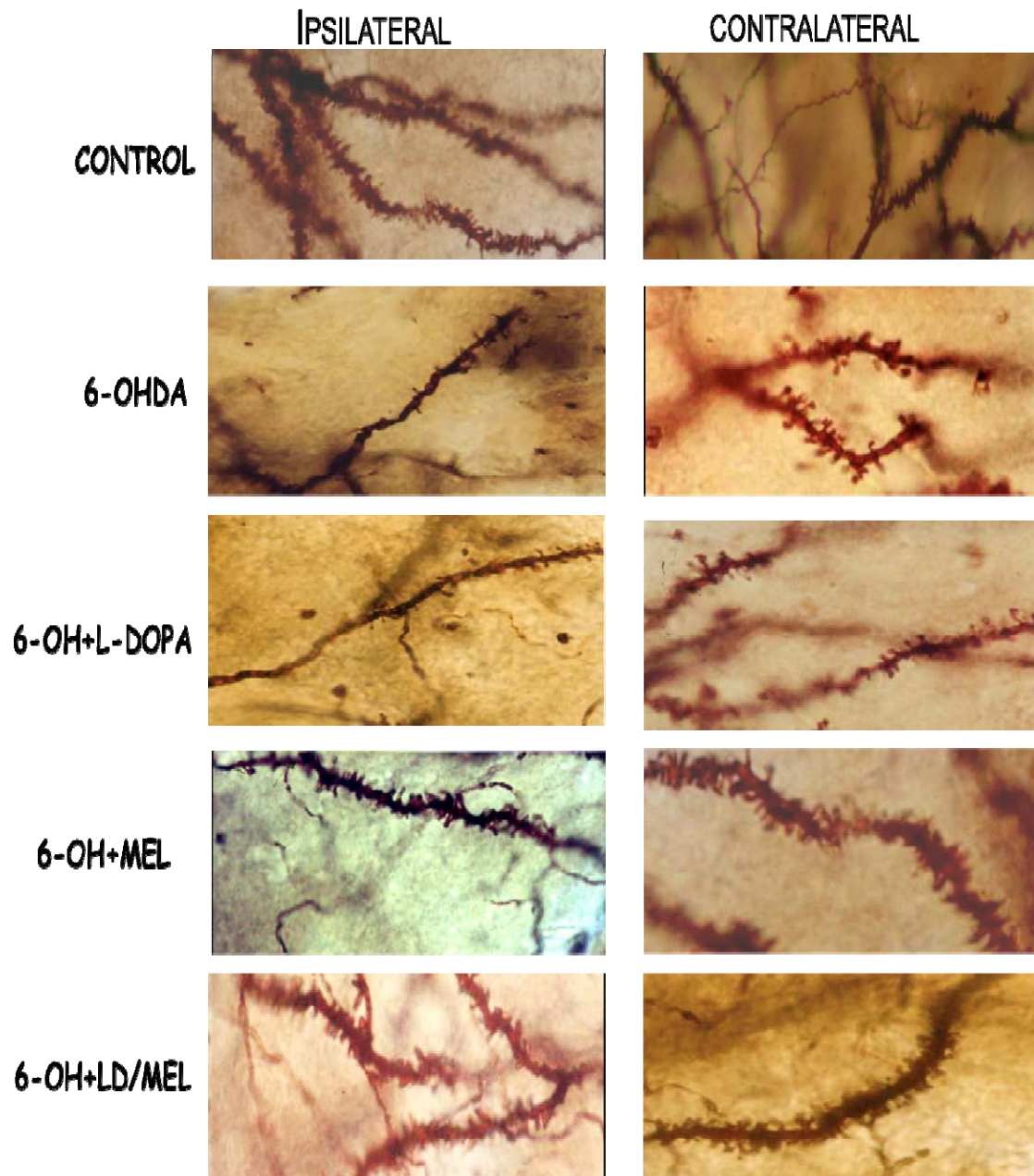


FIGURA 5. Fotomicrografías representativas con impregnación de Golgi de las espinas dendríticas de neuronas espinosas medianas del núcleo estriado ipsilateral y contralateral a la lesión. Nótese cómo con el tratamiento con 6-OHDA+melatonina y 6-OHDA+L-DOPA/melatonina (6-OHDA+LD/MEL) favorece a la conservación de la densidad de espinas dendríticas tanto del lado ipsilateral como contralateral a la lesión (Magnificación 1000x)

DISCUSIÓN

Prueba de la escalera

Se ha reportado que los pacientes con EP presentan poca destreza manual que empeora a medida que progresa la enfermedad, los pacientes presentan dificultades de ejecución de tareas que requieren movimientos secuenciales, por ejemplo, al realizar movimientos repetitivos de antebrazo, pronación y supinación, apertura y cierre de la mano y alcanzar objetos (Whishaw *et al.*, 2002). Los movimientos de las ratas en la prueba de la escalera son muy similares a los humanos, por lo que dicha prueba nos permite evaluar la deficiencia de DA así como la eficacia de los tratamiento (Montoya *et al.*, 1991; Whishaw *et al.*, 2002). Los movimientos de las ratas en la prueba de la escalera al utilizar las patas delanteras para llevar un pellet a la boca y comerlo resulta ser una actividad compleja y anómala para los animales con lesión unilateral con 6-OHDA, y es considerada análoga a la habilidad de realizar esta tarea en pacientes con EP (Barnéoud *et al.*, 1995; Whishaw *et al.*, 2002; Henderson *et al.*, 2003; Dowd y Dunnett, 2005). Esta prueba permite evaluar la disminución de DA (Barnéoud *et al.*, 1995; Brizard *et al.*, 2006), así como el potencial de los tratamientos para mejorar el desempeño motor, es decir esta prueba es particularmente sensible para detectar lesiones en el sistema nigro-estriatal (Whishaw *et al.*, 1986; Barnéoud *et al.*, 1995).

De acuerdo con nuestros resultados, todos los animales que recibieron la inyección en el haz medial con 6-OHDA mostraron daño motor severo que afectó principalmente el lado contralateral a la lesión, manifestado por la disminución drástica del número de pellets comidos (gráfica 1A, B y C), lo cual concuerda con lo reportado por otros autores (Barnéoud *et al.*, 1995; Klein *et al.*, 2007), la ejecución de esta actividad fue anómala y a pesar de que a veces podían obtener el alimento exitosamente, los movimientos de supinación y pronación fueron limitados en comparación con los animales control. Asimismo las ratas se valieron de estrategias compensatorias como aumentar la presión de los dígitos, inclinación de la cabeza y frecuentemente utilizaban la lengua y los dientes para lograr comer el pellet (Whishaw *et al.*, 1997; 2002). Al respecto se sabe que la pérdida del desempeño motor en la prueba de la escalera depende del nivel de integridad del sistema dopaminérgico nigro-estriatal (Barnéoud *et al.*, 1995; Brizard *et al.*, 2006; Cordeiro *et al.*, 2010). Asimismo varios autores han reportado que los animales con esta deficiencia motora presentan pérdida

drástica de las neuronas inmunopositivas a TH en la SNc así como de fibras en el núcleo estriado (Barnéoud *et al.*, 1995; Galvan 2000; Kloth *et al.*, 2006).

L-DOPA

Como muestran nuestros resultados todos los animales con 6-OHDA+L-DOPA presentaron recuperación de la conducta desde los primeros días hasta los 21-28 días de tratamiento, posteriormente presentaron alteraciones motoras (gráfica 1A, B y C). Así, nuestros resultados concuerdan con estudios previos en donde se ha observado que en modelos animales de la EP la duración del beneficio terapéutico de la L-DOPA en roedores es de aproximadamente 3 semanas (Metman *et al.*, 2000; Gutiérrez-Valdez, 2007; Gutiérrez-Valdez *et al.*, 2012a; 2012b).

Al respecto también se ha reportado que pacientes con EP que son medicados con L-DOPA mejoran la respuesta en pruebas de velocidad en la toma de objetos sobre una superficie, presentan mayor coordinación y mejoran el movimiento inicial (Castiello *et al.*, 2000; Bastian *et al.*, 2003). Sin embargo, cuando el tratamiento con L-DOPA es administrado crónicamente (6-13 meses), los pacientes no mejoran los movimientos y muestran alteración en la flexión del codo, en la supinación, pronación, además presentan bradicinesia (Melvin *et al.*, 2005). Asimismo en animales lesionados con 6-OHDA y tratados crónicamente con L-DOPA no mejoraron la coordinación motora ni los aspectos cualitativos de dichos movimientos (movimientos de pronación y supinación; Metz *et al.*, 2001). Por lo que se sugiere que, después de un tiempo, el tratamiento con L-DOPA no es eficaz (Castiello *et al.*, 2000; Metz *et al.*, 2001; Bastian *et al.*, 2003; Benice *et al.*, 2007; Sacrey *et al.*, 2011).

En nuestros resultados también observamos que los animales con 6-OHDA+L-DOPA cuando utilizaban la extremidad delantera contralateral a la lesión, la movían poco y tendía a quedarse flexionada los cuales son signos claros de hipocinesia y rigidez. Es importante señalar que con el tratamiento crónico con L-DOPA los animales manifestaron principalmente discinecias de tipo orolinguales, axiales y de extremidad en el momento en que fueron evaluados en la prueba de la escalera, por consiguiente se les dificultó aún más la actividad para tomar el pellet de los escalones para comerlo, correspondiendo con los resultados de Winkler y cols. (2002). Además, es de considerarse que la motivación que

lleva al animal a tomar los trozos de comida es la restricción del alimento (Montoya *et al.*, 1991), generando un estado de ansiedad y promoviendo la realización de movimientos rápidos y poco precisos de las extremidades delanteras, lo que también dificulta la realización de la prueba (Smith y Metz, 2005).

Melatonina

Como se describe en nuestros resultados, todos los animales tratados con 6-OHDA+melatonina presentaron un comportamiento inicial similar a los animales con 6-OHDA sin tratamiento, posteriormente a los 21 días aproximadamente los animales presentaron mejoría gradual en el uso de las extremidades delanteras (Gráficas 1A,B y C).

En un estudio realizado por Singh y *cols.* (2006), muestran que a los 35 días de tratamiento con melatonina en animales lesionados con 6-OHDA, presentan mejoría en la postura, el tiempo de inicio de movimiento y la habilidad para tomar los pellets en la prueba de la escalera de la extremidad contralateral a la lesión, coincidiendo con nuestros datos ya que nosotros encontramos mejoría en los animales entre los días 28 y 42. Los autores proponen que el efecto neuroprotector de la melatonina es por su capacidad de estimular enzimas antioxidantes como la SOD y GSH-Px, las cuales actúan sobre los radicales libres formados a partir de la 6-OHDA, además de que estas enzimas se encuentran disminuidas en el cerebro de los animales depletados de DA (Kummar *et al.*, 1995; Tomás-Zapico y Coto-Montes, 2005).

Estudios previos muestran que el tratamiento con melatonina a corto plazo no ejerce efecto neuroprotector en animales depletados de DA (Itzhak *et al.*, 1998; Capitelli *et al.*, 2008; Naskar *et al.*, 2013), debido probablemente a que los niveles de esta neurohormona son bajos en el cerebro (Capitelli *et al.*, 2008); en este sentido se sugiere que el nivel de melatonina tiene que ser alto y continuamente mantenido por largo tiempo en el cerebro para así garantizar su efecto neuroprotector (Morgan y Nelsonb, 2001; Rennie *et al.*, 2007; Capitelli *et al.*, 2008).

L-DOPA/melatonina

Sorprendentemente, como se muestra en nuestros resultados, todos los animales tratados con la co-administración de 6-OHDA+L-DOPA/melatonina presentaron mejoría en su desempeño motor en la prueba de la escalera desde el inicio del tratamiento, perdurando este efecto hasta el final del experimento (Gráficas 1 A, B y C), asimismo observamos que estos animales mejoraron los movimientos de contracción y proyección de los dígitos, la pronación y supinación, en comparación con los otros grupos.

El efecto neuroprotector que observamos, probablemente sea debido a la característica de la melatonina de actuar como antioxidante, evitando la auto-oxidación de la L-DOPA y la consecuente formación de L-DOPA-SQ, restaurando así los niveles de L-DOPA y aumentando la biodisponibilidad de la DA en el NE (Maharaj *et al.*, 2005; Rocchitta *et al.*, 2006; Borah y Mohanakumar, 2009a).

Prueba de la viga

La prueba de la viga de equilibrio nos permitió evaluar movimientos estereotipados espontáneos, la coordinación y alteraciones motoras características de la EP en un modelo animal (Jinnah y Hess, 2004). Dicha prueba consiste en analizar la habilidad de los animales para desplazarse sobre la viga ascendente sin caer (Allbutt y Henderson, 2007). El dispositivo que utilizamos implicó mayor dificultad para su ejecución por el grosor 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.

En humanos el deterioro clínico del equilibrio aparece cuando la pérdida de neuronas dopaminérgicas es >70% (Martinez-Martin, 2004). Bracha y cols. (1987) reportan que los pacientes parkinsonianos, cuando fueron evaluados en una prueba ambulatoria presentaron asimetría rotatoria hacia el hemisferio que contiene menor actividad dopaminérgica, decremento la iniciación del movimiento (acinesia), el caminar fue lento y presentaron alteraciones posturales, por lo que se propone que dichas alteraciones pueden ser similares en ratas hemiparkinsonianas, lo cual puede contribuir al déficit motor observado en la prueba de la viga (Warraich *et al.*, 2009).

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, donde se observa que en ratas lesionadas unilateralmente, en el haz medial con 6-OHDA, el tiempo de recorrido en la viga es incrementado drásticamente con respecto al grupo control (gráfica 3A, B y C) (Truong *et al.*, 2006; Strome *et al.*, 2006; Allbutt y Henderson, 2007; Avila-Costa *et al.*, 2007; Gutiérrez-Valdez, 2007; Gutiérrez-Valdez *et al.*, 2012a; 2012b). Los animales presentaron rigidez y lentitud en sus movimientos, algunas ratas recorrían la viga pero se detenían y luego reiniciaban el recorrido o simplemente se quedaban inmóviles sobre la viga, lo cual podría ser considerado como acinesia y bradicinesia (Truong *et al.*, 2006; Allbutt y Henderson, 2007; Madete *et al.*, 2010).

Más aún, observamos que los animales presentaron disminución en la capacidad para usar las extremidades contralaterales a la lesión, tanto para realizar ajustes posturales, como para mantener el balance para desplazarse sobre la viga, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por varios autores, donde muestran que la principal característica de los animales depletados unilateralmente de DA es la disfunción de las extremidades contralaterales, por lo cual los animales no pueden equilibrar el peso de su cuerpo y lograr un ajuste postural óptimo para mantenerse en equilibrio en una superficie estrecha, proponiendo que funcionalmente el lado no lesionado no compensa adecuadamente el déficit motor cuando la lesión es tan extensa (Miklyaeva *et al.*, 1995; Warraich *et al.*, 2009; Lezcano *et al.*, 2009; 2010; Madete *et al.*, 2011).

L-DOPA

Los datos obtenidos de los animales tratados con 6-OHDA+L-DOPA concuerdan con los datos previamente reportados en nuestro laboratorio, en donde las ratas que recibieron la inyección de 6-OHDA en el haz medial y fueron tratadas con L-DOPA muestran recuperación de la actividad motora en los primeros días de tratamiento, pero a partir de los 28 días incrementaron drásticamente el tiempo de recorrido sobre las vigas (Gutiérrez-Valdez, 2007; Gutiérrez-Valdez *et al.*, 2012a). Los estudios en pacientes con EP tratados con L-DOPA han mostrado aumento significativo en la velocidad de la marcha y la longitud de la zancada (Blin *et al.*, 1991; Ferrandez y Blin, 1991; O'Sullivan *et al.*, 1998).

En nuestro estudio observamos que los animales interrumpían frecuentemente su ascenso y resbalaban debido a la poca fuerza de sujeción de los dígitos producida por la lesión, misma que no es revertida por el tratamiento con L-DOPA, lo cual concuerda con lo reportado por Melvin y cols. (2005). La degeneración de la SNc producida por la inyección con 6-OHDA en el haz medial disminuye considerablemente el tiempo de beneficio terapéutico de la L-DOPA (Winkler *et al.*, 2002) probablemente debido a que este fármaco produce estrés oxidativo y por consiguiente incrementa la neurodegeneración de las células dopaminérgicas remanentes (Jenner, 1995; Wolters *et al.*, 1995).

Además, cuando los animales intentaban recorrer la viga se detenían debido a que presentaba MIAs de tipo axial y de extremidad, inclusive, en una ocasión un animal presentó giro contralateral (en la viga de 12mm), por lo que tuvo que ser retirado de la viga para evitar su caída. Johnson y cols. (1996) reportan que dos pacientes con discinesias clínicamente evidentes, presentaron disminución en la velocidad y aumento significativo en la torpeza al caminar, los autores proponen que la alteración en la coordinación motora se incrementa en etapas avanzadas de la enfermedad y que podría complicarse aún mas por las discinesias inducidas por el tratamiento crónico con L-DOPA.

Melatonina

Los animales que recibieron el tratamiento con 6-OHDA+melatonina, a partir de los 42 días de tratamiento presentaron recuperación gradual de la actividad motora, lo que sugiere que de alguna manera la melatonina contribuyó a la recuperación de la coordinación del movimiento de las extremidades ipsi y contralateral a la lesión (Gutiérrez-Valdez, 2007; Gutiérrez-Valdez *et al.*, 2012a; 2012b), por ello, probablemente los animales lograron realizar ajustes posturales óptimos para mantener el balance y desplazarse sobre las vigas y presentar tiempos similares al grupo de animales control.

Patki y Lau (2011) realizaron un estudio en animales depletados de DA, los cuales fueron continuamente tratados con melatonina durante 18 semanas, al evaluar a los animales en la prueba de la viga observaron mejoría en la coordinación motora en comparación con los animales que no recibieron el tratamiento; además el tratamiento crónico con melatonina incrementó los niveles de DA en el núcleo estriado, de tal manera que los autores concluyen

que el tratamiento con melatonina a largo plazo tiene un potencial neuroprotector para preservar la función dopaminérgica nigroestriatal. Debido probablemente a que durante el tiempo de tratamiento se mantuvieron los niveles altos y constantes de melatonina en el cerebro (Rennie *et al.*, 2008)

L-DOPA/melatonina

Los animales que recibieron la co-administración crónica de 6-OHDA+L-DOPA/melatonina presentaron recuperación de la coordinación motora, los animales subían alternando las extremidades ipsi y contralateral a la lesión lo que hacía más fluido y más rápido el desplazamiento sobre las vigas, de tal manera que presentaron tiempos de recorrido similares a los animales del grupo control durante todo el experimento (gráficas 3 y 4). A este respecto, estudios recientes muestran que la melatonina administrada junto con la L-DOPA en ratones, revierte la acinesia y la catalepsia inducida por la neurotoxina MPTP, por medio de restablecer el número de espinas dendríticas en las neuronas espinosas medianas y atenuar la pérdida de DA en el NE. Proponiendo que la melatonina podría ser un adyuvante ideal para la terapia de L-DOPA en la EP (Naskar *et al.*, 2013). En este sentido, nuestros datos también mostraron que los animales que recibieron tratamiento con 6-OHDA+L-DOPA/melatonina presentaron conservación de las espinas dendríticas e incremento en las neuronas dopaminérgicas del lado contralateral a la lesión, por lo que es factible pensar que se favorezcan las conexiones nigroestriatales permitiendo que los animales logran realizar ajustes óptimos en sus movimientos para mantener el balance y desplazarse sobre las vigas.

Movimientos Involuntarios Anormales

Como se muestra en las gráficas 7 A, B y C, los animales depletados de DA que no recibieron tratamiento presentaron puntajes bajos de MIAs en comparación con los que recibieron tratamiento con L-DOPA, lo cual concuerda con los resultados de otros autores (Putterman *et al.*, 2007; Winkler *et al.*, 2002), asimismo los animales que recibieron el tratamiento con melatonina presentaron comportamiento similar, corroborando estos datos con los previamente reportados por nuestro grupo (Gutiérrez-Valdez *et al.*, 2012a). Estos grupos de animales se caracterizaron principalmente por presentar MIAs en la extremidad

contralateral a la lesión y de tipo orolinguales (considerado como temblor en reposo; Winkler *et al.*, 2002; Torres-Esquivel, 2012). Estudios previos proponen que los MIAs en ratas, en términos de severidad y distribución topográfica están condicionados por la denervación dopaminérgica del NE (Winkler *et al.*, 2002) esto puede explicarse por la organización somatotópica de esta estructura. Un aspecto importante es que el estriado dorsolateral controla los movimientos de la mandíbula y los movimientos de extremidad. La función anormal de dicha región está correlacionada con la presencia de MIAs orolinguales y de extremidad (Andersson *et al.*, 1999). Boulet y cols. (2006) muestran que la estimulación del NST (Núcleo subtalámico) en ratas hemiparkinsonicas induce los 4 subtipos de MIAs, dependiendo de los parámetros de estimulación e intensidad, mostrando que el umbral para que se presenten los movimientos orolinguales es menor que el que se requiere para producir los demás subtipos. Es posible que esta actividad se deba a la sobreexcitación del NST, que al estimular los núcleos de salida promuevan la sobre-inhibición en el tálamo y la corteza, lo que produciría el temblor (Truong *et al.*, 2006).

L-DOPA

Los animales que recibieron el tratamiento crónico con L-DOPA presentaron incremento drástico de los DIL (gráficas 7A, B y C). Existen estudios que demuestran que la respuesta a la L-DOPA cambia con la progresión de la enfermedad. Mouradian y cols., (1989) demostraron que una dosis mínima de L-DOPA produce discinesias en pacientes con EP en etapas avanzadas, en comparación con los pacientes en etapas iniciales, sugiriendo que la ventana terapéutica de la L-DOPA se pierde en etapas avanzadas de la enfermedad, además disminuye la capacidad del cerebro para aprovechar la L-DOPA, que la enzima descarboxilasa la convierta a DA, se almacene en las vesículas y gradualmente se libere. Es decir, con la pérdida de las neuronas dopaminérgicas nigroestriales se pierde el control presináptico de la liberación de DA y su recaptura, dando lugar a fluctuaciones en los niveles extracelulares de DA (Metman *et al.*, 2000; Cenci y Lundblad, 2006); estas fluctuaciones están estrechamente relacionadas con el desarrollo de los LID (Chase, 1998). Asimismo, el tratamiento con L-DOPA desencadena los LID por medio de vías de señalización en las neuronas estriato-nigrales, probablemente por estimulación de los receptores D1 y D2 (Svenningsson *et al.*, 2000).

En nuestro estudio los animales que recibieron 6-OHDA+L-DOPA presentaron movimientos discinéticos que afectaron el lado contralateral del cuerpo, como es extensamente reportado por varios autores (Cenci *et al.*, 1998; 2002; Winkler *et al.*, 2002); entre 10-20 minutos después de la administración de la L-DOPA, los animales desarrollaron los DIL que implican los músculos orolinguales, la extremidad delantera, axiales así como locomoción o giro, que son comportamientos típicos de discinecias en este modelo animal de la EP (Cenci *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 2002; Cenci y Lundblad, 2007; Ulusoy *et al.*, 2010; Lane y Dunnet, 2010) y que es homólogo a los DIL observados en los pacientes (Lundblad *et al.*, 2002; Marin *et al.*, 2009). Algunos estudios proponen que los DIL pueden estar relacionadas por el nivel de depleción dopaminérgica estriatal y por la dosis de L-DOPA (Thiele *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2012); en este sentido Putterman y cols. (2007) mostraron que la administración de 3 mg/kg de L-DOPA a ratas hemiparkinsonicas causa incremento significativo de discinecias de extremidad de tipo orolinguales, mientras que la dosis de 4 mg/kg produce discinecias axiales y giro contralateral, concluyendo que la expresión de un subtipo u otro de LID podría estar relacionado con la dosis de L-DOPA; considerando que nosotros usamos la dosis utilizada en la clínica de 7.5 mg/kg (Picconi *et al.*, 2003; Lindgren *et al.*, 2007) los animales presentaron incremento significativo de los 4 subtipos de los DIL.

También se propone que la estimulación repetida de los receptores D1 por la L-DOPA en ratas lesionadas con 6-OHDA lleva al incremento progresivo en la expresión de los receptores D3 en las neuronas espinosas medianas de la vía directa, lo cual sensibiliza la conducta de giro producida por la administración de la L-DOPA (Bordet *et al.*, 1997; Bordet *et al.*, 2000).

Las DIL de extremidad se asemejan a una clase de movimiento coreiforme, se propone que las discinecias de este tipo generalmente involucran la sobreactividad de la vía directa, mientras que las discinesias caracterizadas por distonías han sido tentativamente atribuidas a la vía indirecta (Bezard *et al.*, 2001).

Por otro lado, existen evidencias de que la depleción dopaminérgica puede generar cambios en las neuronas postsinápticas, las cuales involucran modificaciones en la morfología y pérdida de espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas, lo cual traería como

consecuencia la disminución de conexiones sinápticas (Deutch, 2006; Ulusoy *et al.*, 2010), asimismo, al perderse la modulación dopaminérgica en el estriado, se promovería el incremento en los niveles extracelulares de glutamato provenientes de la corteza (Cepeda y Levine, 1998; Meshul *et al.*, 1999; Deutch, 2006). En este contexto se propone que el tratamiento crónico con L-DOPA exógena produce la estimulación de los receptores dopaminérgicos en las neuronas espinosas medianas del estriado (Chase, 1998; Rylander *et al.*, 2009), produciendo cambios en el patrón de fosforilación de las subunidades de los receptores NMDA y AMPA, haciendo más sensibles a las aferencias glutamatérgicas córtico-estriatales (Cepeda *et al.*, 1993; Thiele *et al.*, 2011), esta adaptación de excitabilidad en paralelo con la pérdida de conectividad producida por la falta de espinas dendríticas se relaciona con el desarrollo de los DIL (Soderstrom *et al.*, 2010; Ulusoy *et al.*, 2010).

Las discinecias inducidas por la L-DOPA pueden ser vistas como una adaptación a largo plazo por la depleción de DA y la estimulación no fisiológica de receptores dopaminérgicos, dando lugar a alteraciones posteriores en la expresión de genes y proteínas en las neuronas espinosas medianas (Chase, 1998; Cenci *et al.*, 2009), por ejemplo incremento en la expresión de Fos-B/ Δ fos-B (Familia de proteínas Fos-B) y el RNAm de prodinorfninas en el núcleo estriado (Andersson *et al.*, 1999; Valastro *et al.*, 2009; Francardo *et al.*, 2011), lo que sugiere que los factores de transcripción pueden favorecer la expresión y la severidad de las discinecias (Berton *et al.*, 2009; Pavon *et al.*, 2010).

En resumen podemos decir que tanto los componentes presinápticos (producción, almacenamiento, liberación contralada y recaptura de DA por las neuronas dopaminérgicas) y postsinápticos (receptores, segundos mensajeros, vías de señalización de las neuronas del núcleo estriado) son críticos en la inducción y mantenimiento de las discinecias (Ulusoy *et al.*, 2010).

L-DOPA/melatonina

Los animales que recibieron el tratamiento con 6-OHDA+L-DOPA/melatonina presentaron bajos puntajes de MIAs en comparación con los que recibieron exclusivamente L-DOPA (gráficas 7A, B y C), mostrando que de alguna manera la melatonina tiene cierta influencia sobre los DIL. Es importante destacar que hasta el momento no hay estudios sobre el

efecto de la co-administración de la L-DOPA/melatonina en los MIAs en la EP. Pero varios autores proponen que la melatonina puede tener un efecto benéfico sobre los LID debido a sus propiedades antioxidantes (Maharaj *et al.*, 2005; Srinivasan *et al.*, 2005) y su capacidad de estimular las enzimas antioxidantes (Mayo *et al.*, 2002). Rocchitta y cols. (2006), reportan que la co-administración de la L-DOPA/melatonina inhibe la auto-oxidación de la L-DOPA y la consiguiente formación de L-DOPA-SQ, aumentando así la biodisponibilidad de la DA en el NE, por lo que la melatonina parece ser el fármaco antioxidante más adecuado para ser utilizado como coadyuvante con la L-DOPA con el propósito de evitar la auto-oxidación no enzimática de la L-DOPA y la DA. De acuerdo a estos estudios es factible pensar que con la co-administración de L-DOPA/melatonina se evitan las fluctuaciones en las concentraciones de DA, disminuyendo así los DIL

Estudios recientes muestran que el prevenir la pérdida de espinas dendríticas con Isradipina (antagonista de canales de calcio) en animales lesionados con 6-OHDA y tratados con 6 mg/kg de L-DOPA, se reducen significativamente los DIL en comparación con los que recibieron exclusivamente L-DOPA (Schuster *et al.*, 2009). En nuestro estudio los animales que recibieron el tratamiento con L-DOPA/melatonina se previno la pérdida de espinas dendríticas en las neuronas espinosas medianas del NE (gráficas 8 A y B), por lo que es factible pensar que en el núcleo estriado se lleva a cabo la apropiada integración de información, lo que resulta en la eficacia del desempeño motor y la prevención de los MIAs. Asimismo Aguiar y cols. 2002 reportan que animales lesionados con 6-OHDA y tratados con melatonina disminuyeron la conducta de giro inducida por apomorfina, proponiendo que la melatonina restaura los contenidos de DA y con ello se disminuye la supersensibilidad de los receptores dopaminérgicos.

Otro posible mecanismo por el cual el tratamiento con L-DOPA/melatonina podría disminuir la severidad de los LID, está relacionado con la capacidad antioxidante de la melatonina. Estudios recientes proponen que el ON^{*} producido por la autooxidación de la L-DOPA está asociado con los LID, resultando en alteraciones de algunas moléculas de señalización, incluyendo Δ FosB, fosfo-DARPP32 y fosfo-Glu-R1 (subunidades del receptor AMPA) en el NE (Takuma *et al.*, 2012). En este sentido se han utilizado inhibidores del NOS (Oxido Nitrico Sintasa) en animales lesionados con 6-OHDA y tratados con L-DOPA, resultando en la

disminución evidente de los LID (Padovan-Neto *et al.*, 2009; Takuma *et al.*, 2012; Del-Bel *et al.*, 2013) y de las moléculas Δ FosB (Padovan-Neto *et al.*, 2011), fosfo-DARPP32 y fosfo-GluR1 (Takuma *et al.*, 2012). En este contexto es factible pensar que con el tratamiento con L-DOPA/melatonina, la melatonina neutralice la NOS (Pozo *et al.*, 1997; Petri *et al.*, 2011) y el ON^{*} (Reiter, 2000a; Reiter *et al.*, 2000b; Reiter *et al.*, 2003), de esta manera probablemente la co-administración de L-DOPA/melatonina pudiera modular las moléculas de señalización y con ello la severidad de los LID.

Células inmunopositivas a TH

Como era de esperarse, la inyección con 6-OHDA en el haz medial disminuyó drásticamente el número de neuronas inmunopositivas a TH en la SNC, coincidiendo con trabajos previos en pacientes (Damier *et al.*, 1999) y en modelos con 6-OHDA (Ungerstedt, 1968; Björklund *et al.*, 1980, Allbutt y Henderson, 2007; Dowd y Dunnett, 2005; Smith *et al.*, 2012; Hernández-Baltazar *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2014). Por lo que se sugiere que es un modelo válido, que simula las etapas avanzadas en la EP, donde los animales presentan daño motor (Deumens *et al.*, 2002). El mecanismo molecular preciso de la citotoxicidad de la 6-OHDA permanece todavía en discusión. Se han propuesto varias hipótesis, una de ellas se relaciona con la formación de radicales libres por reacciones de autooxidación de la 6-OHDA formando radicales OH^{*}, además de que disminuye la actividad del complejo I (NADH—ubiquinona-reductasa) y IV (citocromo c oxidasa) con la consecuente disminución de ATP y muerte celular (Glinka *et al.*, 1998), lo cual también se ha reportado en estudios *post-mortem* de pacientes con EP (Hansruedi, 2009). Además, el daño mitocondrial puede resultar en la liberación del citocromo C y activar la caspasa 3, sugiriendo que la vía apoptótica intrínseca está implicada en la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Jordán *et al.*, 2003; Hernández-Baltazar *et al.*, 2013; Stott y Barker, 2014).

L-DOPA

Como se puede observar en la gráfica 9, los animales que recibieron L-DOPA presentaron pérdida drástica de células inmunopositivas a TH tanto del lado ipsilateral como del contralateral a la lesión, similar a los animales lesionados con 6-OHDA sin tratamiento, aspecto reportado también por Smith *et al.*, (2012) y por nuestro grupo (Gutiérrez-Valdez, 2007). Al respecto se han realizado estudios en líneas celulares catecolaminérgicas (PC12)

donde demuestran que al adicionar L-DOPA al medio de cultivo resulta en la disminución de la viabilidad celular de manera dosis dependiente, daño al DNA, disminución en la longitud de las neuritas y distintas señales de estrés oxidativo (Sabens *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2011). Estudios *in vitro* e *in vivo* muestran que el tratamiento con L-DOPA disminuye las células inmunopositivas a TH, estos resultados sugieren que la L-DOPA induce muerte celular principalmente debido a la generación de ROS (Mytilineou *et al.*, 1993; Walkinshaw y Waters 1995; Pardo *et al.*, 1995a y 1995b; Ferrario *et al.*, 2003; Jeon *et al.*, 2007) lo cual puede incrementar el estrés oxidativo en la vía nigro-estriatal (Jenner, 1995; Walkinshaw y Waters, 1995; Wolters *et al.*, 1995). Asimismo, estudios previos en nuestro laboratorio mostraron que animales hemiparkinsonianos tratados con L-DOPA presentaron incremento en los niveles de peroxidación de lípidos, lo cual es una característica del estrés oxidativo (Gutiérrez-Valdez, 2007).

Además, existen evidencias que indican que el tratamiento con L-DOPA inhibe la actividad del complejo I y IV de la cadena de transportadores de electrones (Przedborski *et al.*, 1993; Pardo *et al.*, 1995a). El daño a la mitocondria puede liberar el citocromo c y activar la vía apoptótica (Jin *et al.*, 2010).

Melatonina

El tratamiento con melatonina favoreció la conservación de las neuronas dopaminérgicas en la SNc del lado contralateral a la lesión en comparación con los que no recibieron tratamiento (Gráfica 9B), lo cual concuerda con estudios previos (Gutiérrez-Valdez 2007; Ma *et al.*, 2009; Patki y Lau, 2011; Gutiérrez-Valdez *et al.*, 2012a). Se propone que la protección dada por la melatonina puede ser por la acción directa como antioxidante (Gutiérrez-Valdez 2007; Reiter *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2009) o indirectamente, estimulando enzimas antioxidantes como el glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GRd) y superóxido dismutasa (SOD) (Reiter *et al.*, 2003; Hardeland *et al.*, 2006; Bonnefont-Rousselot y Collin, 2010).

Como se mencionó la 6-OHDA inhibe el complejo I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial y la generación de ATP. En este sentido se ha demostrado que la melatonina incrementa la actividad mitocondrial en la cadena respiratoria en los complejos I y IV (León

et al., 2005; Reiter *et al.*, 2008) y mantiene los niveles normales de ATP (Patki y Lau, 2011) además incrementa la expresión del DNAm^t que codifica el polipéptido de la subunidad I, II, y III del complejo IV (León *et al.*, 2005). También se sugiere que la melatonina tiene la capacidad de donar y aceptar electrones, de este modo incrementa el flujo de electrones, el cual es un efecto que no se ha observado con ningún otro antioxidante (León *et al.*, 2004). Más aún la melatonina previene la apoptosis inducida por la 6-OHDA (Mayo *et al.*, 1998a; 1998b). De acuerdo a esto, es factible pensar que probablemente la melatonina ayude a las células dopaminérgicas a ser más resistentes a los efectos perjudiciales producidos por la 6-OHDA.

Además de la acción antioxidante, otra posible explicación para el efecto neuroprotector de la melatonina es la capacidad de regular el GDNF (factor neurotrófico derivado de células gliales) el cual confiere protección al sistema nigro-estriatal en modelos experimentales de la EP. A este respecto, se ha observado que la administración de GDNF estimula a la enzima TH, por lo que un posible mecanismo por el cual la melatonina induce la expresión de la TH puede estar relacionado con los altos niveles de GDNF (Venero *et al.*, 2002; Armstrong y Niles, 2002; McMillan *et al.*, 2007).

L-DOPA/Melatonina

Los animales que recibieron la co-administración de L-DOPA/melatonina durante 6 meses presentaron menor muerte de células inmunopositivas a TH en la SNc en el lado ipsilateral a la lesión en comparación con los demás grupos, a pesar de que no mostraron diferencias significativas, es factible pensar que este porcentaje pequeño de células podrían participar en la mejoría de las pruebas motoras así como la disminución de las discinesias (gráfica 9A).

Sorprendentemente, en el lado contralateral a la lesión los animales mostraron incremento el número de neuronas dopaminérgicas (gráfica 9B), probablemente para tratar de compensar el daño producido en el lado ipsilateral a la lesión. Al respecto estudios recientes en nuestro laboratorio muestran que animales lesionados con 6-OHDA que recibieron la co-administración de L-DOPA/melatonina presentaron neuronas inmunopositivas a TH/BrdU (5-bromo 2-deoxyuridina) es decir, que el efecto de estos fármacos podría ayudar a la neurogénesis (Moreno Rivera, 2014). Como se mencionó la co-administración de L-

DOPA/melatonina evita la auto-oxidación de la L-DOPA e incrementa los niveles de DA, lo cual podría evitar las fluctuaciones en las concentraciones (Maharaj *et al.*, 2005; Rocchitta *et al.*, 2006; Borah y Mohanakumar, 2009a), manteniendo así los niveles estables de DA. En este sentido se ha reportado que la DA es importante para que se presente la neurogénesis, lo cual fue evidenciado en los animales depletados de DA donde se observó disminución de la proliferación de células precursoras neuronales (Baker *et al.*, 2004; Van-Kampen y Eckman, 2006), este efecto fue revertido cuando se les administró L-DOPA (Höglinger *et al.*, 2004). Al parecer el efecto neurogénico es modulado por la activación de los receptores dopaminérgicos, específicamente los receptores D3 que parece que desempeñan un papel importante en este proceso (Van-Kampen y Eckman, 2006). De esta manera, la L-DOPA podía estar activando receptores dopaminérgicos del tipo D3 ubicados en la SNc y desencadenar las cascadas de señalización relacionadas con el potencial neurogénico de estos receptores.

También es importante tener en cuenta los cambios que la melatonina podría ocasionar en el proceso neurogénico. Se ha reportado que la melatonina tiene la capacidad de incrementar la neurogénesis (Moriya *et al.*, 2007; Kong *et al.*, 2008; Kilic *et al.*, 2008; Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2009; Rennie *et al.*, 2009; Crupi *et al.*, 2010; Crupi *et al.*, 2011; Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2012; Chern *et al.*, 2012). Se propone que esta característica de la melatonina puede ser debida a su capacidad para aumentar la síntesis y liberación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Imbesi *et al.*, 2008) el cual juega un papel importante en la formación de nuevas neuronas (Barnabé-Heider y Miller, 2003; Babu *et al.*, 2009). De esta manera la melatonina podría afectar el microambiente favoreciendo la neurogénesis.

Ademas otro posible efecto neuroprotector del co-tratamiento con L-DOPA/melatonina, se deba a que el tratamiento con L-DOPA en animales depletados de DA produce incremento de radicales $OH^{\bullet}$, los cuales tienen la capacidad de oxidar la DA y generar la neurotoxina endógena 6-OHDA en el NE, produciendo así la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc debido al estrés oxidativo y al daño mitocondrial (Maharaj *et al.*, 2005; Borah y Mohanakuma, 2009a; Borah y Mohanakuma, 2010; Borah *et al.*, 2012). Cuando la L-DOPA se administra junto con la melatonina, se disminuye la formación de 6-

OHDA (Maharaj *et al.*, 2006; Borah y Mohanakuma, 2009b; Borah *et al.*, 2012) así como los niveles de peroxidación de lípidos (Maharaj *et al.*, 2006), y de esta manera se brinda protección a las neuronas dopaminérgicas en la SNc del lado contralateral a la lesión.

Espinas dendríticas

Nuestros resultados muestran que la denervación dopaminérgica producida por la 6-OHDA resulta en la pérdida de espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del estriado (gráficas 10A y B). Estudios *post-mortem* en pacientes con EP han revelado disminución del 30% y esta pérdida puede alcanzar hasta el 50% en la densidad de espinas dendríticas en las neuronas espinosas medianas además de reducción en el tamaño del árbol dendrítico (Stephens *et al.*, 2005; Zaja-Milatovic *et al.*, 2005; Deutch *et al.*, 2006), de igual forma, en primates no humanos tratados con MPTP y roedores lesionados con 6-OHDA muestran pérdida drástica de estas estructuras (Gutiérrez-Valdez, 2004; Villalba *et al.*, 2009; García-Ruiz, 2012), sugiriendo la importancia del sistema nigro-estriatal en la regulación morfológica y la plasticidad de las espinas dendríticas en el núcleo estriado (Smith y Villalba, 2008; Smith *et al.*, 2009).

Estudios previos muestran que la denervación dopaminérgica aumenta la excitabilidad neuronal en el cuerpo estriado debido al aumento de la transmisión córtico-estriatal (Calabresi *et al.*, 2007), al respecto se sugiere que las espinas dendríticas podrían retraerse o degenerar como mecanismo compensatorio (Ingham *et al.*, 1998) para evitar la muerte por excitotoxicidad (Segal, 1995), ya que al disminuir el número de espinas dendríticas se reduce la posibilidad de contactos sinápticos glutamatérgicos y con esto la posible muerte por excitotoxicidad (Cavazos *et al.*, 1991; Day *et al.*, 2006; Gerfen, 2006).

L-DOPA

En nuestros resultados observamos que el tratamiento crónico con L-DOPA no restaura la densidad de espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del NE. Esto es consistente con estudios previos *post-mortem* en pacientes con EP, donde muestran que la pérdida de espinas dendríticas estuvo presente a pesar de que todos los pacientes recibieron tratamiento con L-DOPA por varios años (Zaja-Milatovic *et al.*, 2005; Stephens *et al.*, 2005). Deutch y cols. (2007) proponen que la L-DOPA puede ser inefectiva en estados

avanzados de la EP debido probablemente a la pérdida de espinas dendríticas. En roedores con diferentes modelos de EP que fueron tratados con L-DOPA no se restaura el número de espinas dendríticas (Deutch *et al.*, 2007; García, 2012; Naskar *et al.*, 2013).

Como se mencionó, el tratamiento con L-DOPA hace más sensibles a las aferencias glutamatérgicas córtico-estriales (Cepeda *et al.*, 1993; Thiele *et al.*, 2011), en este sentido se propone que el glutamato que actúa sobre los receptores NMDA aumenta el Ca^{2+} intracelular. Al respecto se ha reportado que el incremento en los niveles de Ca^{2+} produce cambios en las espinas dendríticas, de manera que el aumento moderado y transitorio produce alargamiento de las espinas, mientras que la aplicación pulsátil de glutamato incrementa los niveles de Ca^{2+} resultando en la contracción de las espinas, lo cual conlleva a su eventual desaparición (Korkotian y Segal, 1999; Segal *et al.*, 2000). En este contexto, se ha reportado que las espinas dendríticas son compartimientos individuales de Ca^{2+} (Cowan *et al.*, 1998; Helmchen, 2002) y probablemente al perderse disminuirían las concentraciones de Ca^{2+} intracelular y la célula se protegería (Segal, 1995).

Melatonina

En nuestros resultados mostramos que el tratamiento con melatonina ayudó a la conservación de las espinas dendríticas en las neuronas espinosas medianas. Al respecto se reporta que la melatonina previene daño del citoesqueleto por reducción del estrés oxidativo y por restablecimiento de sus alteraciones (Reiter y Benitez-King, 2009). Por ejemplo: en un estudio realizado en células N1E-115 se mostró que la melatonina induce la formación de neuritas y de filamentos de actina (Benitez-King *et al.*, 2004), la cual es una proteína que proporciona la principal base estructural de la organización del citoesqueleto de las espinas dendríticas (Halpain, 2000). Además se muestra que ratas tratadas con melatonina reestablecen la cantidad de microfilamentos de actina en el hipocampo, comparadas con las que no recibieron tratamiento (Jiménez-Rubio *et al.*, 2012).

La conservación de las espinas dendríticas promovida por el tratamiento con melatonina podría deberse también, a la modulación de la sobreactividad de la transmisión glutamatérgica en el estriado (Maharaj *et al.*, 2007; Antunes *et al.*, 2013; Chakraborty *et al.*,

2014) debido a que se ha reportado que la melatonina atenúa la respuesta excitatoria de las neuronas estriatales cuando se estimula la corteza motora (Escames *et al.*, 1996). Asimismo, estudios de electrofisiología muestran que la melatonina deprime la actividad del receptor NMDA en el núcleo estriado (Kiss and Viz, 2001). Escames y cols. (2004), proponen que la melatonina inhibe la excitotoxicidad inducida por los receptores NMDA por su capacidad de reducir la actividad del nNOS y la consecuente producción de ON[•], el cual puede actuar presinápticamente como mensajero retrógrado aumentando la liberación de glutamato y la activación postsináptica de los receptores NMDA; pero también puede actuar directamente sobre el receptor NMDA, ya sea aumentando o disminuyendo la excitabilidad. En este contexto la melatonina tiene la habilidad de antagonizar los receptores NMDA.

También se reporta que en un modelo de isquemia, el tratamiento con melatonina previene la disminución en la densidad de las espinas dendríticas (Chen *et al.*, 2009; García-Chávez *et al.*, 2008), tamaño del soma, número de bifurcaciones dendríticas, longitud de la dendrita apical y de las neuronas piramidales de corteza prefrontal (García-Chávez *et al.*, 2008), y en células piramidales de la región CA1 del hipocampo (González-Burgos *et al.*, 2007). Estos estudios apoyan el hecho de que el tratamiento con melatonina tiene un efecto benéfico sobre la pérdida de las espinas dendríticas favoreciendo la apropiada integración de las conexiones, tal como lo indican nuestros resultados.

L-DOPA/melatonina

La co-administración de L-DOPA/melatonina restauró significativamente la densidad de espinas dendríticas tanto del lado ipsilateral como del contralateral. Estudios recientes muestran que la presencia de neuronas dopaminérgicas potencia la formación de espinas dendríticas en las neuronas espinosas medianas en cultivo. Por lo que es posible que las neuronas dopaminérgicas tienen efecto neurotrófico (Fasano *et al.*, 2013). En este contexto es factible pensar que como la co-administración de L-DOPA/melatonina incrementa el número de neuronas dopaminérgicas en el lado contralateral a la lesión, éstas ejercen un efecto neurotrófico promoviendo así la formación de nuevas espinas dendríticas.

Nuestros resultados también concuerdan con lo reportado por Naskar y cols (2013), donde muestran que roedores expuestos a la neurotoxina MPTP y tratados con L-

DOPA/melatonina (5 mg/kg, via oral y 10 mg/kg, ip. respectivamente) dos veces al día durante 2 días, presentan restauración de la morfología y la densidad de las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas. Proponiendo que este efecto es regulado principalmente por la melatonina debido a sus características de disminuir el flujo excesivo de Ca^{2+} . Concluyendo que la melatonina puede ser un buen coadyuvante para la L-DOPA en la terapia de la EP.

Comparación entre sexos

En nuestro estudio mostramos que las hembras que producen estrógenos, que fueron lesionadas con 6-OHDA y que recibieron los diferentes tratamientos, presentan mayor neuroprotección en comparación con los machos y las hembras ovx, lo que confirman la diferencia entre sexos, además de la diferencia en el retraso en la neurodegeneración, sugiriendo el efecto benéfico de los estrógenos en el desarrollo y progresión de la enfermedad.

Se ha observado que los estrógenos tienen efecto neuroprotector sobre el sistema nigro-estriatal, lo cual es importante de considerar dado el impacto que puede llegar a presentar en las estrategias de tratamiento. Estudios recientes sugieren que las mujeres con EP tienden a presentar retraso en la aparición de ciertos síntomas motores comparado con los hombres (Haaxma *et al.*, 2007; Rubin, 2007; Alves *et al.*, 2009), lo cual concuerda con nuestros resultados obtenidos en las pruebas conductuales (gráficas 2 y 3). Además, varios estudios reportan que los hombres presentaron síntomas motores mas severos en comparación con las mujeres (Lyons *et al.*, 1998; Rajput *et al.*, 2004; Lubomski *et al.*, 2014), observado que los hombres presentan más rigidez, dificultades para escribir, problemas del habla y problemas de la marcha (Scott *et al.*, 2000). Más aún, mujeres post-menopáusicas con EP que recibieron tratamiento con estrógenos, presentaron mejoría en el desempeño motor (Lyons *et al.*, 1998; Evatt *et al.*, 2011; POETRY Investigators, 2011), sugiriendo un papel sintomático de los estrógenos (Brann *et al.*, 2007; Pavon *et al.*, 2010).

En modelos animales con 6-OHDA en ratas hembras, se mostró que los estrógenos disminuyen significativamente la rigidez (Sarkaki *et al.*, 2008), mientras que en las ratas ovx disminuyen la actividad espontánea y la liberación de DA (Ohtani *et al.*, 2001).

Se propone que el retraso de los síntomas motores en mujeres podría explicarse por el incremento en los niveles de DA estriatal comparados con los niveles en los hombres, lo cual podría retrasar el momento de llegar al umbral crítico en la disminución de la DA estriatal y por tanto retrasar el desarrollo de los síntomas parkinsonianos (Leranth *et al.*, 2000; Haaxma *et al.*, 2007; Pavon *et al.*, 2010).

Diversos estudios que utilizan toxinas para inducir modelos de la EP muestran que son capaces de reproducir las diferencias entre sexos en la susceptibilidad de la enfermedad observada en los seres humanos (Murray *et al.*, 2003; Ramírez *et al.*, 2003; Ookubo *et al.*, 2008). Por ejemplo, la administración de 6-OHDA en las fibras nigro-estriatales, produce depleción en los niveles de DA en el NE y la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNc, la cual es significativamente mayor en ratas machos comparado con las hembras (Murray *et al.*, 2003; Gillies *et al.*, 2004; McArthur *et al.*, 2007), más aún, las ratas ovx presentan mayor pérdida de DA estriatal en comparación con las hembras con las gónadas intactas, este efecto de la gonadectomía puede ser revertido por el reemplazo del estradiol a niveles fisiológicos antes de la lesión (Dluzen *et al.*, 1996; Murray *et al.*, 2003).

Como indican nuestros resultados, los animales machos, hembras c/ov y hembras ovx con 6-OHDA sin tratamiento no mostraron diferencias significativas tanto del lado ipsilateral como contralateral a la lesión en cuanto al número de células dopaminérgicas, (gráficas 9A y B). Lo cual podría deberse a que la neurotoxina es sumamente agresiva, lo que de alguna manera no permite la sobrevivencia de más células (Flores-Martínez, 2005). También se propone que los estrógenos protegen las neuronas dopaminérgicas sobrevivientes por corto tiempo, pero que posteriormente estas células pudieran morir como consecuencia de la acción de la neurotoxina (Ferrez *et al.*, 2003).

Estudios previos mostraron el efecto del remplazo de los estrógenos en dosis fisiológicas en ratas ovx después de la inyección con 6-OHDA en la vía nigro-estriatal, reportando que el tratamiento con estrógenos no mostró efecto en la supervivencia de células inmunopositivas a TH, sin embargo, observaron que los estrógenos atenúan la pérdida de DA en el NE; los autores proponen que los estrógenos de alguna manera pueden promover un mecanismo adaptativo de síntesis, liberación y metabolismo de la DA en las células

sobrevivientes, por lo que probablemente las hembras pueden ser más capaces de resistir la aparición y progresión de las lesiones neurodegenerativas en comparación con los machos (McArthur *et al.*, 2007; Ferrax *et al.*, 2008).

Los animales que fueron exclusivamente ovx presentaron disminución en el número de espinas dendríticas en comparación con los machos y las hembras c/ov (gráficas 8A y B). Asimismo observamos que las hembras ovx que recibieron 6-OHDA presentan disminución de las espinas dendríticas en comparación con los machos y hembras c/ov. Al respecto existen estudios recientes que indican que los estrógenos pueden regular rápidamente el citoesqueleto de actina a través de cascadas de señalización (Sanchez *et al.*, 2009; Srivastava *et al.*, 2013). Los estrógenos conducen a la fosforilación de WAVE1 (homólogo de la familia de proteínas verprolina, que controlan la polimerización de actina) en los residuos de serina 310, 397, y 441 y la redistribución WAVE1 hacia los lugares de formación de las espinas dendríticas. Los estrógenos actúan a través de la activación de proteínas G vía RE α (receptores a estrógenos) llevando al reclutamiento de la cascada c-Src/Rac1/Cdk5/WAVE1/Arp-2/3, donde Rac1 recluta la cinasa dependiente de ciclina (Cdk5) que fosforila directamente WAVE1 en los tres residuos de serina. Después de la fosforilación de WAVE1 por los estrógenos, el complejo Arp -2/3 se concentra en los sitios de formación de las espinas dendríticas, donde desencadena la reorganización local de las fibras de actina; en paralelo, la estimulación de las proteínas G por el RE α lleva a la activación de la cascada RhoA/ROCK-2/moesina, lo que contribuye al remodelamiento del citoesqueleto y es necesario para la formación de las espinas dendríticas inducida por los estrógenos (Sanchez *et al.*, 2009). Asimismo se ha reportado que cuando los estrógenos se unen a su receptor ER α , se activa la vía PI3K (fosfoinositol3-cinasa) (García-Segura *et al.*, 2010; Marin *et al.*, 2009) que participa en el proceso de espinogénesis (Cuesto *et al.*, 2011).

#

Los estrógenos también tienen la capacidad de activar las proteínas cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) para activar a su vez el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y de esta manera producir neuroprotección (Xia *et al.*, 1995; Sohrabji *et al.*, 1995; Sawada y Shimohama, 2000; Sohrabji and Lewis 2006; Kipp *et al.*, 2006). También puede interactuar con el IGF-1 (factor de crecimiento insulínico tipo 1), el cual ejerce efectos

neurotróficos, lo que puede contribuir también al efecto neuroprotector de los estrógenos (Quesada and Micevych 2004; Quesada *et al.*, 2008). Estudios recientes sugieren que los estrógenos pueden incrementar la expresión del BDNF a través la vía ERK-Akt-CREB (Yang *et al.*, 2010), además se propone la posible regulación epigenética dependiente de estrógenos que podría aumentar la transcripción del BDNF, debido a que los estrógenos pueden rápidamente alterar la acetilación y metilación del DNA (Greenberg *et al.*, 2009). Se ha planteado un modelo hipotético donde se propone que los niveles de BDNF, ya sea a través del aumento de la liberación o síntesis, potencialmente impulsado por los estrógenos, es capaz de activar de forma aguda la GTPasa Rac que conduce al alargamiento y estabilización de las espinas dendríticas, fomentando así su estabilización y la conectividad sináptica (Srivastava *et al.*, 2013).

Interesantemente, en nuestros resultados también mostramos que existe diferencia entre sexos con respecto a las discinecias y a la conducta motora con los resultados del tratamiento, observando que las hembras c/ov 6-OHDA+L-DOPA presentan retraso en el deterioro motor, pero son más propensas a desarrollar discinecias en comparación con los machos 6-OHDA+L-DOPA y las hembras ovx 6-OHDA+L-DOPA, lo cual concuerda con estudios previos, donde se observa que existen diferencias entre sexos en cuanto al tratamiento con L-DOPA, mostrando que las mujeres tuvieron mejor desempeño motor evaluado por la prueba UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale -Escala unificada para la evaluación de la Enfermedad de Parkinson-) y presentaron mayor tiempo "on" en comparación con los hombres; sin embargo, las mujeres presentaron mayor prevalencia a desarrollar discinecias. Aún no está claro por qué las mujeres son más susceptibles que los hombres a desarrollar discinecias, pero se sugiere que los estrógenos pueden ser la base de esta susceptibilidad (Lyons *et al.*, 1998; Tsang *et al.*, 2000; Kompoliti *et al.*, 2000; Zappia *et al.*, 2002; Chapuis *et al.*, 2005; Brann *et al.*, 2007; Solla *et al.*, 2012).

Una posible explicación para la diferencia de dicha susceptibilidad en las discinecias, puede ser por el hecho de que los humanos y las ratas presentan características similares de expresión de la Catecol-O-metiltransferasa (COMT) (Tenhunen, 1996), la cual es una enzima que degrada las catecolaminas incluyendo la L-DOPA y la DA (De Lau *et al.*, 2012), y se ha mostrado que las mujeres tienen de 20% a 30% de disminución en la actividad de la COMT

comparada con los hombres (Martinelli *et al.*, 2003). También se ha reportado que en el ciclo del proestro la actividad de la COMT es baja en el cerebro de la rata. En este sentido se han realizado estudios, y se reportó que los estrógenos pueden disminuir la regulación del gen de la COMT en tiempo y dosis dependiente (Xie *et al.*, 1999). Por lo tanto, si los estrógenos disminuyen el sistema de la COMT podrían tener un potencial farmacológico para aumentar la disponibilidad de L-DOPA en el NE y prolongar el tiempo "on", así como las discinecias (Martinelli *et al.*, 2003; Saunders, 2003). En este sentido se ha propuesto que al disminuir las dosis de L-DOPA se podrían disminuir las fluctuaciones motoras en pacientes tratados con estrógenos (Tsang *et al.*, 2000; Adams y Kumar, 2013).

Por otro lado, las ratas hembras con estrógenos que recibieron tratamiento con melatonina tienden a recuperarse más rápido en las pruebas conductuales en comparación con los machos y hembras ovx, y en los últimos meses de tratamiento todos los animales presentaron valores similares a los control; a nivel citológico los animales presentaron protección de las neuronas dopaminérgicas del lado contralateral a la lesión y recuperación de las espinas dendríticas tanto del lado ipsilateral como contralateral a la lesión. Los estudios del tratamiento con melatonina y estrógenos en modelos de neurodegeneración son pocos, por lo que el presente trabajo aporta nuevo conocimiento al respecto.

Estudios previos mostraron que la adición de melatonina en un regimen de terapia hormonal en ratas maduras ovx puede contribuir al efecto antioxidante de los estrógenos (Turgut *et al.*, 2013). Cupri y cols (2011) examinaron el efecto de la melatonina sobre la neurogenesis en el hipocampo de ratas ovx, mostrando que el tratamiento con melatonina durante 21 días tanto en roedores c/ov y ovx incrementa el número de células inmunopositivas a BrdU en el giro dentado e incrementa el número de espinas dendríticas en las células granulares, proponiendo que la melatonina también puede actuar como neuroprotector en condiciones deprivadas de estrógenos. Asimismo, Feng y Zhang (2005) proponen que en animales ovx se incrementa el estrés oxidativo, provocando alteraciones neurológicas y que el tratamiento con melatonina o con estrógenos durante 4 meses en ratas ovx tienen efecto neuroprotector caracterizado por la inhibición de la caspasa-3, incrementó en la actividad de los complejos I y IV, y disminuyen los niveles de peroxidación

de lípidos en comparación con las que no recibieron tratamiento, ejerciendo así efecto neuroprotector.

En un estudio realizado en hembras c/ov que fueron sometidas a un modelo de accidente cerebrovascular y que recibieron melatonina, se observó que los estrógenos y la melatonina presentan efecto sinérgico para disminuir los niveles de peroxidación de lípidos, incrementando la actividad de barredor de radicales libres y el número de neuronas sobrevivientes de la corteza y el NE así como mejorar conductas sensorio-motoras (Tai *et al.*, 2011).

De acuerdo con estos estudios, es factible pensar que después de la inyección de la 6-OHDA el tratamiento con melatonina y los estrógenos en las ratas hembras intactas, trabajen en conjunto para activar diferentes vías de señalización para disminuir el estrés oxidativo y con ello neuroproteger las neuronas dopaminérgicas (del lado contralateral a la lesión) así como de las espinas dendríticas y de esta manera mejorar la capacidad motora, esto podría ser una posible explicación del por qué las hembras c/ov tienden a recuperarse más rápido en las pruebas motoras en comparación con los machos y las hembras ovx.

Interesantemente, los animales que recibieron el tratamiento con 6-OHDA+L-DOPA/melatonina presentaron recuperación conductual desde el inicio del tratamiento, incremento en el número de neuronas dopaminérgicas en el lado contralateral a la lesión y protección de espinas dendríticas tanto del lado ipsilateral como contralateral a la lesión, estos resultados fueron independiente del sexo. Por lo que se sugiere que el co-tratamiento de L-DOPA/melatonina podría mejorar la eficacia de la L-DOPA mediante el aumento en los niveles de DA en el NE (Naskar *et al.*, 2013). Por lo que se propone que estos fármacos podrían actuar en sinergia para ejercer un papel modulador en la transmisión nigro-estriatal, lo cual puede ser responsable de varios de los efectos benéficos como alteraciones bioquímicas, regulación de las espinas dendríticas, supervivencia celular (Naskar *et al.*, 2013; Antunes *et al.*, 2013) y alteraciones motoras como las discinecias.

Finalmente es importante mencionar que los estrógenos actúan como factores protectores en enfermedades neurodegenerativas como la EP y la enfermedad de Alzheimer mejorando

la calidad de vida de las mujeres (Brann *et al.*, 2007). Pero debe tenerse en cuenta que el uso de los estrógenos también implica riesgos. Las mujeres que utilizan la terapia de reemplazo hormonal tienen mayor probabilidad de sufrir cáncer de mama (Folkerd y Dowsett, 2013) o de útero, si existe historia familiar de estas enfermedades, por lo que se requiere una administración cuidadosa y controlada de este tipo de tratamiento (Lopera y Sánchez, 1999).

CAMBIOS EN EL ESTRIADO CONTRALATERAL

Es importante hacer hincapié en el proceso degenerativo que se observó en el estriado contralateral a la lesión tanto de los animales machos como en las hembras, los cuales consistieron en la disminución de las espinas dendríticas y neuronas inmunopositivas a TH (gráficas 9B y 10B, respectivamente); ya que algunos autores lo utilizan como lado control y de alguna manera el daño inducido por la 6-OHDA en el lado ipsilateral es manifestado también en el lado contralateral. Nuestros resultados concuerdan con estudios previos, donde muestran que en animales machos y hembras depletados unilateralmente de DA también presentaron alteraciones en el estriado contralateral a la lesión, caracterizado por disminución del número de neuronas dopaminérgicas, espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas, número de contactos con espinas dendríticas e incremento en de las sinapsis perforadas, además de edema de los botones sinápticos, mostrando que las alteraciones en el grupo de las hembras es menor en comparación con los machos (Flores-Martínez, 2005). En animales machos lesionados unilateralmente en el haz medial con 6-OHDA también presentaron cambios degenerativos en el estriado contralateral a los 20-30 días después de la lesión, los cambios consistieron en edema de los botones sinápticos e incremento en las sinapsis perforadas (Avila-Costa 1996; Avila-Costa *et al.*, 2008; Anaya-Martínez *et al.*, 2014). Al respecto Yang y cols. (2007) realizaron un estudio con técnicas electrofisiológicas donde muestran que los cambios que ocurren en la SNc ipsilateral afecta el lado contralateral. Una posible explicación es la posible existencia de una vía dopaminérgica nigroestriatal del 5% al 10% que proyecta hacia el lado contralateral (Loughlin y Fallon, 1982; Gerfen *et al.*, 1982); entonces es factible pensar que la lesión con 6-OHDA podría provocar alteraciones a través de la pequeña vía que proyecta al estriado

contralateral, además, existen evidencias histológicas de las proyecciones interhemisféricas de la SN hacia el cuerpo estriado (Morgan y Huston, 1990).

En años recientes se ha estudiado la interconexión del pedunculo pontino (PPN) con los ganglios basales, específicamente las neuronas colinérgicas del PPN que proyectan bilateralmente a las neuronas dopaminérgicas de la SNc. Estas proyecciones, por medio de la activación de los receptores de acetilcolina, influyen en el disparo de las neuronas dopaminérgicas y por lo tanto su capacidad de respuesta (Mena-Segovia *et al.*, 2008), afectando el comportamiento motor (Florio *et al.*, 1999; Stein, 2009), por lo que puede ser otra posible vía por la que se produzcan las alteraciones inducidas por la neurotoxina. Sin embargo, son necesarios más estudios para explorar las posibles vías para explicar la relación interhemisférica entre la SN y el cuerpo estriado.

Por otro lado, observamos que los animales que recibieron la administración de melatonina y la co-administración de L-DOPA/melatonina presentaron recuperación del desempeño motor, apoyando la hipótesis de que la actividad dopaminérgica contralateral (hemisferio menos afectado) desempeña un papel en la compensación de la depleción dopaminérgica del hemisferio más afectado en la EP (Blesa *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

En resumen, de acuerdo con nuestros resultados podemos concluir que:

- Los animales que recibieron el tratamiento con melatonina mejoraron la actividad motora después de 28 días de tratamiento, justo cuando el tratamiento con L-DOPA deja de ser efectivo.
- Los animales que recibieron la co-administración de L-DOPA/melatonina presentaron el mejor desempeño motor desde el inicio del tratamiento perdurando hasta el final del estudio.
- En las ratas hembras c/ov con 6-OHDA y que recibieron los diferentes tratamientos se observó retraso en el deterioro motor en comparación con los machos y hembras ovx, por lo que los estrógenos ayudan a la neuroprotección.
- Los animales que recibieron la co-administración de L-DOPA/melatonina manifestaron pocos MIAs en comparación con los animales que recibieron L-DOPA, perdurando este efecto durante los 6 meses de tratamiento.
- Los animales que recibieron tratamiento con melatonina presentaron protección de las neuronas inmunopositivas a TH en el lado contralateral a la lesión.
- Los animales que recibieron la co-administración de L-DOPA/melatonina presentaron mayor número de neuronas inmunopositivas a TH en el lado contralateral a la lesión con respecto a los animales control.
- Todos los animales que recibieron melatonina y la co-administración de L-DOPA/melatonina presentaron conservación de las espinas dendríticas

De acuerdo a lo anterior, podemos concluir que independientemente del sexo el tratamiento con la co-administración de L-DOPA/melatonina fue el más efectivo en la disminución de las alteraciones conductuales, por lo que es factible pensar que la combinación de estos fármacos ejerce un papel modulador en la transmisión nigro-estriatal, que implica el ajuste fino de la actividad motora y disminución de las discinesias mediante la protección de las espinas dendríticas y la menor muerte de las neuronas dopaminérgicas, que a pesar de no mostraron diferencias significativa en el lado ipsilateral a la lesión con respecto a los otros grupos, podrían jugar un papel importante sobre la mejoría motora y la disminución de las discinesias. Por lo que consideramos que la co-administración de L-DOPA/melatonina puede ser un posible candidato para el tratamiento de la EP.

Asimismo, nuestros datos revelan que las hembras que producen estrógenos presentan mejor respuesta al tratamiento con L-DOPA o melatonina, siendo el daño menor en las hembras con ovarios con respecto a los machos y hembras ovx, lo cual sugiere que los estrógenos tienen un efecto benéfico contra el desarrollo y progresión de la enfermedad. Lo anterior nos podría llevar a pensar en la importancia de tomar en consideración a los estrógenos en la implementación de las estrategias de tratamiento en la EP como posible coadyuvante en las mujeres. Por lo que se sugiere estudiar el efecto que podrían tener los estrógenos en machos en estudios posteriores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña-Castroviejo D, Escames G, López LC, Mulero M (2006) Protective role of melatonin against mitochondrial damage in Inflammation. Chapter XX. In: Melatonin: From molecules to therapy. Nova Science Publishers Inc.
- Adams C, Kumar R (2013) The effect of estrogen in a man with Parkinson's disease and a review of its therapeutic potential. *Int J Neurosci* 123: 741-742.
- Adler CH, Ahlskog JE (2000) Parkinson's disease and movement disorders, diagnosis and treatment guidelines for the practicing physician. Humana Press Totowa, New Jersey, USA. pp. 474.
- Aguiar LMV, Vasconcelos SMM, Sousa FCF, Viana GSB (2002) Melatonin reverses neurochemical alterations induced by 6-OHDA in rat striatum. *Life Sci* 70: 1041-1051.
- Ahlskog J, Muenter M (2001) Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord* 16: 448-506.
- Alanis QM (1996). Historia natural de la enfermedad de Parkinson. En Otero-Siliceo E. 1996. Parkinson enfoque al futuro. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Fondo de Cultura Económica pp. 11-17.
- Allbutt HN, Henderson JM (2007) Use of the narrow beam test in the rat, 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods* 159: 195-202.
- Alves G, Müller B, Herlofson K, HogenEsch I, Telstad W, Aarsland D, Tysnes OB, Larsen JP (2009) Incidence of Parkinson's disease in Norway: the Norwegian ParkWest study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80: 851-857.
- Anaya-Martínez V, Gutierrez-Valdez AL, Ordoñez-Librado JL, Montiel-Flores E, Sánchez-Betancourt J, Sánchez Vázquez del Mercado C, Reynoso-Erazo L, Tron-Alvarez R, Avila-Costa MR (2014). The presence of perforated synapses in the striatum after dopamine depletion, is this a sign of maladaptive brain plasticity? *Microscopy (Oxf)* 63:427-35.
- Andersson M, Hilbertson A, Cenci MA (1999) Striatal fosB expression is causally linked with L-DOPA-induced abnormal involuntary movements and the associated upregulation of striatal prodynorphin mRNA in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 6: 461-474.
- Antunes Wilhelm E, Ricardo Jesse C, Folharini Bortolatto C, Wayne Nogueira C. (2013) Correlations between behavioural and oxidative parameters in a rat quinolinic acid model of Huntington's disease: Protective effect of melatonin. *Eur J Pharmacol* 701: 65-72.
- Appel S.H. (1981) A unifying hypothesis for the cause of amyotrophic lateral sclerosis, Parkinsonism, and Alzheimer disease. *Ann Neurol* 10: 499-505.
- Armstrong KJ, Niles LP (2002) Induction of GDNF mRNA expression by melatonin in rat C6 glioma cells. *Neuroreport* 13: 473-475.

- Asanuma M, Miyazaki I, Ogawa N (2003) Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 5: 165-176.
- Avila Costa MR (1996). Evolución de las alteraciones ultraestructurales del neuropilo del núcleo caudado de rata después de la lesión unilateral de la vía nigroestriatal con 6-hidroxidopamina. Tesis para obtener el grado de Maestría en Neurociencias. ENEP-Iztacala. UNAM.
- Avila-Costa MR, Montiel Flores E, Colín-Barenque L, Ordóñez JL, Gutiérrez AL, Niño-Cabrera HG, Mussali-Galante P, Fortoul TI (2004) Nigrostriatal modifications after vanadium inhalation: an immunocytochemical and cytological approach. *Neurochem Res* 29: 1365-1369.
- Avila-Costa MR, Anaya MV, Ordoñez JL, Gutiérrez AL, Montiel FE, Colin BL, Aley MP, Espinosa VJ, Reynoso EL, Fortoul TI (2007) Synaptic alterations of the striatum: Two different models of dopamine deafferentation. En *Neural Synapse research Trends*. Nova science publishers 310p.
- Avila-Costa M, Gutierrez-Valdez A, Ordoñez-Librado J, Martinez V, Colin-Barenque L, Espinosa-Villanueva J, Aley-Medina P, Montiel-Flores E, Velazquez-Mata A, Machado-Salas JP (2008). Time course changes of the striatum neuropil after unilateral dopamine depletion and the usefulness of the contralateral striatum as a control structure. *Neurol Res* 30:1068-74.
- Babu H, Ramirez-Rodriguez G, Fabel K, Bischofberger J, Kempermann G (2009) Synaptic network activity induces neuronal differentiation of adult hippocampal precursor cells through BDNF signaling. *Front Neurosci* 1:1–49.
- Baker SA, Baker KA, Hagg T (2004) Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *Eur J Neurosci* 20: 575-579.
- Baraka AM, Korish AA, Soliman GA, and Kamal H (2011) The possible role of estrogen and selective estrogen receptor modulators in a rat model of Parkinson's disease. *Life Sci* 88:879-85.
- Barzilai A, Melamed E, Shirvan A (2001) Is there a rationale for neuroprotection against Dopamine toxicity in Parkinson's disease? *Cell Mol Neurobiol* 21: 215-230.
- Barnabé-Heider F, Miller FD (2003) Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways. *J Neurosci* 23:5149-60.
- Barnéoud P, Parmentier S, Mazadier M, Miquet JM, Boireau A, Dubédat P, Blanchard JC (1995) Effects of complete and partial lesions of the dopaminergic mesotelencephalic system on skilled forelimb use in the rat. *Neuroscience* 67: 837-48.
- Barnham KJ, Masters CL, Bush AI (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress *Nat Rev Drug Discov* 3: 205-214.
- Bastian AJ, Kelly VE, Perlmutter JS, Mink JW (2003) Effects of Pallidotomy and Levodopa on Walking and Reaching Movements in Parkinson's Disease. *Mov Disord* 18: 1008-1017.
- Bellasi A, Raggi P, Merz CN, Shaw LJ (2007) New insights into ischemic heart disease in women. *Cleve Clin J Med* 74:585-94.

- Benice TS, Lou JS, Eaton R, Nutt J (2007) Hand coordination as a quantitative measure of motor abnormality and therapeutic response in Parkinson's disease. *Clin Neurophysiol* 118: 1776-1784.
- Benitez-King G, Ramírez-Rodríguez G, Ortiz L, Meza I (2004) The neuronal cytoskeleton as a potential therapeutic target in neurodegenerative diseases and schizophrenia. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3: 515-533.
- Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT (2002) Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays* 24: 308-318.
- Berton O, Guigoni C, Li Q, Bioulac BH, Aubert I, Gross CE, Dileone RJ, Nestler EJ, Bezard E (2009) Striatal overexpression of Delta-JunD resets L-DOPA-induced dyskinesia in a primate model of Parkinson disease. *Biol Psychiatry* 66: 554-561.
- Bezard E, Brotchie JM, Gross CE (2001) Pathophysiology of levodopa induced dyskinesia: Potential for new therapies. *Nat Rev Neurosci* 2: 577-588.
- Biagio MN, Bernardi G (2005) The 'magic' of L-DOPA: why is it the gold standard Parkinson's disease therapy? *Trends Pharmacol Sci* 26: 341-344.
- Björklund A, Dunnett SB, Stenevi U, Lewis ME, Iversen SD (1980) Reinnervation of the denervated striatum by substantia nigra transplants: functional consequences as revealed by pharmacological and sensorimotor testing 199: 307-33.
- Blesa J, Juri C, García-Cabezas MÁ, Adánez R, Sánchez-González MÁ, Cavada C, Obeso JA (2011) Inter-hemispheric asymmetry of nigrostriatal dopaminergic lesion: a possible compensatory mechanism in Parkinson's disease. *Front Syst Neurosci* 5:92.
- Blin O, Ferrandez AM, Pailhous J, Serratric G (1991) Dopa-sensitive and dopa-resistant gait parameters in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 103: 51-54.
- Bondy SC, Sharman EH (2007) Melatonin and the aging brain. *Neurochem Int* 50: 571-580.
- Bonnefont-Rousselot D, Collin F (2010) Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology* 278: 55-67.
- Borah A, Mohanakumar KP (2009a) Melatonin inhibits 6-hydroxydopamine production in the brain to protect against experimental Parkinsonism in rodents. *J Pineal Res* 47: 293-300.
- Borah A, Mohanakumar KP (2009b) Long term L-DOPA treatment causes production of 6-OHDA in the mouse striatum: involvement of hydroxyl radical. *Ann Neurosci* 16: 160-165.
- Borah A, Mohanakumar KP (2010) L-DOPA-induced 6-hydroxydopamine productions in the striata of rodents is sensitive to the degree of denervation. *Neurochem Int* 56: 352-62.
- Borah A, Mohanakumar KP (2012) L-DOPA induced-endogenous 6-hydroxydopamine is the cause of aggravated dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's disease patients. *Med Hypotheses* 79: 271-273.

- Bordet R, Ridray S, Carboni S, Diaz J, Sokoloff P, Schwartz JC (1997) Induction of dopamine D3 receptor expression as a mechanism of behavioral sensitization to levodopa. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3363-3367.
- Bordet R, Ridray S, Schwartz JC, Sokoloff P (2000) Involvement of the direct striatonigral pathway in levodopa-induced sensitization in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Eur J Neurosci* 12: 2117-2123.
- 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: 10768-10776.
- Bourque M, Dluzen DE, Paolo TD (2009) Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease. *Front Neuroendocrinol* 30: 142-157.
- Bové J, Prou D, Perier C, Przedborski S (2005) Toxin-induced models of Parkinson's disease. *The NeuroRx* 2: 484-494.
- Bracha HS, Shults C, Glick SD, Kleinman JE (1987) Spontaneous asymmetric circling behavior in hemi-parkinsonism; a human equivalent of the lesioned-circling rodent behavior. *Life Sci* 40: 1127-30.
- Brailowsky S, Garcia MM (1996) Capitulo XII. Neurofarmacología de la Enfermedad de Parkinson: aspectos básicos. En: Otero-Siliceo E., Abascal-Arias M.R., Alanis-Quiroga M. *Parkinson enfoque al futuro*. Fondo de cultura Económica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía 209-236.
- Brann D W, Dhandapania K, Wakadea C, Mahesha V, Khana M (2007) Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids* 72: 381-405.
- Brizard M, Carcenac C, Bemelmans AP, Feuerstein C, Mallet J, Savasta M (2006) Functional reinnervation from remaining DA terminals induced by GDNF lentivirus in a rat model of early Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 21: 90-101.
- Brocca ME, Pietranera L, Beauquis J, De Nicola AF (2013) Estradiol increases dendritic length and spine density in CA1 neurons of the hippocampus of spontaneously hypertensive rats: a Golgi impregnation study. *Exp Neurol* 247:158-64.
- Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Di Filippo M (2007) Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 30: 211-19.
- Calabresi P, Di Filippo M, Ghiglieri V, Tambasco N, Picconi B (2010) Levodopa-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease: filling the bench-to-bedside gap. *Lancet Neurol* 9: 1106-1117.
- Campos- Rufo M (2002) Melatonina y epilepsia. *Rev Neurol* 35: S51-58.
- Capitelli C, Sereniki A, Santos Lima MM, Reksidler AB, Tufik S, Frazão V (2008) Melatonin attenuates tyrosine hydroxylase loss and hypolocomotion in MPTP-lesioned rats. *Eur J Pharmacol* 594: 101-108.
- Castiello U, Bennett KM, Bonfiglioli C, Peppard RF (2000) The reach-to-grasp movement in Parkinson's disease before and after dopaminergic medication. *Neuropsychologia* 38: 46-59.

- Cavazos JE, Golarai G, Sutulo TP (1991) Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development progression and permanence. *J Neurosci* 11: 279-2803.
- Cenci MA, Lee CS, 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* 10: 2694-2706.
- Cenci MA, Whishaw IQ, Schallert T, (2002) Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci* 3:574-579.
- Cenci MA, Lundblad M, (2006) Post-versus presynaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Journal of Neurochemistry* 99: 381-392.
- Cenci MA, Lundblad M (2007) Ratings of L-DOPA-induced dyskinesia in the unilateral 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci* 41:9.25:9 - 9.25.23.
- Cenci MA, Ohlin KE, Rylander D (2009) Plastic effects of L-DOPA treatment in the basal ganglia and their relevance to the development of dyskinesia. *Parkinsonism Relat Disord* 15S3: S59-S63.
- Cepeda C, Buchwald NA, Levine MS (1993) Neuromodulatory of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9576-9580.
- Cepeda C, Levine M (1998) Dopamine and N-methyl -D-aspartate receptor interactions in the neostriatum. *Dev Neurosci* 20: 1-18.
- Chakraborty J, Nthenge-Ngumbau DN, Rajamma U, Mohanakumar KP (2014) Melatonin protects against behavioural dysfunctions and dendritic spine damage in 3-nitropropionic acid-induced rat model of Huntington's disease. *Behav Brain Res* 264:91-104.
- Chapuis S, Ouchchane L, Metz O, Gerbaud L, Durif F (2005) Impact of the motor complications of Parkinson's disease on the quality of life. *Mov Disord* 20: 224-30.
- Chase TN (1998) Levodopa therapy: consequences of the nonphysiologic replacement of dopamine. *Neurology* 50: S17-25.
- Chen HY, Hung YC, Chen TY, Sheng-Yang H, Wang YH, Lee WT, Wu TS, Lee EJ (2009) Melatonin improves presynaptic protein, SNAP-25, expression and dendritic spine density and enhances functional and electrophysiological recovery following transient focal cerebral ischemia in rats. *J. Pineal Res* 47: 260-270.
- Chern CM, Liao JF, Wang YH, Shen YC (2012) Melatonin ameliorates neural function by promoting endogenous neurogenesis through the MT2 melatonin receptor in ischemic-stroke mice. *Free Radic Biol Med* 52: 1634-47.
- Cheshire PA, Williams D (2012) Serotonergic involvement in levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *J Clin Neurosc* 19: 343-348.
- Clarke J, Ploughman M, Corbett D (2007) A qualitative and quantitative analysis of skilled forelimb reaching impairment following intracerebral hemorrhage in rats. *Brain Res* 1145: 204-212.

- Cordeiro KK, Jiang W, Papazoglou A, Tenório SB, Döbrössy M, Nikkhah G (2010) Graft-mediated functional recovery on a skilled forelimb use paradigm in a rodent model of Parkinson's disease is dependent on reward contingency. *Behav Brain Res* 212: 187-195.
- Cowan AI, Stricker LJ, Reece SJ, Redman (1998) Long-term plasticity at excitatory synapses on aspiny interneurons in area CA1 lacks synaptic specificity. *J Neurophysiol* 79: 13-20.
- Cuesto G, Enriquez-Barreto L, Caramés C, Cantarero M, Gasull X, Sandi C, Ferrús A, Acebes A, Morales M (2011) Phosphoinositide-3-kinase activation controls synaptogenesis and spinogenesis in hippocampal neurons. *J Neurosci* 31: 2721-33.
- Crupi R, Mazzon E, Marino A, La Spada G, Bramanti P, Spina E, Cuzzocrea S (2011) Melatonin's stimulatory effect on adult hippocampal neurogenesis in mice persists after ovariectomy. *J Pineal Res* 51: 353-60.
- Dabbeni-Sala F, Di Santo S, Franceschini D, Skaper SD, Giusti P (2001) Melatonin protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity in rats: a role for mitochondrial complex I activity. *FASEB J* 15: 164-170.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM (1999) The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain* 122: 1437-1448.
- Day M, Wang Z, Ding J, An X, Ingham C, Shering AF, Wokosin D, Ilijic E, Sun Z, Sampson AR, Mugnaini E, Deutch AY, Sesack SR, Arbuthnott GW, Surmeier DJ (2006) Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat Neurosci* 9: 251-259.
- De Lau LM, Verbaan D, Marinus J, Heutink P, Van Hilten JJ (2012) Catechol-O-methyltransferase Val158Met and the risk of dyskinesias in Parkinson's disease. *Mov Disord* 27: 132-135.
- Del-Bel E, Padovan-Neto FE, Szawka RE, da-Silva CA, Raisman-Vozari R, Anselmo-Franci J, Romano-Dutra AC, Guimaraes FS (2013) Counteraction by nitric oxide synthase inhibitor neurochemical alterations of dopaminergic system in 6-OHDA-lesioned rats under L-DOPA treatment. *Neurotox Res* 25: 33-44.
- 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.
- Deutch AY (2006) Striatal plasticity in parkinsonism: dystrophic changes in medium spiny neurons and progression in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 70: 67-70.
- Deutch AY, Colbran RJ, Winder DJ (2007) Striatal plasticity and medium spiny neuron dendritic remodeling in parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord* 13: S251-S258.
- Dexter D, Wells FR, Lees AJ, Agid Y, Jenner P, Marsden (1989) Increased nigral Iron content and alteration in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem* 52: 1830-1836.
- Dluzen DE, McDermott JL, Liu B (1996) Estrogen as a neuroprotectant against MPTP- 799 induced neurotoxicity in C57/B1 mice. *Neurotoxicol Teratol* 18: 603-606.

- Dodel RC, Berger K, Oertel WH (2001) Health-related quality of life and healthcare utilisation in patients with Parkinson's disease: impact of motor fluctuations and dyskinesias. *Pharmacoeconomics* 19: 1013-1038.
- Dowd E, Dunnett SB (2005) Comparison of 6-hydroxydopamine-induced medial forebrain bundle and nigrostriatal terminal lesions in a lateralised nose-poking task in rats. *Behav Brain Res* 159: 153-161.
- Ebadi M, Srinivasan SK, Baxi MD (1996) Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 48: 1-19.
- Ebadi M, Ronald F (2005) Parkinson's disease. CRC PRESS, USA pp.1050
- Escames G, Acuña-Castroviejo D, Vives F, (1996) Melatonin-dopamine interaction in the striatal projection area of sensorimotor cortex in the rat. *Neuroreport* 7: 597-600.
- Escames G, León J, López LC, Acuña-Castroviejo D (2004) Mechanisms of N-methyl-D-aspartate receptor inhibition by melatonin in the rat striatum. *J Neuroendocrinol* 16: 929-935.
- Evatt M, Musante ML, Weiner W, Pabst K, Dustin K, Scott B, Gauger L, Wojcieszek J, Belden J, Richard I, Deeley C, Tetrad J, Stewart T, Marshall F, Blicek E, Westerlund E, Lang L, Bausch J, Lindsay P, Irvine C, Factor S, Huang LS, Brown P (2011) A randomized pilot trial of estrogen replacement therapy in post-menopausal women with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 17: 757-60.
- Fabbrini G, Brotchie JM, Grandas F, Nomoto M, Goetz CG (2007) Levodopa-induced dyskinesias. *Mov Disord* 22: 1379-89.
- Fasano C, Bourque MJ, Lapointe G, Leo D, Thibault D, Haber M, Kortleven C, DesGroseillers L, Murai KK, Éric L (2013) Dopamine facilitates dendritic spine formation by cultured striatal medium spinyneurons through both D1 and D2 dopamine receptors. *Neuropharmacology* 67: 432-443.
- Feng Z, Zhang JT (2005) Long-term melatonin or 17 β -estradiol supplementation alleviates oxidative stress in ovariectomized adult rats. *Free Radic Biol Med* 39: 195 – 204
- Feng Z, Qin CY, Juan-Tian Z (2006) Early melatonin supplementation alleviates oxidative stress in transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 40: 101-109.
- Ferrandez AM, Blin O (1991) A comparison between the effect of intentional modulations and the action of L-Dopa on gait in Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 45: 177-83.
- Ferrario JE, Delfina MA, Stefano AV, Zbarsky V, Douhou A, Murer MG, Raciman-Vozari R, Gershanik OS (2003) Effects of orally administered levodopa on mesencephalic dopaminergic neurons undergoing a degenerative process. *Neurosci Res* 47: 431-6.
- Ferraz A, Leal XL, Hernandez S, Sulzbach M, Viola GG, Anselma-Franci JA, Achaval M, Cunha C (2003) Failure of estrogen to protect the substantia nigra pars compacta of female rats from lesion induced by 6-hydroxydopamine. *Brain Res* 986: 200-205.
- Ferrer VD, Jorge FC, Cutido CL, García RE, Arce G (1999). Radicales libres y su papel en la homeostasis neuronal. *Medisan* 3: 5-11.

- Flores-Martínez E. (2005). Diferencia entre géneros de un modelo de Parkinson en ratas provocado por 6-OHDA. Tesis de Maestría. Ciencias Biológicas. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.
- Florio T1, Capozzo A, Puglielli E, Pupillo R, Pizzuti G, Scarnati E (1999) The function of the pedunculo pontine nucleus in the preparation and execution of an externally-cued bar pressing task in the rat. *Behav Brain Res* 104:95-104.
- Folkard E, Dowsett M (2013). Sex hormones and breast cancer risk and prognosis. *Breast* 22: S38-43.
- Francardo V, Recchia A, Popovic N, Andersson D, Nissbrandt H, Cenci A (2011) Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 42: 327-340.
- Galvan Z (2000) Papel de la innervación dopaminérgica al globo pálido en la actividad motora en rata. Tesis Doctoral, Dpto. fisiología; Biofísica y Neurociencias CINVESTAV-IPN.
- Gatto NM, Deapen D, Stoyanoff S, Pinder R, Narayan S, Bordelon Y, Ritz B (2014) Lifetime exposure to estrogens and Parkinson's disease in California teachers. *Parkinsonism Relat Disord* S1353-8020..
- García-Ruiz R (2012) Efecto anti-discinético y anti-bradicinético de 141716A y capsacepina en ratas lesionadas con 6-OHDA tratadas con L-DOPA. Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias biológicas. Fes-Iztacala UNAM. México.
- García-Chávez D, Gonzalez-Burgos I, Letechipía-Vallejo G, López-Loeza E, Morali G, Cervantes M (2008) Long-term evaluation of cytoarchitectonic characteristics of prefrontal cortex pyramidal neurons, following global cerebral ischemia and neuroprotective melatonin treatment, in rats. *Neurosci Lett* 448: 148-152.
- García MJC (2003) La enfermedad de Parkinson vista por un afectado. *Revista de Neurología* 7: 391-400.
- García-Segura LM, Azcoitia I, Don Carlos LL (2001) Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63: 29-60.
- García-Segura LM, Arévalo MA, Azcoitia I (2010) Interactions of estradiol and insulin-like growth factor-I signaling in the nervous system: new advances. *Prog Brain Res* 181: 251-272.
- Gerfen CR, Staines WA, Arbuthnott G W, Fibiger HC (1982) Crossed connections of the substantia nigra in the rat. *J Comp Neurol* 207: 283–303.
- Gerfen CR (2006) Indirect-pathway neurons lose their spines in Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 9: 157-158.
- Gibb WRG, Less AJ (1991) Anatomy, pigmentation ventral and dorsal suboculations of the sustantia nigra and differential cell death in Parkinson´s disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 54: 388-396.
- Gilmans WNS (1994) Principios de neuroanatomía y neurofisiología clínica de Monter y Gats. El manual moderno S.A. de C.V. (3ed). México D.F. 183-192.

- Glinka Y, Tipton KF, Youdim MBH (1998) Mechanism of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-hydroxydopamine and its prevention by desferrioxamine. *Eur. J. Pharmacol* 35: 121-129.
- Gillies GE, Murray HE, Dexter D, McArthur S (2004) Sex dimorphisms in the neuroprotective effects of estrogen in an animal model of Parkinson's disease. *Pharmacol Biochem Behav* 78: 513-522.
- Gillies GE, Pienaar IS, Vohra S, Qamhawi Z (2014) Sex differences in Parkinson's disease. *Front Neuroendocrinol* 10:829-34.
- Góngora AJ, Moo PR, Villanueva TJ, Arankowsky SG, Álvarez CF, Pineda CJ, Heredia-LF, Bata G. (2005) La cafeína y los antagonistas de los receptores A2A de la adenosina como posibles adyuvantes de la terapia anticolinérgica en la enfermedad de Parkinson. *Rev Biomed* 16: 99-111.
- González F, Castellano B, Gonzales H (1999). Estrés oxidativo en las neurodegeneraciones. *Rev Neurol* 504-511.
- González-Burgos I, Letechipía-Vallejo G, López-Loeza E, Morali G, Cervantes M (2007) Long-term study of dendritic spines from hippocampal CA1 pyramidal cells, after neuroprotective melatonin treatment following global cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett* 423: 162-166.
- Greenberg ME, Xu B, Lu B, Hempstead BL (2009) New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J Neurosci* 29: 12764-12767.
- Gurutz L, Nadège VB (2005) Discinesias inducidas por levodopa en la enfermedad de Parkinson. *Ars Medica Madrid* 1-71 pp
- Gutiérrez-Valdez AL (2004) Efecto de la L-DOPA en el estriado y sustancia nigra de ratas lesionadas con 6-OHDA: modelo animal de la enfermedad de Parkinson. Tesis de licenciatura. FESI: UNAM. México.
- Gutiérrez-Valdez AL (2007) Comparación del efecto de diferentes fármacos en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson. Tesis de Maestría. Ciencias Biológicas. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.
- Gutiérrez-Valdez AL, Anaya-Martínez V, Ordoñez-Librado JL, García-Ruiz R, Torres-Esquivel C, Moreno-Rivera M, Sánchez-Betancourt J, Montiel-Flores E, Avila-Costa MR (2012a) Effect of chronic L-dopa or melatonin treatments after dopamine deafferentation in rats: dyskinesia, motor performance, and cytological analysis. *ISRN Neurology* 1-16.
- Gutiérrez-Valdez AL, Anaya-Martínez V, Avila-Costa MR (2012b) Efecto neuroprotector de la melatonina en la enfermedad de Parkinson. Estudio a nivel motor, citológico y bioquímico. Editorial Académica Española. pp 117.
- Haaxma CA, Bloem BR, Borm GF, Oyen WJ, Leenders KL, Eshuis S, Booij J, Dluzen DE, Horstink MW (2007) Gender differences in Parkinson's disease *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78: 819-24.
- Halpain S (2000) Actin and the agile spine: how and why do dendritic spines dance? *Trends Neurosci* 23: 141-146.

- Hansruedi B (2009) Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 218: 235-24.
- Hardeland R, Pandi-Perumal SR (2005) Melatonin a potent agent in antioxidative defense: Actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor drug and prodrug. *Nutr Metab (Lond)* 2: 1-15.
- Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP (2006) Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 313-316.
- Harms C, Lautenschlager M, Bergk A, Freyer D, Weih M, Dirnag IU, Weber JR, Hortnagl H (2000) Melatonin is protective in necrotic but not in caspase-dependent, free radical-independent apoptotic neuronal cell death in primary neuronal cultures. *FASEB J* 14: 1814-1824.
- Hattori N, Wang M, Taka H, Fujimura T, Yoritaka A, Kubo S, Mochizuki H (2009) Toxic effects of dopamine metabolism in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 15: S35-38.
- Helmchen F (2002) Raising the speed limit-fast Ca²⁺ handling in dendritic spines. *Trends Neurosci* 25: 438-441.
- Henderson JM, Watson S, Halliday GM, Heinemann T, Gerlach M (2003) Relationships between various behavioural abnormalities and nigrostriatal dopamine depletion in the unilateral 6-OHDA-lesioned rat. *Behav Brain Res* 139: 105-13.
- Hernández-Baltazar D, Mendoza-Garrido ME, Martinez-Fong D (2013) Activation of GSK-3 β and caspase-3 occurs in nigral dopamine neurons during the development of apoptosis activated by a striatal injection of 6-hydroxydopamine. *PLoS One* 8: e70951.
- Höglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC (2004) Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7: 726-735.
- Hornykiewicz O (1993) Parkinson's disease and the adaptive capacity of the nigrostriatal dopamine system: Possible neurochemical mechanisms. *Adv Neurol* 60: 140-147.
- Hornykiewicz O (2006) The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. *J Neural Transm Suppl* 9-15.
- Hudson JL, van Horne CG, Stromberg I, Brock S, Clayton J, Masserano J, Hoffer BJ, Gerhardt GA (1993) Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res* 626: 167-174.
- Imbesi M, Uz T, Manev H (2008) Role of melatonin receptors in the effects of melatonin on BDNF and neuroprotection in mouse cerebellar neurons. *J Neural Transm* 115: 1495-1499.
- Ingham CA, Hood SH, Taggart P, Arbuthnott GW (1998) Plasticity of synapses in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *J Neurosci* 18: 4732-4743.
- 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>.

- Itzhak Y, Martin JL, Black MD, Ali SF (1998) Effect of melatonin on methamphetamine- and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurotoxicity and methamphetamine-induced behavioral sensitization. *Neuropharmacology* 37: 781–791.
- Jankovic J (2008) Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79: 368-376.
- Jenner P (1995) The rationale for the use of dopaminergic agonists in Parkinson's disease. *Neurology* 45: S6-12.
- Jeon MY, Lee WY, Kang HY, Chung EJ (2007) The effects of L-3,4-dihydroxyphenylalanine and dopamine agonists on dopamine neurons in the progressive hemiparkinsonian rat models. *Neurol Res* 29: 289–295.
- Jiménez-Rubio G, Ortíz-López L, Benítez-King G (2012) Melatonin modulates cytoskeletal organization in the rat brain hippocampus. *Neurosci Lett* 511: 47- 51.
- Jin CM, Yang YJ, Huang HS, Jai M, Lee M. (2010) Mechanisms of L-DOPA-induced cytotoxicity in rat adrenal pheochromocytoma cells: implication of oxidative stress-related kinases and cyclic AMP. *Neuroscience* 170: 390-398.
- Jinnah H, Hess E (2004) Assessment of movement disorders in rodents. En: *Animal Models of movement disorders*. Academic Press EUA 824p.
- Johnson MT, Kipnis AN, Coltz JD, Gupta A, Silverstein P, Zwiebel F, Ebner TJ (1996) Effects of levodopa and viscosity on the velocity and accuracy of visually guided tracking in Parkinson's disease. *Brain* 119: 801-813.
- Jordán J, Cena V, Prehn JH (2003) Mitochondrial control of neuron death and its role in neurodegenerative disorders. *J Physiol Biochem* 59: 129-141.
- Khaldy H, Escames G, León J, Bikdaouene L, Acuña C (2003) Synergistic effects of melatonin and deprenyl against MPTP-induced mitochondrial damage and DA depletion. *Neurobiology Aging* 24: 491-500.
- Kilic E, Kilic U, Bacigaluppi M, Guo Z, Abdallah NB, Wolfer DP, Reiter RJ, Hermann DM, Bassetti CL (2008) Delayed melatonin administration promotes neuronal survival, neurogenesis and motor recovery, and attenuates hyperactivity and anxiety after mild focal cerebral ischemia in mice. *J Pineal Res* 45: 142-148.
- Kipp M, Karakaya S, Pawlak J, Araujo-Wright G, Arnold S, Beyer C (2006) Estrogen and the development and protection of nigrostriatal dopaminergic neurons: Concerted action of a multitude of signals, protective molecules, and growth factors. *Front Neuroendocrinol* 27: 376–390.
- Kiss JP, Viz S (2001) Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. *Trends Neurosci* 24: 211-215.
- Klein A, Metz GA, Papazoglou A, Nikkhah G (2007) Differential effects on forelimb grasping behavior induced by fetal dopaminergic grafts in hemiparkinsonian rats. *Neurobiol Dis* 27: 24-35.

- Kloth V, Klein A, Loettrich D, Nikkhah G (2006) Colour-coded pellets increase the sensitivity of the staircase test to differentiate skilled forelimb performances of control and 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res Bull* 70: 68-80.
- Kolesnikova EE, Serebrovskaya TV (2003) Parkinson's disease: Mechanisms of Neuronal Death. *Neurophysiology* 35: 54-66.
- Kompoliti K, Comella CL, Jaglin JA, Leurgans S, Raman R, Goetz CG (2000) Menstrual-related changes in motoric function in women with Parkinson's disease. *Neurology* 55: 1572-1575.
- Kong X, Li X, Cai Z, Yang N, Liu Y, Shu J, Pan L, Zuo P (2008) Melatonin regulates the viability and differentiation of rat midbrain neural stem cells. *Cell Mol Neurobiol* 28: 569-579.
- Korkotian E, Segal M (1999) Bidirectional regulation of dendritic spine dimensions by glutamate receptors. *Neuro Report* 10: 2875-2877.
- Kummar R, Agarwal AK, Seth PK (1995) Free radical generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine. *J. Neurochem* 64: 1703-1707.
- Kundurovic Z, Sofic E (2006) The Effects of Exogenous Melatonin on the Morphology of Thyrocytes in Pinealectomized and Irradiated Rats. *J Neural Transm* 113: 49-58.
- Lane EL, Dunnett SB (2010) Pre-treatment with dopamine agonists influence L-dopa mediated rotations without affecting abnormal involuntary movements in the 6-OHDA lesioned rat. *Behav Brain Res* 213: 66-72.
- Lee CS, Cenci MA, Schulzer M, Björklund A (2000) Embryonic ventral mesencephalic grafts improve levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Brain* 123: 1365-1379.
- Lees AJ, Hardy J, Revesz T (2009) Parkinson's disease. *Lancet* 373: 2055-2066.
- León J, Acuña-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, Reiter RJ (2004) Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci* 75: 765-790.
- León J, Acuña-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ (2005) Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J. Pineal Res* 38: 1-9.
- Leranth C, Roth RH, Elsworth JD, Naftolin F, Horvath TL, Redmond DE Jr. (2000) Estrogen is essential for maintaining nigrostriatal dopamine neurons in primates: implications for Parkinson's disease and memory. *J. Neurosci* 20: 8604-8609.
- Lezcano LB, Lorigados PD, Fernández V, Serrano ST, Pavón FN, Turner LF (2009) Convenience of the traversal beam test modified to evaluate the model of Parkinson's disease in rat lesioned in SNPC. *JCAB* 3: 145-151.
- Lezcano LB, Lorigados PD, Fernández V, Serrano ST, Pavón FN, Turner LF (2010) Aplicación del test de la barra transversal modificado para evaluar ratas hemiparkinsonizadas. *Acta biol. Colomb* 15: 189-202.

- Linazasoro G (2005) New ideas on the origin of L-dopa-induced dyskinesias: age, genes and neural plasticity. *Trends Pharmacol Sci* 26: 391-397.
- Linazasoro G, Antonini A, Maguire RP, Leenders KL (2004) Pharmacological and PET studies in patient's with Parkinson's disease and a short duration-motor response: implications in the pathophysiology of motor complications. *J Neural Transm* 111: 497-509.
- Lindgren HS, Rylander D, Ohlin KE, Lundblad M, Cenci MA (2007) The "motor complication syndrome" in rats with 6-OHDA lesions treated chronically with L-DOPA: relation to dose and route of administration. *Behav Brain Res* 177:150-9.
- Lindgren HS, Ohlin KE, Cenci MA (2009) Differential involvement of D1 and D2 dopamine receptors in L-DOPA-induced angiogenic activity in a rat model of Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacology* 34: 2477-2488.
- Lopera F, Sánchez F (1999) Estrógenos, envejecimiento y enfermedad de Alzheimer. *IATREIA* 12: 120-129.
- Lotharius J, Dugal LL, O'Malley KL (1999) Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *J Neurosci* 19: 1284-1293.
- Loughlin S, Fallon JH (1982) Mesostriatal projections from ventral tementum and dorsal paphe: cells project ipsilaterally or contralaterally but not bilaterally. *Neurosci Lett* 32:11-16.
- Lubomski M, Louise RR, Lee W, Bertram KL, Williams DR (2014) Sex differences in Parkinson's disease. *J Clin Neurosci* 21: 1503-1506.
- Lundblad M, Andersson M, Winkler C, Kirik D, Wierup N Cenci MA (2002) Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 15: 120-132.
- Luquin MR, Scipioni O, Vaamonde J, Gershanik O, Obeso JA (1992) "Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: clinical and pharmacological classification." *Mov Disord* 7: 117-124.
- Lyons KE, Hubble JP, Tröster AI, Pahwa R, Koller WC (1998) Gender differences in Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol* 21: 118-21.
- Ma J, Shawc VE, Mitrofanis J (2009) Does melatonin help save dopaminergic cells in MPTP-treated mice? *Parkinsonism Relat Disord* 15: 307-314.
- Ma Y, Zhan M, OuYang L, Li Y, Chen S, Wu J, Chen J, Luo C, Lei W (2014) The effects of unilateral 6-OHDA lesion in medial forebrain bundle on the motor, cognitive dysfunctions and vulnerability of different striatal interneuron types in rats. *Behav Brain Res* 266:37-45.
- Madete JK, Klein A, Fuller A, Trueman RC, Rosser AE, Dunnett SB, Holt CA (2010) Challenges facing quantification of rat locomotion along beams of varying widths. *Proc Inst Mech Eng H* 224: 1257-65.
- Madete JK, Klein A, Dunnett SB, Holt CA (2011) Three-dimensional motion analysis of postural adjustments during over-ground locomotion in a rat model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 220: 119-125.

- Maharaj H, Maharaj DS, Scheepers M, Mokokong R, Daya S (2005) L-DOPA administration enhances 6-hydroxydopamine generation. *Brain Res* 1063: 180-186.
- Maharaj S, Maharaj H, Daya S, Glass D (2006) Melatonin and 6-hydroxymelatonin protect against iron-induced neurotoxicity. *J Neurochem* 96: 78-81.
- Maharaj DS, Glass BA, Daya SG (2007) Melatonin: new places in therapy. *Biosci Rep* 27: 299–320
- Marin C, Aguilar E, Mengod G, Cortés R, Obeso JA (2009) Effects of early vs. late initiation of levodopa treatment in hemiparkinsonian rats. *Eur J Neurosci* 30: 823-832.
- Martinelli P, Contin M, Scaglione C, Riva R, Albani F, Baruzzi A (2003) Levodopa pharmacokinetics and dyskinesias: are there sex-related differences? *Neurol Sci* 24: 192-3.
- Martinez-Martin P (2004) Clinical gait and balance scales for Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 221: 122-125.
- Mayo JC, Sainz RM, Uría H, Antolín I, Estéban MM, Rodríguez C (1998a) Inhibition of cell proliferation: a mechanism likely to mediate the prevention of neuronal cell death by melatonin. *J Pineal Res* 24: 179-92.
- Mayo JC, Sainz RM, Uría H, Antolín I, Estéban MM, Rodríguez C (1998b) Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease. *J Pineal Res* 25:12-8.
- Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Rodriguez C (2002) Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci* 59: 1706-1713.
- McArthur S, Murray HE, Dhankot A, Dexter DT, Gillies GE (2007) Striatal susceptibility to a dopaminergic neurotoxin is independent of sex hormone effects on cell survival and DAT expression but is exacerbated by central aromatase inhibition. *J. Neurochem* 100: 678-692.
- McMillan CR, Rohita S, Ottenhof T, Niles LP (2007) Modulation of tyrosine hydroxylase expression by melatonin in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurosci Lett* 419: 202-6.
- Melvin KG, Doan J, Pellis SM, Brown L, Whishaw IQ, Suchowersky O (2005) Pallidal deep brain stimulation and L-dopa do not improve qualitative aspects of skilled reaching in Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 160: 188-194.
- Mena-Segovia J, Bolam JP, Magill PJ (2008) Pedunculopontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same family? *Trends Neurosci* 27:585-8.
- Meshul CK, Emre N, Nakamura CM, Allen C, Donohue MC, Buckman JF (1999) Time dependent changes in striatal glutamate synapses following a 6-hydroxydopamine lesion. *Neuroscience* 88: 1-16.
- Metman LV, Konitsiotis S, Chase TN (2000) Pathophysiology of motor response complications in Parkinson's disease: hypotheses on the why, where, and what. *Mov Disord* 15: 3-8.

- Metz GA, Farr T, Ballermann M, Whishaw IQ (2001) Chronic levodopa therapy does not improve skilled reach accuracy or reach range on a pasta matrix reaching task in 6-OHDA dopamine-depleted (hemi-Parkinson analogue) rats. *Eur J Neurosci* 14: 27-37.
- Michel PP, Hefti F (1990) Toxicity of 6-hydroxydopamine and levodopa for dopaminergic neurons in vitro. *J. Neurosci Res* 26: 428-435.
- Miglioriore L, Petrozzi L, Lucetti C, Gambaccini G, Bernardini S, Scarpato R, Trippi F, Barale R, Frenzilli G, Rodilla V, Bonuccelli U (2002) Oxidative damage and cytogenetic analysis in leukocytes of Parkinson's disease patients. *Neurology* 58: 1809-15.
- Miklyaeva EI, Martens DJ, Whishaw IQ (1995) Impairments and compensatory adjustments in spontaneous movement after unilateral dopamine depletion in rats. *Brain Res* 681:23-40.
- Montoya CP, Campbell-Hope LJ, Pemberton KD, Dunnett SB (1991) The "staircase test": a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *J Neurosci Methods* 36: 219-228.
- Moore AE, Cicchetti F, Hennen J, Isacson O (2001) Parkinsonian motor deficits are reflected by proportional A9/A10 dopamine neuron degeneration in the rat. *Exp Neurol* 172:363-376.
- Morgan S, Huston JP (1990) The interhemispheric projection from the substantia nigra to the caudate-putamen as depicted by the anterograde transport of [3H]leucine. *Behav. Brain Res.* 38: 155–162.
- Morgana WW, Nelsonb JF (2001) Chronic administration of pharmacological levels of melatonin does not ameliorate the MPTP-induced degeneration of the nigrostriatal pathway. *Brain Res* 921: 115–121.
- Morale MC, Serra PA, L'episcopo F, Tirola C, Caniglia S, Testa N, Gennuso F, Giaquinta G, Rocchitta G, Desole MS, Miele E, Marchetti B (2006) Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration. *Neuroscience* 138: 869-878.
- Moriya T, Horie N, Mitome M, Shinohara K (2007) Melatonin influences the proliferative and differentiative activity of neural stem cells. *J. Pineal Res* 42: 411-418.
- Mouradian MM, Heuser IJ, Baronti F, Fabbrini G, Juncos JL, Chase TN (1989) Pathogenesis of dyskinesias in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 25: 523-526.
- Müller T, Heftner H, Hueber R, Jost WH, Leenders KL, Odin P, Schwarz J (2004) Is levodopa toxic? *J Neurol* 251: 44-6.
- Murray HE, Pillai AV, McArthur SR, Razvi N, Datla KP, Dexter DT, Gillies GE (2003) Dose- and sex-dependent effects of the neurotoxin 6-hydroxydopamine on the nigrostriatal dopaminergic pathway of adult rats: differential actions of estrogen in males and females. *Neuroscience* 116: 213-222.
- Mytilineou C, Han SK, Cohen G (1993) Toxic and protective effects of L-dopa on mesencephalic cell cultures. *J. Neurochem* 61: 1470-1478.

- Naskar A, Manivasagam T, Chakraborty J, Singh S, Thomas B, Dhanasekaran M, Mohanakumar K (2013) Melatonin synergizes with low doses of L-DOPA to improve dendritic spine density in the mouse striatum in experimental Parkinsonism. *J Pineal Res* 55:304-12.
- O'Sullivan JD, Said CM, Dillon LC, Hoffman M, Hughes AJ (1998) Gait analysis in patients with Parkinson's disease and motor fluctuations: influence of levodopa and comparison with other measures of motor function. *Mov Disord* 13: 900-906.
- Obeso JA, Rodríguez OM, Zamarbide I (1995) Enfermedades Neurodegenerativas. Cap. 6 Clínica Universitaria y Facultad de Medicina.
- Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Chana P, Lera G, Rodríguez M, Olanow CW (2000) The evolution and origin of motor complications in Parkinson's disease. *Neurology* 55: S13-20.
- Ohtani H, Nomoto M, Douchi T (2001) Chronic estrogen treatment replaces striatal dopaminergic function in ovariectomized rats. *Brain Res* 900: 65-72.
- Ookubo M, Yokoyama H, Takagi S, Kato H, Araki T (2008) Effects of estrogens on striatal damage after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity in male and female mice. *Mol Cell Endocrinol* 296: 87-93.
- Otero-Siliceo E (1996) Parkinson enfoque al futuro. Fondo de Cultura Económica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Cap. I,II, IV, VIII, XIV.
- Padovan-Neto FE, Echeverry MB, Tumas V, Del-Bel EA (2009) Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 159: 927-935.
- Padovan-Neto FE, Echeverry MB, Chiavegatto S, Del-Bel E (2011). Nitric oxide synthase inhibitor improves de novo and long-term L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian rats. *Front Syst Neurosci* 5:40.
- Pardo B, Mena MA, Yebenes JG (1995a) L-dopa inhibits complex IV of the electron transport chain in catecholamine-rich human neuroblastoma NB69 cells. *J. Neurochem* 64: 576-582.
- Pardo B, Mena MA, Casarejos MJ, Paino CL, De Yebenes JG (1995b) Toxic effects of L-DOPA on mesencephalic cell cultures: protection with antioxidants. *Brain Res* 682: 133-143.
- Park KH, Choi NY, Koh SH, Park HH, Kim YS, Kim MJ, Lee SJ, Yu HJ, Lee KY, Lee YJ, Kim HT (2011) L-DOPA neurotoxicity is prevented by neuroprotective effects of erythropoietin. *Neurotoxicology* 32: 879-887
- Patki G, Lau YS (2011) Melatonin protects against neurobehavioral and mitochondrial deficits in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *Pharmacol Biochem Behav* 99: 704-11.
- Pavon JM, Whitson HE, Okund MS (2010) Parkinson's disease in women: A call for improved clinical studies and for comparative effectiveness research. *Maturitas* 65: 352-358.
- Paxinos G and Watson C. (1986). The rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd edition. Academic Press, New York.

- Petri ES, Ajao MS, Olaleye O, Inunwo AO (2011) Effect of melatonin on neuronal nitric oxide synthase expressing cell in the brain following global cerebral Ischemia. *J Anim Vet Adv* 10: 395-400.
- Picconi B, Centonze D, Hakansson K, Bernardi G, Greengard P, Fisone G, Cenci MA, Calabresi P (2003) Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Neurosci* 6: 501-506.
- POETRY Investigators (2011) Randomized pilot trial of estrogen replacement therapy in post-menopausal women with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 17: 757-760.
- Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero GM (1997) Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J Cell Biochem* 65: 430-42.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Muthane U, Jiang H, Ferreira M, Naini AB, Fahn S (1993) Chronic levodopa administration alters cerebral mitochondrial respiratory chain activity. *Ann. Neurol* 34: 715-723
- Putterman DB, Munhall AC, Kozell LB, Belknap JK, Johnson SW (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: 277-284.
- Quesada A, Micevych PE (2004) Estrogen interacts with the IGF-1 system to protect nigrostriatal dopamine and maintain motoric behavior after 6-hydroxydopamine lesions. *J Neurosci Res* 75: 107-116.
- Quesada A, Lee BY, Micevych PE (2008) PI3 kinase/Akt activation mediates estrogen and IGF-1 nigral DA neuronal neuroprotection against a unilateral rat model of Parkinson's disease. *Dev Neurobiol* 68: 632-44.
- Quinn NP, Marsden DC (1986) Menstrual related fluctuations in Parkinson's Disease. *Mov Disord* 1: 85-7.
- Ragonese P, D'Amelio M, Salemi G, Aridon P, Gammino M, Epifanio A, Morgante L, Savettieri G (2004) Risk of Parkinson disease in women: effect of reproductive characteristics. *Neurology* 62: 2010-4.
- Rajput AH, Fenton ME, Birdi S, Macaulay R, George D, Rozdilsky B, Ang LC, Senthilselvan A, Hornykiewicz O (2002) Clinical-pathological study of levodopa complications. *Mov Disord* 17: 289-296.
- Rajput MI, Rajput A, Rajput AH (2004) Gender differences in Parkinson's disease presentation in a movement disorder clinic. *Mov Disord* 19: 1118-34.
- Ramírez AD, Liu X, Menniti FS (2003) Repeated estradiol treatment prevents MPTP-induced dopamine depletion in male mice. *Neuroendocrinology* 77: 223-231.

- Ramírez-Rodríguez G, Klempin F, Babu H, Benítez-King G, Kempermann G (2009) Melatonin modulates cell survival of new neurons in the hippocampus of adult mice. *Neuropsychopharmacology* 34: 2180-2191.
- Reiter RJ (2000a) Melatonin: Lowering the high price of free radicals. *News Physiol Sci* 15: 246-250.
- Reiter RJ, Tan DX, Acuña-Castroviejo D, Burkhardt S, Karbownik M (2000b) Melatonin: mechanism and actions as an antioxidants. *Curr Top Biophys* 24: 171-183.
- Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z (2003) Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanism and pathophysiological implications in human. *Acta Biochim Pol* 50: 1129-1146.
- Reiter RJ, Paredes SD, Korkmaz A, Jou M, Tan D (2008) Melatonin combats molecular terrorism at the mitochondrial level. *Interdisc Toxicol* 1: 137-149.
- Reiter RJ, Benitez-King G, (2009) Melatonin reduces neuronal loss and cytoskeletal deterioration: implications for psychiatry. *Salud Mental* 32:3-11.
- Rennie K, De Butte M, Pappas B, (2009) Melatonin promotes neurogenesis in dentate gyrus in the pinealectomized rat. *J Pineal Res* 47: 313-317.
- Rennie K, de Butte M, Fréchette M, Pappas BA (2008) Chronic and acute melatonin effects in gerbil global forebrain ischemia: long-term neural and behavioral outcome. *J Pineal Res* 44:149–156.
- Rocchitta G, Migheli R, Esposito G, Marchetti B, Desole MS, Miele E, Serra PA (2006) Endogenous melatonin protects L-DOPA from autoxidation in the striatal extracellular compartment of the freely moving rat: potential implication for long-term L-DOPA therapy in Parkinson's disease. *J Pineal Res* 40: 204-13.
- Rubin SM (2007) Parkinson's disease in women. *Dis Mon* 53: 206-213.
- Rylander D, Recchia A, Mela F, Dekundy A, Danysz W, Cenci MA (2009) Pharmacological modulation of glutamate transmission in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia: effects on motor behavior and striatal nuclear signaling. *J Pharmacol Exp* 330: 227-35.
- Sabens EA, Distler AM, Mieyal JJ (2010) Levodopa deactivates enzymes that regulate thiol-disulfide homeostasis and promotes neuronal cell death: implications for therapy of Parkinson's disease. *Biochemistry* 49: 2715-2724.
- Sacrey LR, Travis SG, Whishaw iQ (2011) Drug treatment and familiar music aids an attention shift from vision to somatosensation in Parkinson's disease on the reach-to-eat task. *Behav Brain Res* 217: 391-398.
- Sanchez A.M., Flamini M.I., Fu X.D., Mannella P., Giretti M.S., Goglia L., Genazzani A.R. and Simoncini T. (2009). Rapid signaling of estrogen to WAVE1 and moesin controls neuronal spine formation via the actin cytoskeleton. *Mol Endocrinol*; 23: 1193-1202.
- Sánchez MG, Bourque M, Morissette M, Di Paolo T (2010) Steroids-Dopamine Interactions in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neurosci Ther* 16: e43–71.

- Sarkaki A, Badavi M, Hoseiny N, Gharibnaseri MK, Rahim F (2008) Postmenopausal effects of intrastratial estrogen on catalepsy and pallidal electroencephalogram in an animal model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 154: 940-945.
- Saunders PR (2003) Estrogens and Parkinson Disease. *Endocrine* 21: 81-87.
- Savit JM, Dawson VL, Ted MD (2006) Diagnosis and Treatment of Parkinsons disease: molecules to medicine. *J Clin Invest* 116: 1744-1754.
- Sawada H, Iby M, Kihara T, Urushitani M, Akaike A, Shimohama S (1998) Estradiol protects mesencephalic dopaminergic neurons from oxidative stress-induced neuronal death. *J Neurosci Res* 54: 707-719.
- Sawada H, Shimohama S (2000) Neuroprotective effects of estradiol in mesencephalic dopaminergic neurons. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 143-147.
- Schuster S, Doudnikoff E, Rylander D, Berthet A, Aubert I, Ittrich C, Bloch B, Cenci MA, Surmeier DJ, Hengerer B, Bezard E (2009) Antagonizing L-type Ca²⁺ channel reduces development of abnormal involuntary movement in the rat model of L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *Biol Psychiatry* 65: 518-526.
- Schwarting RK, Huston JP (1996) The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol* 50: 275-331.
- Scott B, Borgman A, Engler H, Johnels B, Aquilonius SM (2000) Gender differences in Parkinson's disease symptom profile. *Acta Neurol Scand* 102: 37-43.
- Segal M (1995) Dendritic spines for neuroprotection: a hypothesis. *Trends Neurosci* 18: 468-441.
- Segal M, Korkotian E, Murphy DD (2000) Dendritic spine formation and pruning: common cellular mechanisms? *Trends Neurosci* 23: 53-57.
- Shastri BS (2003) Neurodegenerative disorders of protein aggregation. *Neurochem Int* 43: 1-7.
- Stott SR, Barker RA (2014) Time course of dopamine neuron loss and glial response in the 6-OHDA striatal mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 39: 1042-56.
- Singh S, Ahmed R, Sagar RK, Krishana B (2006) Neuroprotection of the nigrostriatal dopaminergic neurons by melatonin in hemiparkinsonium rat. *Indian J Med Res* 124: 419-426.
- Smith K, Dahodwala N (2014) Sex differences in Parkinson's disease and other movement disorders. *Exp Neurol* 259: 44-56.
- Smith GA, Heuer A, Dunnett SB, Lane EL (2012) Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice II: predicting L-DOPA-induced dyskinesia. *Behav Brain Res* 226: 281-92.
- Smith Y, Villalba R (2008) Striatal and Extrastriatal Dopamine in the Basal Ganglia: An Overview of its Anatomical Organization in Normal and Parkinsonian Brains. *Mov Disord* 23: S534-S547.

- Smith Y, Villalba R, Raju DV (2009) Striatal spine plasticity in Parkinson's disease: pathological or not? *Parkinsonism Relat Disord* 15: S156-61.
- Smith K, Metz A (2005) Dietary restriction alters motor function in rats. *Physiol Behav* 85: 581-592
- Soderstrom KE, O'Malley JA, Levine ND, Sortwell CE, Collier TJ, Steece-Collier K (2010) Impact of dendritic spine preservation in medium spiny neurons on dopamine graft efficacy and the expression of dyskinesias in parkinsonian rats. *Eur J Neurosci* 31: 478-490.
- Sofic E, Rimpapa Z, Kundurovic Z, Sapcanin A, Tahirovic I, Rustembegovic A, Cao G (2005) Antioxidant capacity of the neurohormone melatonin. *J Neural Transm* 112: 349-58.
- Sohrabji F, Miranda RC, Toran-Allerand CD (1995) Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11110-11114.
- Sohrabji F, Lewis D (2006) Estrogen–BDNF interactions: Implications for neurodegenerative diseases. *Front Neuroendocrinol* 27: 404-414.
- Solla P, Cannas A, Ibba FC, Loi F, Corona M, Orofino G, Marrosu MG, Marrosu F (2012) Gender differences in motor and non-motor symptoms among Sardinian patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 323: 33-39.
- Spinnewyn B, Charnet C, Cornet S, Roubert V, Chabrier PE, Auguet M (2011) An improved model to investigate the efficacy of antidyskinetic agents in hemiparkinsonian rats. *Fundam Clin Pharmacol* 25: 608-618.
- Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Maestroni GJM, Esquifino AI, Hardeland R, Cardinalif DP (2005) Role of melatonin in neurodegenerative diseases. *Neurotox Res* 7: 293-318.
- Srivastava P, Woolfrey KM, Evans PD (2013) Mechanisms underlying the interactions between rapid estrogenic and BDNF control of synaptic connectivity. *Neuroscience* 239: 17-33.
- Stein JF (2009) Akinesia, motor oscillations and the pedunculopontine nucleus in rats and men. *Exp Neurol* 215:1-4.
- Stephens B, Mueller AJ, Shering AF, Hood SH, Taggart P, Arbuthnott GW, Bell JE, Kilford L, Kingsbury AE, Daniel SE, Ingham CA (2005) Evidence of a breakdown of corticostriatal connections in Parkinson's disease. *Neuroscience* 132: 741-754.
- Stival A, Chiappini E, Montagnani C, Orlandini E, Buzzoni C, Galli L, de Martino M (2014) Sexual dimorphism in tuberculosis incidence: children cases compared to adult cases in Tuscany from 1997 to 2011. *PLoS One* 25:e105277.
- Stott RW, Barker AR (2014) Time course of dopamine neuron loss and glial response in the 6-OHDA striatal mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 39: 1042-1056.
- Strome EM, Cepeda IL, Sossi V, Doudet D (2006) Evaluation of the integrity of the dopamine system in a rodent model of Parkinson's disease: small animal positron emission tomography compared to behavioral assessment and autoradiography. *Mol Imaging Biol* 8: 292-299.

- Svenningsson P, Gunne L, Andren PE (2000) L-DOPA produces strong induction of c-fos messenger RNA in dopamine-denervated cortical and striatal areas of the common marmoset. *Neuroscience* 99: 457-68.
- Tai SH, Hung YC, Lee EJ, Lee AC, Chen TY, Shen CC, Chen HY, Lee MY, Huang SY, Wu TS (2011) Melatonin protects against transient focal cerebral Ischemia in both reproductively active and estrogen-deficient female rats: the impact of circulating estrogen on its hormetic dose-response. *J. Pineal Res* 50: 292-303.
- Takuma K, Tanaka T, Takahashi T, Hiramatsu N, Ota Y, Ago Y, Matsuda T (2012) Neuronal nitric oxide synthase inhibition attenuates the development of L-DOPA-induced dyskinesia in hemi-Parkinsonian rats. *Eur J Pharmacol* 683: 166-173.
- Tamás A, Lubics A, Lengvari I, Reglodi D (2006) Effects of age, gender, and gonadectomy on neurochemistry and behavior in animal models of Parkinson's disease. *Endocrine* 29: 275–288
- Tenhunen J (1996) Characterization of the rat catechol-O-methyltransferase gene proximal promoter: Identification of a nuclear protein-DNA interaction that contributes to the tissue-specific regulation. *DNA Cell Biol* 15: 461-473.
- Thiele SL, Warre R, Khademullah CS, Fahana N, Lo C, Lam D, Talwar S, Johnston TH, Brotchie JM, Nash JE (2011) Generation of a model of L-DOPA-induced dyskinesia in two different mouse strains. *J Neurosci Methods* 197: 193-208.
- Tolosa E, Wenning G, Poewe W (2006) The diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5: 75-86.
- Tomás-Zapico C, and Coto-Montes A (2005) A proposed mechanism to explain the stimulation effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J. Pineal Res* 39: 99-104.
- Torres-Esquivel M (2012) Efecto funcional y sobrevivencia neuronal en la SNc por la coadministración de L-Dopa/Melatonina en ratas lesionadas con 6-OHDA. Tesis para obtener el título de biólogo. FES, Iztacala, UNAM.
- Truong L, Allbutt H, Kassiou M, Henderson JM (2006) Developing a preclinical model of Parkinson's disease: a study of behaviour in rats with graded 6-OHDA lesions. *Behav Brain Res* 169: 1-9.
- Tsang K, Ho S, Lo S (2000) Estrogen improves motor disability in parkinsonian postmenopausal women with motor fluctuations. *Neurology* 54: 2292-2298.
- Turgut O, Ay AA, Turgut H, Ay A, Kafkas S, Dost T (2013) Effects of melatonin and dexpanthenol on antioxidant parameters when combined with estrogen treatment in ovariectomized rats. *Age (Dordr)* 35:2229-35.
- Ulusoy A, Gurdal S, Kirik D (2010). Presynaptic dopaminergic compartment determines the susceptibility to L-DOPA-induced dyskinesia in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 13159-13164.
- Ungerstedt U (1968) 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 5:107-110.

- Ungerstedt U, Arbuthnott GF (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 24:485-493
- Ungerstedt U (1971) Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl* 367: 69-93.
- Urakawa S, Hida H, Masuda T, Misumi S, Kim T, Nishino H (2007) Environmental enrichment brings a beneficial effect on beam walking and enhances the migration of doublecortin-positive cells following striatal lesions in rats. *Neuroscience* 144: 920-933.
- Valastro B, Dekundy A, Danysz W, Quack G (2009) Oral creatine supplementation attenuates L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Behav Brain Res* 197: 90-6.
- Van-Kampen JM, Eckman CB (2006) Dopamine D3 receptor agonist delivery to a model of Parkinson's disease restores the nigrostriatal pathway and improves locomotor behavior. *J Neurosci* 26:7272-80.
- Venero AL, Absi E, Cano J, Machado A (2002) Melatonin induces tyrosine hydroxylase mRNA expression in the ventral mesencephalon but not in the hypothalamus. *J Pineal Res* 32:6-14.
- Villalba RM, Lee H, Smith Y (2009) Dopaminergic denervation and spine loss in the striatum of MPTP treated monkeys. *Exp Neurol* 215: 220-227.
- Walkinshaw G, Waters CM (1995) Induction of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-DOPA, implications for the treatment of Parkinson's disease. *J Clin Invest* 95: 2458-2464.
- Warraich ST, Allbutt HN, Billing R, Radford J, Coster MJ, Kassiou M, Henderson JM (2009) Evaluation of behavioural effects of a selective NMDA NR1A/2B receptor antagonist in the unilateral 6-OHDA lesion rat model. *Brain Res Bull* 78: 85-90.
- Whishaw IQ, O'Connor WT, Dunnett SB (1986) The contributions of motor cortex, nigrostriatal dopamine and caudate-putamen to skilled forelimb use in the rat. *Brain* 109: 805-843.
- Whishaw IQ, Woodward NC, Miklyaeva E, Pellis SM (1997) Analysis of limb use by control rats and unilateral DA-depleted rats in the Montoya staircase test: movements, impairments and compensatory strategies. *Behav Brain Res* 89:167-177.
- Whishaw IQ, Suchowersky O, Davis L, Sarna J, Metz GA, Pellis SM (2002) Impairment of pronation, supination, and body co-ordination in reach-to-grasp tasks in human Parkinson's disease (PD) reveals homology to deficits in animal models. *Behav Brain Res* 2: 165-176.
- Winkler C, Kirik D, Bjorklund A, Cenci A (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: 165-186.
- Wolters CH, Tissing G, Bergmans LM, Kuiper M (1995) Dopamine agonist in Parkinson's disease. *Neurology* 3: S28-34.
- Wooten FG (1990) Biochemical basis for levodopa therapy. En: *Therapy of Parkinson's disease*. Koller, W.C; Paulson, G; Dekker, M. (eds) N.Y. an Basel. 161-167.

- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270: 1326-31.
- Xie-Tao, Shu-leong H, Ramsden D (1999) Characterization and implications of estrogenic down-regulation of human catechol-O-methyltransferase gene transcription. *Mol Pharmacol* 56:31-38.
- Yang J, Sadler T R, Givrad T K, Maarek J M, Holschneider DP (2007) Changes in brain functional activation during resting and locomotor states after unilateral nigrostriatal damage in rats. *Neuroimage* 36: 755–773.
- Yang LC, Zhang QG, Zhou CF, Yang F, Zhang YD, Wang RM, Brann DW (2010) Extranuclear estrogen receptors mediate the neuroprotective effects of estrogen in the rat hippocampus. *PLoS One* 5:e9851
- Yap YW, Matthew W, Cheung N (2007) Chlorinative stress: An under appreciated mediator of neurodegeneration? *Cell Signal* 192: 219-228.
- Yadav R, Shukla G, Goyal V, Singh S, Behari M (2012) A case control study of women with Parkinson's disease and their fertility characteristics. *J Neurol Sci* 319: 135-8.
- Yurek DM, Sladek JR (1990) Dopamine cell replacement: Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 13: 415-440.
- Zaja-Milatovic S, Milatovic D, Schantz AM, Zhang J, Montine KS, Samii A, Deutch AY, Montine TJ (2005) Dendritic degeneration in neostriatal medium spiny neurons in Parkinson's disease. *Neurology* 64: 545-547.
- Zappia M, Crescibene L, Arabia G, Nicoletti G, Bagalà A, Bastone L, Caracciolo M, Bonavita S, Di Costanzo A, Scornaienchi M, Gambardella A, Quattrone A (2002) Body weight Influences pharmacokinetics of levodopa in Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol* 2: 79-82.

The combination of oral L-DOPA/rimonabant for effective dyskinesia treatment and cytological preservation in a rat model of Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia

Ana L. Gutiérrez-Valdez, Ricardo García-Ruiz, Verónica Anaya-Martínez, Carmen Torres-Esquivel, Jesús Espinosa-Villanueva, Leonardo Reynoso-Erazo, Rocio Tron-Alvarez, Patricia Aley-Medina, Javier Sánchez-Betancourt, Enrique Montiel-Flores and María R. Avila-Costa

Parkinson's disease is the second most prevalent neurodegenerative disease in the world. Its treatment is limited so far to the management of parkinsonian symptoms with L-DOPA (LD). The long-term use of LD is limited by the development of L-DOPA-induced dyskinesias and dystonia. However, recent studies have suggested that pharmacological targeting of the endocannabinoid system may potentially provide a valuable therapeutic tool to suppress these motor alterations. In the present study, we have explored the behavioral (L-DOPA-induced dyskinesias severity) and cytological (substantia nigra compacta neurons and striatum neuropil preservation) effects of the oral coadministration of LD and rimonabant, a selective antagonist of CB1 receptors, in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. Oral coadministration of LD (30 mg/kg) and rimonabant (1 mg/kg) significantly decreased abnormal involuntary movements and dystonia, possibly through the conservation of some functional tyrosine hydroxylase-

immunoreactive dopaminergic cells, which in turn translates into a well-preserved neuropil of a less denervated striatum. Our results provide anatomical evidence that long-term coadministration of LD with cannabinoid antagonist-based therapy may not only alleviate specific motor symptoms but also delay/arrest the degeneration of striatal and substantia nigra compacta cells. *Behavioural Pharmacology* 24:640-652 © 2013 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Behavioural Pharmacology 2013, 24:640-652

Keywords: CB1, dyskinesia, endocannabinoid system antagonist, L-DOPA, Parkinson's disease experimental model, rat, ultrastructure

Neuromorphology Laboratory, Neuroscience Department, FES Iztacala, National University of Mexico (UNAM), Tlalnepantla, Mexico

Correspondence to: María R. Avila-Costa, PhD, Neuromorphology Laboratory, Neuroscience Department, FES Iztacala, National University of Mexico (UNAM), Av. de los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. Mex. 54090, Mexico
E-mails: niraizo@unam.mx, mariarosa@avila-costa-com

Received 5 August 2012 Accepted as revised 17 September 2013

Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder of unknown etiology whose main histopathological characteristic is the loss of dopaminergic (DAergic) neurons of the substantia nigra compacta (SNc) (Damier *et al.*, 1999; Halliday *et al.*, 2011) and subsequent changes in morphological features such as dendritic spine loss on striatal medium spiny neurons (MSNs) (Zaja-Milatovic *et al.*, 2005) and ultrastructural presynaptic and postsynaptic changes such as an increase in the size of synaptic boutons in the striatal neuropil (Machado-Salas *et al.*, 1990; Avila-Costa *et al.*, 1998; Colín-Barenque *et al.*, 2000). The main motor signs of PD are resting tremor, rigidity, bradykinesia, and akinesia, which are noticeable when more than 50% of DAergic cells have been lost (Gaenslen *et al.*, 2011), producing a decrease in striatal dopamine (DA) levels (Hahn *et al.*, 1981; Scherfler *et al.*, 2007). The DA-replacing agent L-DOPA (LD), its metabolic precursor, has been the most commonly used treatment for PD because it reverses the main parkinsonian symptoms (Smith *et al.*,

2012), improves quality of life, and reduces mortality (Pearce, 1978; Fahn *et al.*, 2004). Unfortunately, chronic LD therapy is compromised by many side-effects, the most noticeable being involuntary movements and L-DOPA-induced dyskinesia (LID), which severely compromise lifestyle (Ahlskog and Muenter, 2001). LID usually increases when DA reaches the maximum concentration in the brain per dose of LD (peak-dose dyskinesias), and dystonia ('off' dystonia) can occur when the concentration of LD is very low (Calabresi *et al.*, 2010).

Risk factors for LID include duration and dose of LD treatment, and consist of asymmetric choreiform movements, athetosis, and dystonia of the facial muscles, jaw, tongue, neck, limbs, and toes (Mones *et al.*, 1971). Similarly, in rats with unilateral 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesion, LD treatment produces abnormal involuntary movements (AIMs), which are manifested as asymmetric and purposeless movements affecting the limbs, trunk, and orofacial muscles. The assessment of AIMs retains

predictive validity for the preclinical screening of novel antidyskinetic PD treatments (Dekundy *et al.*, 2007) because they are significantly reduced by acute administration of substances that have antidyskinetic efficacy in Parkinsonian patients (Lundblad *et al.*, 2002). Thus, the identification of neurochemical elements involved in the regulation of motor function may enable the discovery of new potential targets that work together with LD, improving the efficacy of these drugs and reducing the occurrence and severity of AIMs and response fluctuations (Pérez-Rial *et al.*, 2011).

Numerous studies point to the endocannabinoid (ECB) system as an important modulator of DAergic activity in the basal ganglia (Meschler *et al.*, 2001; Ferrer *et al.*, 2003; Andersson *et al.*, 2005; Sidló *et al.*, 2008; Giuffrida and McMahon, 2010; and others). ECB analogs exert a wide spectrum of central and peripheral effects by activating specific cannabinoid receptors, two of which have been well characterized: CB1 and CB2 (Howlett *et al.*, 2002). CB1 receptors are highly expressed in brain areas involved in the control of motor functions, such as the basal ganglia, cerebellum, and sensorimotor cortex (Glass and Felder, 1997; Howlett *et al.*, 2004; Fernández-Ruiz *et al.*, 2011; Mailleux and Vanderhaeghen, 1992a, 1992b). It also appears that the ECB system contributes toward several forms of short-term and long-term synaptic plasticity (Chevalleyre *et al.*, 2006; Kano *et al.*, 2009; Di Marzo, 2011), and aberrant synaptic plasticity might play a role in LID (Calabresi *et al.*, 2010). Moreover, the presymptomatic and early stages of PD are associated with CB1 receptors, whereas the advanced stages are characterized by upregulation of the responsiveness of CB1 receptors in the caudate nucleus (Ferrer *et al.*, 2011), mainly on the contralateral side to the clinically more affected body side (Van Laere *et al.*, 2012). However, trials of the potential therapeutic utility of cannabinoid compounds in PD have produced conflicting results (García-Arencibia *et al.*, 2009; Fernández-Ruiz *et al.*, 2011).

Cannabis compounds have modest effects in reducing PD motor and nonmotor symptoms (Frankel *et al.*, 1990; Carroll *et al.*, 2004; Zuardi *et al.*, 2009), but the synthetic cannabinoid CB1 agonist nabilone reduces LID (Sieradzan *et al.*, 2001). In animal models of PD, CB1 agonists may reduce LID (Fox *et al.*, 2002; Ferrer *et al.*, 2003; Gilgun-Sherki *et al.*, 2003; Segovia *et al.*, 2003; Morgese *et al.*, 2007; Van Vliet *et al.*, 2008). However, the therapeutic use of CB1 agonists has been limited by their adverse side-effects and risk of abuse (Giuffrida and McMahon, 2010). Paradoxically, although no effects were found in the only clinical trial of a CB1 antagonist (Mesnage *et al.*, 2004), several studies have addressed its capability to improve hypokinesia and LID in animal models of PD (Ferrer *et al.*, 2003; Van der Stelt *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2007; Kelsey *et al.*, 2009). Thus, it is possible that blockade of CB1 receptors might be

effective only in specific phases of the disease, and under certain circumstances, may even have neuroprotective effects (Hansen *et al.*, 2002; Pegorini *et al.*, 2006). Moreover, CB1 receptor antagonists that lack psychoactive effects might be of therapeutic value in the management of the very advanced stages of PD in humans, when there is CB1 receptor upregulation (Fernández-Espejo *et al.*, 2005).

Therefore, the aim of this study was to determine the effect, in a well-validated clinically relevant animal model of PD with LID (Schallert *et al.*, 1992; Cenci *et al.*, 2002), of the oral coadministration of LD and the CB1 receptor antagonist rimonabant (RIM) (at a relatively low dose for oral administration) (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1995; Compton *et al.*, 1996), compared with the effects of LD-only, on (i) the presence of LID, using measures of AIMs to assess the severity of dyskinetic effects; (ii) the protection of SNc DAergic cells after the lesion, by counting the number of tyrosine hydroxylase (TH)-positive cells; and (iii) the structural and ultrastructural alterations, by analyzing the number of striatal MSN dendritic spines and preservation of the neuropil.

Methods

The experiments were conducted in 32 male Wistar rats weighing 180–200 g at the beginning of the study. The rats were individually housed in hanging plastic cages under controlled light conditions (12 h light/dark regime) and had free access to Purina rat chow and water. Body weight was recorded daily. The experimental protocol was carried out in accordance with the Animal Act of 1986 for Scientific Procedures. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Stereotactic surgery and treatments

The rats were anesthetized with sodium pentobarbitone (35 mg/kg, intraperitoneal) and placed in a stereotaxic apparatus. They were injected with 4 μ l of saline solution containing 8 μ g of 6-OHDA (Sigma Chemical Company, Toluca, Mexico) and 0.2 mg of ascorbic acid ($n = 26$) into the left medial forebrain bundle; a sham lesion was made with vehicle ($n = 6$, control group). The injections were administered over a 4-min period using a Hamilton syringe attached to a glass micropipette with a tip diameter of 20–50 μ m. The stereotaxic co-ordinates were as follows: $AP = -6.1$ mm anterior to the interaural line; $L = 1.6$ mm lateral to bregma; and $V = -8.1$ mm vertical from dura according to Paxinos and Watson (2007). After recovery from anesthesia, the animals were returned to their home cages.

Apomorphine (Sigma Chemical Company; 0.25 mg/kg, intraperitoneal)-induced rotational behavior was evaluated 2 days after the lesion in an automated rotameter (40-cm diameter bowl surrounded by a 16-cm wall) as supersensitivity of striatal postsynaptic receptors, as judged by induction of rotational behavior after apomorphine,

occurred when 90% or more of the nigrostriatal neurons were destroyed (Hefti *et al.*, 1980), and DA receptor supersensitivity to apomorphine is evident 36 h after a 6-OHDA lesion (Ungerstedt, 1971; Staunton *et al.*, 1981; Neve *et al.*, 1982; and others). Thus, the efficiency of each lesion was confirmed by the rotational behavior induced by apomorphine, and only animals rotating more than 200 turns/30 min were used for further analyses ($n = 18$) (Ungerstedt, 1971). This ensured that all rats were equally lesioned before treatments (Hudson *et al.*, 1993). One day after the rotational behavior test, randomly selected lesioned rats ($n = 6$) were treated orally with 30 mg/kg LD (Sinemet; Bristol-Myers Squibb, México; carbidopa/L-DOPA, 25/250 mg), another six rats were treated orally with 1 mg/kg rimonabant (RIM; Sanofi-Synthelabo S.A., Paris, France) coadministered with 30 mg/kg LD (LD/RIM). This dose of LD administered orally is sufficient to consistently induce LID and maintain antiparkinsonian effects (Lindner *et al.*, 1996; Padovan-Neto *et al.*, 2009). Sinemet tablets were crushed and the powder was dissolved in 10 ml tap water, and then the corresponding CB1 antagonist dose was added to the Sinemet solution and administered carefully, using a syringe without a needle, once a day for 56 days. The other six untreated lesioned rats as well as the control animals ($n = 6$) were kept for the same period of time.

Rating of abnormal involuntary movements

The severity of AIMs was scored every 14 days (four evaluations). Rats were placed individually in transparent plastic cages and observed every 20 min, starting 20 min before treatment, until 180 min after the treatment (10 monitoring periods of 1 min each). Four subtypes of AIMs, described according to their topographic distribution as locomotive, axial, forelimb, or orolingual, were scored according to the rat dyskinesia scale, which assigns a score from 0 to 4 to each of the four subtypes of AIM according to the proportion of time/monitoring period during which the AIM is present. (These criteria are similar to those used in the clinic for LID.) Borderline scores (0.5, 1.5, 2.5, and 3.5) were allowed to increase the sensitivity of the evaluation (Cenci *et al.*, 2002; Cenci and Lundblad, 2007). Enhanced manifestations of otherwise normal behaviors, such as rearing, sniffing, grooming, and gnawing, were not included in the rating. The sessions were also videotaped using a Panasonic camcorder (SDR-H80 model; Panasonic, Mexico) and further analysis was carried out for detailed examination of the topography of AIMs and their time of manifestation.

Tissue preparation

After treatments and evaluations were completed, all rats were perfused through the aorta, under sodium pentobarbital anesthesia, with saline solution, followed by fixative containing 0.2% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.1 mol/l PBS. The brains were removed and placed in the fixative solution for 1 h.

Tyrosine hydroxylase immunocytochemistry

Coronal sections (50 μ m) were obtained on a vibrating microtome through the mesencephalon, for immunocytochemistry. TH (Chemicon International Inc., Temecula, California, USA; 1:1000) immunostaining with the ABC detection method (Vector Lab MI, USA) was performed for light microscope analysis. The analysis was carried out using a computer-assisted system (Image-Pro Plus; Media Cybernetics, Del Mar, California, USA) connected by a CCD camera to an Optiphot 2 Microscope (Nikon, Mexico). The number of TH-positive neurons was counted in 1500 μ m² from seven SNc sections per hemisphere of each animal (Avila-Costa *et al.*, 2004).

Histological analysis

Blocks from the striatum were processed for the rapid Golgi method and cut into 90- μ m-thick sections (Valverde, 1970). The number of dendritic spines was counted, in a 10- μ m-long section, in five secondary dendrites from 10 medium-size spiny neurons per group in each hemisphere (Avila-Costa *et al.*, 2004).

Electron microscopy

Tissue samples used for ultrastructural analysis were punched out from the dorsolateral quadrant of the rostral striatum, the same segment that was analyzed in PD patients (Avila-Costa *et al.*, 1998). After washing in PBS, the fragments were treated for 60 min with 1% osmium tetroxide, washed for 30 min in PBS, dehydrated with graded ethanol, and flat-embedded in araldite. Ultrathin sections were collected, counterstained with uranyl acetate and lead citrate, and examined in a JEOL 100CX-II electron microscope.

Ultrastructural analysis

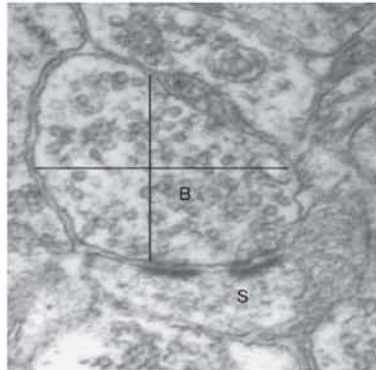
Ultrastructural analysis was carried out in 50 randomly selected synaptic endings per striatum (ipsilateral and contralateral), presumably glutamatergic axospinal synapses with the head of an MSN dendritic spine (Ingham *et al.*, 1998). Synapses were defined by the presence of a clear postsynaptic density facing at least three presynaptic vesicles. In each synaptic bouton, all membrane and organelle features were observed, and the lengths of the two axes were measured, which were perpendicular to each other and intersected at the center of the synaptic terminal (Fig. 1); axis lengths were measured directly from the electron microscope screen with a grid placed inside the eyepiece (Avila-Costa *et al.*, 2005a).

Statistical analysis

Data are presented as means $\pm$ SEM. For AIMs and cellular studies, statistical analyses of data were carried out using two-way repeated-measures analysis of variance (RM ANOVA).

RM ANOVA for AIMs included the between-subjects factor 'group' (6-OHDA, LD, and LD/RIM groups) and

Fig. 1



Synaptic ending (B) showing the two axes measured, establishing a synaptic contact with a dendritic spine (S).

the within-subjects factor 'observation day' (14, 28, 42, and 56 days). For the cellular data (number of TH-immunopositive cells, number of dendritic spines, and synaptic ending size), the analysis included the between-subjects factor 'group' (control, 6-OHDA, LD, and LD/RIM groups) and the within-subjects factor 'side' (lesioned vs. nonlesioned hemisphere). Relevant differences were analyzed pair-wise by post-hoc comparisons using Tukey's test. Rotational responses induced by apomorphine were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test. The threshold for statistical significance was set at an α level of 0.05. Data were analyzed using the statistical software package GraphPad Prism version 6.0 for Mac (Graph Pad Software, San Diego, California, USA).

Results

After 56 days, neither clinical alterations nor significant weight changes were detected in the experimental animals compared with the controls.

To ensure that all rats were equally denervated before the start of treatments, we evaluated apomorphine-induced turning behavior. One-way ANOVA showed no significant differences between groups [$F_{(2,15)} = 1.38$, NS]. The results are shown in Table 1. Rats were assigned randomly to the different groups after the rotational behavior test.

Time course and overall incidence of abnormal involuntary movements

For an overview of the development of dyskinesias, we analyzed the summation of all AIM subtypes (axial + locomotive + limb + orolingual). Figure 2a shows the total severity AIMs induced by LD in each experimental condition. Two-way RM ANOVA showed a significant effect of time [$F_{(3,45)} = 3.58$, $P < 0.025$] and

Table 1 Number of apomorphine-induced contralateral turns in 6-hydroxydopamine lesioned rats during a 30 min period 48 h after the lesion

	6-OHDA	6-OHDA + LD	6-OHDA + LD/RIM
R-17, 231 t		R-1, 214 t	R-9, 242 t
R-4, 243 t		R-5, 223 t	R-3, 236 t
R-12, 250 t		R-11, 231 t	R-2, 280 t
R-8, 288 t		R-6, 237 t	R-18, 269 t
R-10, 277 t		R-13, 254 t	R-7, 227 t
R-15, 215 t		R-16, 243 t	R-14, 260 t
$\bar{x} \pm \text{SEM}$	250.667 $\pm$ 11.263	233.667 $\pm$ 5.829	252.333 $\pm$ 8.401

Rats were assigned randomly to the different groups after the rotational behavior test.

No significant differences were found between groups.

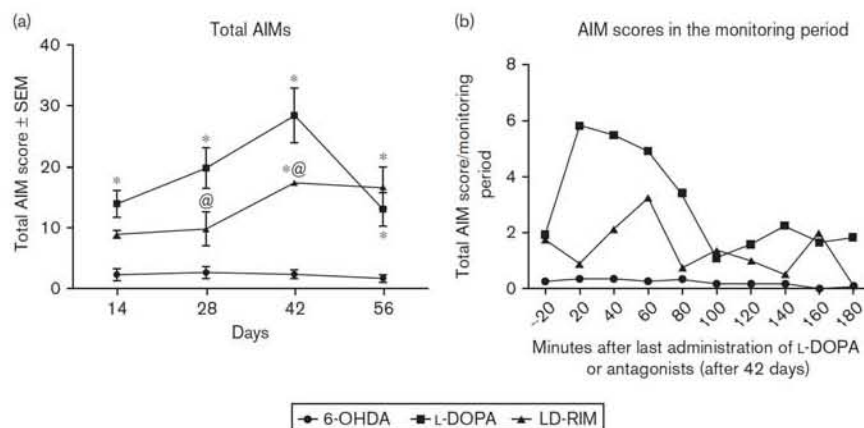
6-OHDA, 6-hydroxydopamine; LD, L-DOPA; R, animal number; RIM, receptor antagonist rimonabant; t, turns.

treatment [$F_{(2,15)} = 24.95$, $P < 0.001$], but no significant time by treatment interaction [$F_{(6,45)} = 1.95$, NS]. Post-hoc analysis indicated that LD/RIM-treated rats showed less severe AIMs compared with the LD-treated group ($P < 0.0001$). It can also be seen from Fig. 2a that after 56 days, the AIMs decreased, probably because the rats became subtly more akinetic; however, there were no significant differences between 42 and 56 days either in the LD or in the LD/RIM groups. In contrast, as shown in Fig. 2b (treatment day 42), the temporal manifestation of AIMs after a single dose of LD alone or LD coadministered with RIM resembled the time course of peak-dose dyskinesia in PD (Nutt, 1990; Fahn, 2000). Thus, as Fig. 2b shows, the severity of AIMs increased gradually during the first 20 min after treatment, remained elevated for 60 min, and gradually returned to baseline between 80 and 140 min after treatment. The severity of AIMs is more evident in the LD-only treated group as RIM coadministration notably reduced it.

Representation of abnormal involuntary movement subtypes

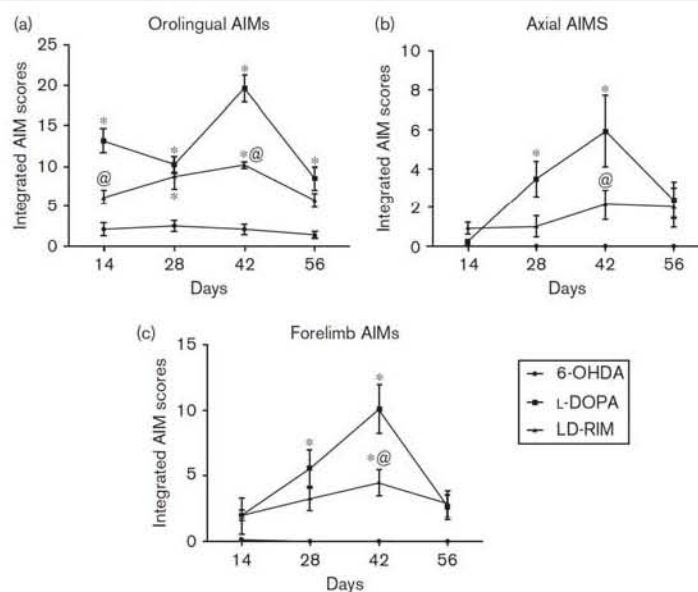
Different AIM subtypes were mainly characterized in the LD-only treated group and with less severity in the LD/RIM-treated group (Fig. 3). For orolingual AIMs (Fig. 3a), there was a significant treatment effect [$F_{(2,15)} = 23.70$, $P < 0.001$] and a significant time by treatment interaction [$F_{(6,45)} = 3.10$, $P < 0.02$], but no significant effect of time [$F_{(3,45)} = 1.90$, NS]. For axial AIMs (Fig. 3b), there was a significant treatment effect [$F_{(2,15)} = 8.67$, $P < 0.005$] but no significant effect of time [$F_{(3,45)} = 2.36$, NS] or time by treatment interaction [$F_{(6,45)} = 1.67$, NS]. For forelimb AIMs (Fig. 3c), there were significant effects of treatment [$F_{(2,15)} = 19.54$, $P < 0.001$] and time [$F_{(3,45)} = 3.70$, $P < 0.02$] and a significant treatment by time interaction [$F_{(6,45)} = 2.35$, $P < 0.05$]. Post-hoc analysis showed that LD-only chronic treatment produced increasingly severe AIMs affecting the trunk, limbs, and orolingual muscles. In contrast, from the first to the last testing session, LD/RIM coadministration attenuated the development of AIMs. Finally, locomotive AIMs were barely observed in any experimental

Fig. 2



Time course and overall incidence of AIMs. The two treated groups, 6-OHDA + LD and 6-OHDA + LD/RIM, both show susceptibility to dyskinesia during the course of the experiment, but the overall severity of AIMs is most pronounced in rats with 6-OHDA + LD treatment. (a) Time course of AIM development during chronic LD and LD/RIM treatments. Values are total (locomotive + axial + orolingual + limb AIMs) integrated AIM scores per test session, shown as group median scores. *LD and LD/RIM-treated groups versus the 6-OHDA-lesion group, $P < 0.001$; @LD/RIM versus the LD group, $P < 0.005$; two-way repeated-measures analysis of variance, followed by Tukey's post-hoc test. (b) Time course of total AIM scores/monitoring period after a single treatment with LD or LD/RIM (treatment day 42). AIM, abnormal involuntary movement; LD, L-DOPA; 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; RIM, receptor antagonist rimonabant.

Fig. 3



Representation of AIM subtypes. Integrated AIM scores were generated separately for orolingual (a), axial (b), and forelimb (c) AIMs. *Treatments versus 6-OHDA lesion, $P < 0.005$; @LD/RIM versus the LD-treated group, $P < 0.005$; two-way repeated-measures analysis of variance, followed by Tukey's post-hoc test. AIM, abnormal involuntary movement; LD, L-DOPA; 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; RIM, receptor antagonist rimonabant.

group; both the LD-only and the LD/RIM-treated groups manifested turning behavior involving two hindlimbs (axial AIM), whereas only movements involving at least three limbs are rated under the locomotive AIM category.

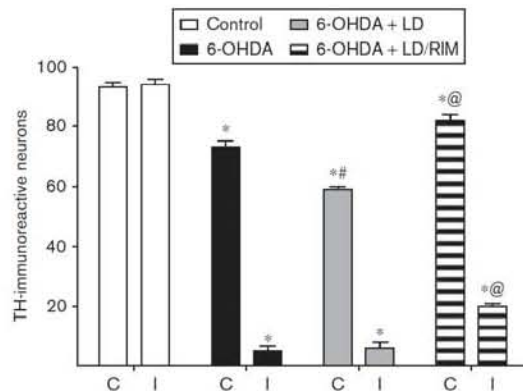
Tyrosine hydroxylase immunocytochemistry

As shown in Figs 4 and 5, the number of TH-positive neurons in the control group, in both the contralateral and ipsilateral SNc, remained unaffected; the average from seven sections was in the range expected for coronal sections of these dimensions (Sauer and Oertel, 1994). Two-way RM ANOVA showed significant effects of group [$F_{(3,20)} = 657.8$, $P < 0.001$] and side [$F_{(1,20)} = 1947$, $P < 0.001$] and a significant group-by-side interaction [$F_{(3,20)} = 218.3$, $P < 0.001$]. We found a significant loss of TH-positive neurons in 6-OHDA-lesioned animals, compared with controls, on both the contralateral and the ipsilateral sides (Figs 4 and 5). Similar findings were observed in LD-treated rats. Post-hoc analysis showed that LD-only treatment induced greater loss of TH-positive neurons in the contralateral hemisphere compared with the contralateral side of the untreated lesioned group ($P < 0.001$). In contrast, LD/RIM cotreatment reduced ($P < 0.001$), but did not eliminate, the loss of TH-positive cells.

Histological analysis

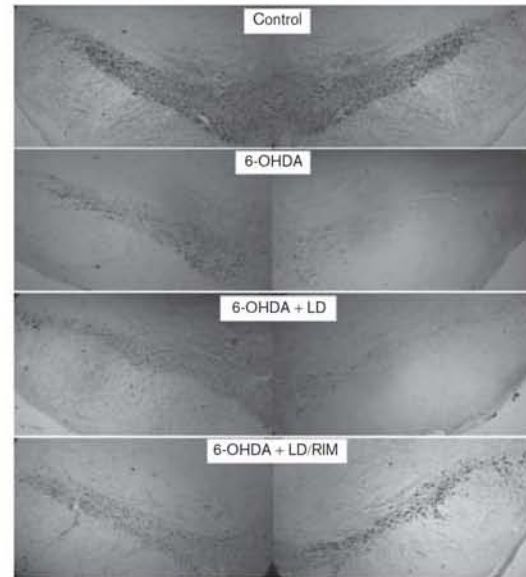
Figures 6 and 7 show the effects of the treatments on MSN dendritic spine density. There were significant effects of treatment [$F_{(3,20)} = 23.84$, $P < 0.001$] and side [$F_{(1,20)} =$

Fig. 4



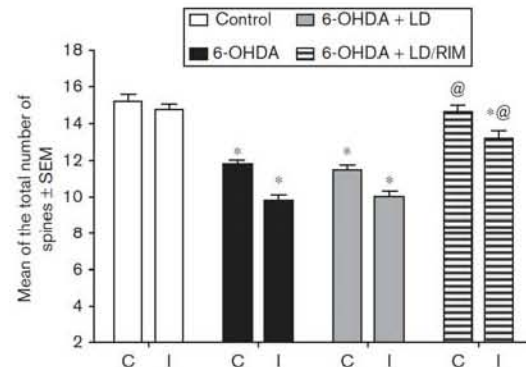
TH-immunoreactive cell counts from substantia nigra compacta (SNc). The data are presented as the mean ± SEM. A statistically significant decrease in TH-immunoreactive cells was detected in both the contralateral (C) and ipsilateral (I) SNc in the three experimental groups. However, LD/RIM treatment showed an evident protection.*Treatments versus the control group; @LD/RIM group versus the LD-treated group; #LD-treated group versus the 6-OHDA-lesioned group; all $P < 0.005$; two-way repeated-measures analysis of variance, followed by Tukey's post-hoc test. LD, L-DOPA; 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; RIM, receptor antagonist rimonabant; RM ANOVA; TH, tyrosine hydroxylase.

Fig. 5



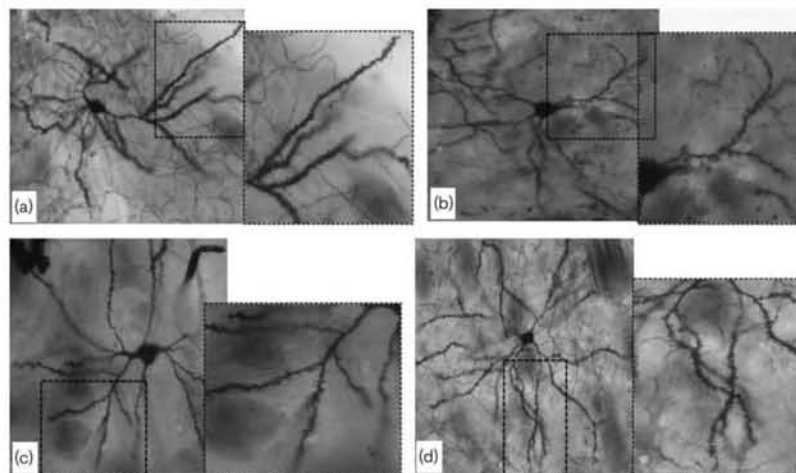
Representative tyrosine hydroxylase-immunostained coronal sections (magnification, $\times 10$) containing the substantia nigra compacta (SNc) of control, 6-OHDA, 6-OHDA + LD, and 6-OHDA + LD/RIM-treated rats. Note the profound cell loss in the ipsilateral SNc in the three experimental groups, which is more evident in the 6-OHDA and the LD-only treated groups, in contrast to the striking cellular protection observed in the LD/RIM-treated group. LD, L-DOPA; 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; RIM, receptor antagonist rimonabant.

Fig. 6



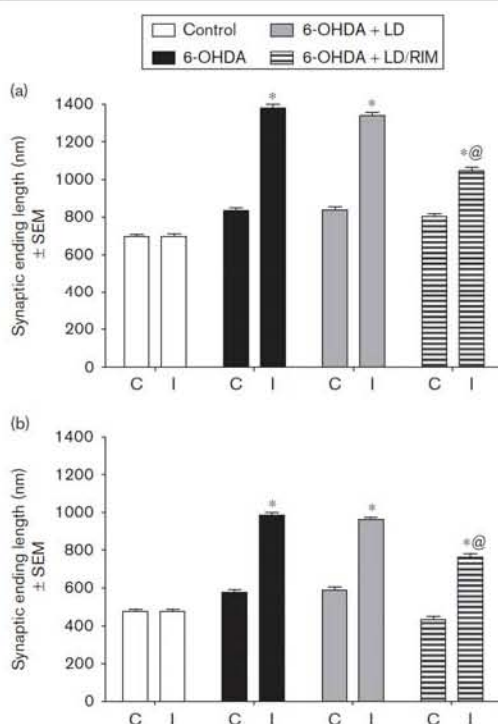
Golgi-stain analysis: medium spiny neurons dendritic spine density of the contralateral (C) and ipsilateral (I) striata after 2 months. *Versus the control group, $P < 0.05$; @versus the LD-treated group, $P < 0.05$; two-way repeated-measures analysis of variance, followed by Tukey's post-hoc test. LD, L-DOPA; 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; RIM, receptor antagonist rimonabant.

Fig. 7



Dendritic spine density. Photomicrographs of representative Golgi-stained medium-size spiny neurons of the ipsilateral striatum with a representative box of dendritic spine densities from: the control group (a), 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesion (b), 6-OHDA + L-DOPA (LD) treatment (c), and 6-OHDA + LD/receptor antagonist rimobant (RIM) treatment (d). Both the 6-OHDA lesion and the LD treatment induced a marked decrease in the total number of spines mainly in the ipsilateral striatum. In contrast, the LD/RIM-treated group showed a well-preserved dendritic spine density (magnification, $\times 40$ and $\times 100$).

Fig. 8



13.86, $P < 0.002$], but no significant treatment-by-side interaction [$F_{(3,20)} = 0.77$, NS]. Post-hoc analyses showed that DA depletion and LD treatment resulted in a significant decrease in spine density in both ipsilateral and contralateral striata compared with that seen in sham-lesioned control animals ($P < 0.002$) (Figs 6 and 7a-c). However, LD/RIM significantly attenuated the degree of MSN spine loss, compared with both the 6-OHDA-lesioned group without treatment and the LD-treated group, in both the intact and the dopamine-denervated hemispheres ($P < 0.001$) (Figs 6 and 7d). The LD/RIM-treated group also showed significant but smaller differences in the ipsilateral striatum compared with the sham-lesioned control group. Post-hoc tests showed no significant differences between the LD/RIM group and the sham-lesioned group in the contralateral striatum.

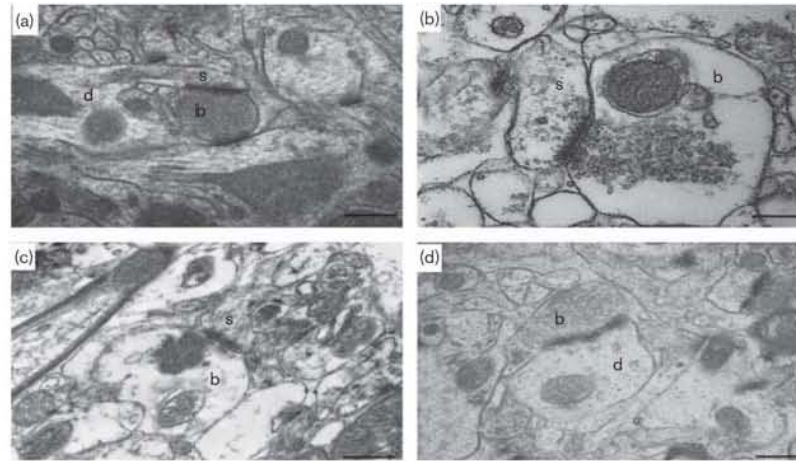
Electron microscopy

Figure 8a and b shows the size of synaptic ending; there were significant effects of group [$F_{(3,20)} = 23.52$, $P < 0.001$ for the major axis and $F_{(3,20)} = 5.27$, $P < 0.001$ for the minor

Fig. 8

Ultrastructural analysis: length of the major (a) and minor (b) axes measured in ipsilateral (I) and contralateral (C) striata after stereotaxic surgery and treatments. *Versus the control group, $P < 0.05$; @versus the LD-treated group, $P < 0.05$; two-way repeated-measures analysis of variance, followed by Tukey's post-hoc test. LD, L-DOPA; 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; RIM, receptor antagonist rimobant.

Fig. 9



Striatal ultrastructure: electron micrographs from ipsilateral striatum neuropil. (A) In the control group, the mean size of the synaptic boutons (b) was 700×696 nm, and it can be observed that the neuropil is well preserved; s, dendritic spine; d, dendrite. (B) This image shows a swollen synaptic bouton (b) of a 6-hydroxydopamine rat, establishing a synaptic contact with a dendritic spine (s). Note the altered mitochondria with dilated cisternae and some vacuoles within the neuropil. (C) This image shows a swollen presynaptic ending (b) of an L-DOPA (LD)-treated rat, establishing a synaptic contact with a dendritic spine (s), these rats also showed severe neuropil alterations. (D) In the LD/receptor antagonist rimonabant group, synaptic boutons and neuropil were well preserved, and the appearance is similar to that of the control group; b, synaptic bouton; d, dendrite. Bar = $0.2 \mu\text{m}$.

axis] and side [$F_{(1,20)} = 63.61$, $P < 0.001$ for the major axis and $F_{(1,20)} = 23.54$, $P < 0.001$ for the minor axis], and a significant group-by-side interaction [$F_{(3,20)} = 5.46$, $P < 0.01$ for the major axis and $F_{(3,20)} = 6.08$, $P < 0.005$ for the minor axis]. Control rats showed no differences in the size of the synaptic endings or neuropil alterations after sham surgery (Figs 8a and b and 9a). As shown in Fig. 8, the 6-OHDA-lesioned group showed an evident increase in the size of synaptic boutons in the ipsilateral striatum; the same pattern was observed in the LD-treated group ($P < 0.001$) (Figs 8a and b and 9b and c). Post-hoc analyses indicated that LD/RIM cotreatment reduced the dilation of presynaptic boutons compared with the 6-OHDA untreated and LD-only treated groups ($P < 0.001$). The contralateral (nonlesioned) side of all experimental groups showed no significant differences compared with the control group (Fig. 8a and b). The neuropil of 6-OHDA and LD-only treated groups was severely altered (Fig. 9b and c); in contrast, the neuropil of LD/RIM-treated rats neuropil was well preserved, with no evident alterations (Fig. 9d).

Discussion

Our data show that the coadministration of LD with a CB1 antagonist results in a very efficient treatment to reduce AIMs through the conservation of some functional SNc DAergic cells, which in turn imply a well-preserved neuropil of a less denervated striatum. We assume that these results are probably because of a synergistic effect between LD and RIM.

Abnormal involuntary movements

Akinesia rapidly becomes intolerable when PD patients are not treated with LD (Rascol and Fabre, 2001). Similarly, akinesia predominated in all rats, irrespective of the experimental group, 20 min before treatments at any period of the experiment. After treatments, the analyses showed that dyskinesias increased significantly over the first 20 min and decreased gradually after 180 min (Fig. 2b), a characteristic peak dose of LID phenomenology, where dyskinesic movements are caused by pulsatile stimulation of DA receptors in the striatum (Cenci and Lundblad, 2007; Nutt, 2007; Iravani and Jenner, 2011). The bio-availability of rimonabant in the brain is observed from the first 20 min after its oral administration (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1996), thus facilitating the reduction of peak dose AIMs. In line with our results, Giuffrida *et al.* (1999) have shown reciprocal interactions between ECB and DAergic systems in normal conditions, wherein CB1 blockade facilitates DAergic effects.

In support of this hypothesis, there is evidence that (i) CB1 receptors colocalize with D1 and D2 receptors in striatal projection neurons (Howlett *et al.*, 2002) and (ii) rimonabant enhanced the stimulation of motor activity induced by D2 receptor agonists in control rats (Giuffrida *et al.*, 1999). Therefore, it is possible that rimonabant, by blocking CB1 receptors, might release ECB-induced inhibition of DAergic receptors, thus producing a higher activation of these receptors, even under conditions of low DA levels, as found in PD. A similar hypothesis has been proposed

by Fernandez-Espejo *et al.* (2005) to explain the potential of rimonabant to improve parkinsonian signs in animals with very severe DAergic lesions, as in this study.

Another important aspect is that the dorsolateral striatum controls jaw movements and forepaw usage. The abnormal function of this region is correlated with the presence of oral, axial, and limb AIMs (Andersson *et al.*, 1999). The reduction of this type of abnormal movements is an effective method to predict a valuable therapeutic compound with clinical relevance for PD (Dekundy *et al.*, 2007). We observed that LD/RIM-treated rats maintained the ability to prevent falls with the support of the paws when the axial contortions made them lose their balance, something that LD-treated rats could not prevent. The attenuated motor asymmetry of the limb contralateral to the lesion and the dystonic posture caused by DAergic denervation (Melamed, 1979; Cubo *et al.*, 2001) could have been reversed by rimonabant, as reported previously (Fernandez-Espejo *et al.*, 2005; Kelsey *et al.*, 2009). Therefore, although prolonged LD treatment decreases its effectiveness against motor signs (Ghassemi *et al.*, 2006; Olanow *et al.*, 2006; Nutt *et al.*, 2010), it is possible that rimonabant increases the duration of effectiveness of LD, attenuating akinesia and LID (Cao *et al.*, 2007; Kelsey *et al.*, 2009).

Moreover, as the effect of rimonabant in movement control is dose dependent and the degree of DA denervation and LD treatment response are crucial for the consistency of their antidyskinetic effects, the relatively low dose of rimonabant used in this study agrees with previous reports on its therapeutic potential (El-Banoua *et al.*, 2004; Fernandez-Espejo *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2008; Kelsey *et al.*, 2009; Iadaiessky *et al.*, 2010). Therefore, our results show that the rimonabant dose and LD/RIM administration pattern used here were appropriate to compensate the alterations induced by DA denervation and LD chronic treatment, and support the idea that treatment with a CB1 antagonist in combination with LD may become a new strategy for the treatment of LID.

Cytological alterations

It has been shown widely that with the 6-OHDA dose used in this study, the unilateral medial forebrain bundle denervation is almost complete and few SNc DAergic neurons express TH (Truong *et al.*, 2006). According to these authors, this is a valid model, which simulates the advanced stages of PD from the first days after the lesion, when rats consistently show motor impairments (Deumens *et al.*, 2002) and apomorphine-induced turning behavior, and striatal DA content decreases to less than 80% and SNc DA levels to less than 50% (Hudson *et al.*, 1993). It seems that the neurotoxin produces an initial loss of TH phenotype, with cell death occurring over a slower time course (Bowenkamp *et al.*, 1996), which can be extended for 96 h after the lesion (Zuch *et al.*, 2000). In the present

study, we began the treatment 72 h after the lesion. Thus, it might be possible that LD/RIM coadministration enables TH phenotype re-establishment as we found a significantly less severe loss of TH-positive cells in both the contralateral and the ipsilateral SNc compared with the other experimental groups. In contrast, according to Castellano and Díaz (1991), the nigrostriatal DAergic cells' activity has an important regulatory input from the contralateral side of the brain. Thus, it seems that there are interhemispheric projections from the ipsilateral SNc to the contralateral striatum (Fass and Butcher, 1981; Morgan and Huston, 1990; Schwarting and Huston, 1996; Emsley *et al.*, 2001), and the unilateral lesion also affects the contralateral hemisphere (Roedter *et al.*, 2001; Kozłowski *et al.*, 2004; Avila-Costa *et al.*, 2008). Thus, it seems that LD/RIM treatment interrupts the cannabinoid-like endogenous tone controlling SNc neurons (Gucudet *et al.*, 1995), the activity of which in the lesioned rats is increased in both hemispheres (Yang *et al.*, 2007).

It is important to emphasize the fact that LD treatment alone induced greater loss of TH-positive neurons in the contralateral SNc compared with the lesioned-untreated group. In this respect, it has been reported that LD treatment leads to an increase in the endogenous production of 6-OHDA in the striatum (Maharaj *et al.*, 2005). In addition, the chronic high dose of LD induces the reduction of mitochondrial complex I activity in the basal ganglia (Przedborski *et al.*, 1993), which increase the levels of reactive oxygen species in the SNc and the striatum (Golembiowska *et al.*, 2008) and potentiate the neurotoxic effects caused by exogenous 6-OHDA (Naudin *et al.*, 1995).

Our results also show that LD/RIM prevents 6-OHDA-induced spine loss, and as LD-only treatment did not avoid this loss, it is possible that this effect is crucial for the antidyskinetic effects exerted by LD/RIM treatment (Schuster *et al.*, 2009; Soderstrom *et al.*, 2010). In keeping with this, it has been shown that profound plastic changes affect striatal MSN during the progressive loss of DA input (Ingham *et al.*, 1998; Neely *et al.*, 2007; Avila-Costa *et al.*, 2008). The reduced number of dendritic spines, besides the consequent connections loss, might reduce the membrane surface, leading eventually to MSN-altered excitability (Rall, 1962; Stephens *et al.*, 2005). Striatal MSN spine pruning in response to DA denervation is significantly attenuated by cortical lesions, suggesting that glutamatergic cortical inputs are essential to mediate striatal spine loss in PD (Villalba and Smith, 2010). Dendritic spine counting showed that 6-OHDA untreated and LD-only treated groups show very similar dendritic spine loss in both striata, corresponding with severe TH-positive cell loss in both ipsilateral and contralateral SNc, and despite the greater TH-positive cell loss in the ipsilateral SNc of the LD/RIM-treated group, it seems that the presence of MSN dendritic spines depends more on glutamatergic input, rather than

the DAergic one, which means that glutamatergic transmission in the striatum of this group is better preserved (Avila-Costa *et al.*, 2005b, 2008) as evidenced by the ultrastructural analysis.

In contrast, consistent with previous reports, we found ultrastructural changes in striatal synaptic boutons, increasing their length in nontreated lesioned rats (Avila-Costa *et al.*, 2005a, 2008), and treated with a low oral dose of LD (Gutiérrez-Valdez *et al.*, 2012). Although the functional significance of the ultrastructural changes in the striatum remains poorly understood, there is some evidence indicating that this is a critical component of the strength and plasticity of glutamatergic transmission (Ingham *et al.*, 1998; Stephens *et al.*, 2005) increased in PD (Raju *et al.*, 2008). The size of these axospinous synapses is related to their activity; large dendritic spines and axon terminals have larger glutamatergic synaptic areas and may mediate stronger excitatory transmission (Smith *et al.*, 2009), which corresponds with the presence of morphological changes, such as the occurrence of vacuoles in the neuropil and abnormal mitochondrial morphology (Fig. 9b and c), showing cortical aberrant plasticity that most likely represents a morphological marker of disease severity (Lach *et al.*, 1992).

As we found here, LD/RIM treatment markedly prevented damage to the ipsilateral striatum synaptic boutons, an effect also observed with the D2 agonist bromocriptine (Avila-Costa *et al.*, 2005b). Thus, we might suggest that LD/RIM treatment acts on a well-preserved SNc and striatum (compared with that produced by LD monotherapy) that effectively assimilated exogenous LD, extending its antiparkinsonian effect. This in turn partially restores the LD-induced alterations in the synaptic plasticity of the striatum (Picconi *et al.*, 2008) and possibly the overactivity of the ECB and glutamatergic systems to a level at which LID is present with less severity (Maccarrone *et al.*, 2003; Picconi *et al.*, 2004; Casteels *et al.*, 2010; Walsh *et al.*, 2010).

A final important piece of evidence is that DA and CB1 receptor-mediated changes in motor behavior may be more complex than can be discerned from studies of SNc and striatal structure and ultrastructure. The influence in this process of other ECB receptors and ligands, as well as other basal ganglia structures, such as globus pallidus, substantia nigra reticulata, and subthalamic nucleus (which also express CB1 and DA receptors), remains to be determined. Nevertheless, there is sufficient evidence of the role of the striatum and SNc in the manifestation of LID and its treatment (Buck *et al.*, 2010). In this study, we show the effectiveness of oral coadministration of a CB1 antagonist and LD on the preservation of striatal cytology and SNc TH-positive neurons, partially reverting the structural alterations induced by the 6-OHDA lesion and chronic LD treatment, as well as by reducing the severity of AIMs, increasing the temporal efficacy of

the antiparkinsonian effect of LD and decreasing contralateral dystonia. Thus, cannabinoid antagonism-based therapy would be aimed not only at alleviating specific motor symptoms but also at delaying/arresting the degeneration of striatal and SNc cells. Nevertheless, it is necessary to conduct further experiments with rimonabant treatment, alone or a few weeks after the start of LD treatment, to determine whether the presumed neuroprotective effects of rimonabant occur in the absence of LD or require interaction with it.

Acknowledgements

The authors thank Luis Avila-Costa and Patricia Diaz-Bech for editorial assistance and Posgrado en Ciencias Biológicas for the received formation during her postgraduate studies.

This work was supported by PAPCA-Iztacala UNAM 12-2013 and PAPIIT-DGAPA UNAM IN220111.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

- Ahlskog J, Muentert M (2001). Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord* 16:448–506.
- Andersson M, Hilbertson A, Cenci MA (1999). Striatal fosB expression is causally linked with L-DOPA-induced abnormal involuntary movements and the associated upregulation of striatal prodynorphin mRNA in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 6:461–474.
- Andersson M, Usiello A, Borgkvist A, Pozzi L, Dominguez C, Fienberg AA, *et al.* (2005). Cannabinoid action depends on phosphorylation of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa at the protein kinase A site in striatal projection neurons. *J Neurosci* 25:8432–8438.
- Avila-Costa MR, Colin-Barenque L, Espinosa-Villanueva J, Machado-Salas J (1998). Neuropil degeneration of the caudate nucleus in Parkinson disease and after 6-OHDA lesion. An ultrastructural comparative analysis. *Patología* 36:297–301.
- Avila-Costa MR, Montiel Flores E, Colin-Barenque L, Ordóñez JL, Gutiérrez AL, Niño-Cabrera HG, *et al.* (2004). Nigrostriatal modifications after vanadium inhalation: an immunocytochemical and cytological approach. *Neurochem Res* 29:1365–1369.
- Avila-Costa MR, Colin-Barenque L, Aley-Medina P, Gutiérrez AL, Ordóñez JL, Martínez EF, Fortoul TI (2005a). Bilateral increase of perforated synapses after unilateral dopamine depletion. *Int J Neurosci* 115:79–86.
- Avila-Costa MR, Colin-Barenque L, Montiel-Flores E, Aley-Medina P, Gutiérrez AL, Ordóñez JL, *et al.* (2005b). Bromocriptine treatment in a murine Parkinson's model: ultrastructural evaluation after dopaminergic deafferentation. *Int J Neurosci* 115:851–859.
- Avila-Costa MR, Gutiérrez-Valdez A, Ordóñez-Librado J, Martínez V, Colin-Barenque L, Espinosa-Villanueva J, *et al.* (2008). Time course changes of the striatum neuropil after unilateral dopamine depletion and the usefulness of the contralateral striatum as a control structure. *Neurol Res* 30:1068–1074.
- Bowenkamp KE, David D, Lapchak PL, Henry MA, Granholm AC, Hoffer BJ, Mahalik TJ (1996). 6-Hydroxydopamine induces the loss of the dopaminergic phenotype in substantia nigra neurons of the rat. A possible mechanism for restoration of the nigrostriatal circuit mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Exp Brain Res* 111:1–7.
- Buck K, Voehringer P, Ferger B (2010). Site-specific action of L-3,4-dihydroxyphenylalanine in the striatum but not globus pallidus and substantia nigra pars reticulata evokes dyskinetic movements in chronic L-3,4-dihydroxyphenylalanine-treated 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuroscience* 166:355–358.
- Calabresi P, Di Filippo M, Ghiglieri V, Tambasco N, Picconi B (2010). Levodopa-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease: filling the bench-to-bedside gap. *Lancet Neurol* 9:1106–1117.

- Cao X, Liang L, Hadcock JR, Iredale PA, Griffith DA, Menniti FS, *et al.* (2007). Blockade of cannabinoid type 1 receptors augments the antiparkinsonian action of levodopa without affecting dyskinesias in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **323**:318–326.
- Carroll C, Bain P, Teare L, Liu X, Joint C, Wroath C, *et al.* (2004). Cannabis for dyskinesia in Parkinson disease: a randomized double-blind crossover study. *Neurology* **63**:1245–1295.
- Casteels C, Lauwers E, Baitar A, Bormans G, Baekelandt V, Van Laere K (2010). In vivo type 1 cannabinoid receptor mapping in the 6-hydroxydopamine lesion rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* **1316**:153–162.
- Castellano MA, Diaz MR (1991). Nigrostriatal dopaminergic cell-activity is under control by substantia-nigra of the contralateral brain side – electrophysiological evidence. *Brain Res Bull* **27**:213–218.
- Cenci MA, Whishaw IQ, Schallert T (2002). Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci* **3**:574–579.
- Cenci MA, Lundblad M (2007). Ratings of L-DOPA-induced dyskinesia in the unilateral 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci* **41**:9.25.1–9.25.23, Chapter 9: Unit 9.25.
- Chevalere V, Takahashi KA, Castillo PE (2006). Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci* **29**:37–76.
- Colin-Barenque L, Avila-Costa MR, Espinosa-Villanueva J, Machado-Salas J (2000). Ultrastructural comparative analysis between Parkinson disease patients and aged rats. *Arch Neurol* **4**:168–173.
- Compton DR, Aceto MD, Lowe J, Martin BR (1996). In vivo characterization of a specific cannabinoid receptor antagonist (SR141716A): inhibition of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced responses and apparent agonist activity. *J Pharmacol Exp Ther* **277**:586–594.
- Cubo E, Gracies JM, Benabou R, Olanow CW, Raman R, Leurgans S, Goetz CG (2001). Early morning off-medication dyskinesias, dystonia, and choreic subtypes. *Arch Neurol* **58**:1379–1382.
- Damier P, Hirsch E, Agid Y, Graybiel A (1999). The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain* **122** (Pt 8):1437–1485.
- Dekundy A, Lundblad M, Danysz W, Cenci MA (2007). Modulation of L-DOPA-induced abnormal involuntary movements by clinically tested compounds: further validation of the rat dyskinesia model. *Behav Brain Res* **179**:76–89.
- 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.
- Di Marzo V (2011). Endocannabinoid signaling in the brain: biosynthetic mechanisms in the limelight. *Nat Neurosci* **14**:9–15.
- El-Banoua F, Caraballo I, Flores JA, Galan-Rodriguez B, Fernandez-Espejo E (2004). Effects on turning of microinjections into basal ganglia of D(1) and D(2) dopamine receptors agonists and the cannabinoid CB(1) antagonist SR141716A in a rat Parkinson's model. *Neurobiol Dis* **16**:377–385.
- Emsley JG, Lu X, Hagg T (2001). Retrograde tracing techniques influence reported death rates of adult rat nigrostriatal neurons. *Exp Neurol* **168**:425–433.
- Fahn S (2000). The spectrum of levodopa-induced dyskinesias. *Ann Neurol* **47**:S2–S9.
- Fahn S, Oakes D, Shoulson I, Kiebert K, Rudolph A, Lang A, *et al.* (2004). Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med* **351**:2498–2508.
- Fass B, Butcher LL (1981). Evidence for a crossed nigrostriatal pathway in rats. *Neurosci Lett* **22**:109–113.
- Fernandez-Espejo E, Caraballo I, de Fonseca FR, El Banoua F, Ferrer B, Flores JA, Galan-Rodriguez B (2005). Cannabinoid CB1 antagonists possess anti-parkinsonian efficacy only in rats with very severe nigral lesion in experimental parkinsonism. *Neurobiol Dis* **18**:591–601.
- Fernández-Ruiz J, Moreno-Martel M, Rodríguez-Cueto C, Palomo-Garó C, Gómez-Canas M, Valdeolivas S, *et al.* (2011). Prospects for cannabinoid therapies in basal ganglia disorders. *Br J Pharmacol* **163**:1365–1378.
- Ferrer B, Asbrock N, Kathuria S, Piomelli D, Giuffrida A (2003). Effects of levodopa on endocannabinoid levels in rat basal ganglia: implications for the treatment of levodopa-induced dyskinesias. *Eur J Neurosci* **18**:1607–1614.
- Ferrer I, Martínez A, Blanco R, Dalfó E, Carmona M (2011). Neuropathology of sporadic Parkinson disease before the appearance of parkinsonism: preclinical Parkinson disease. *J Neural Transm* **118**:821–839.
- Fox SH, Henry B, Hill M, Crossman A, Brotchie J (2002). Stimulation of cannabinoid receptors reduces levodopa-induced dyskinesia in the MPTP-lesioned nonhuman primate model of Parkinson's disease. *Mov Disord* **17**:1180–1187.
- Frankel JP, Hughes A, Lees AJ, Stern GM (1990). Marijuana for parkinsonian tremor. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **53**:436.
- Gaenslen A, Swid I, Liepelt-Scarfone I, Godau J, Berg D (2011). The patients' perception of prodromal symptoms before the initial diagnosis of Parkinson's disease. *Mov Disord* **26**:653–658.
- García-Arencibia M, García C, Fernández-Ruiz J (2009). Cannabinoids and Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **8**:432–439.
- Ghassemi M, Lemieux S, Jog M, Edwards R, Duval C (2006). Bradykinesia in patients with Parkinson's disease having levodopa-induced dyskinesias. *Brain Res Bull* **69**:512–518.
- Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Mechoulam R, Offen D (2003). The CB1 cannabinoid receptor agonist, HU-210, reduces levodopa-induced rotations in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Pharmacol Toxicol* **93**:66–70.
- Giuffrida A, McMahon LR (2010). In vivo pharmacology of endocannabinoids and their metabolic inhibitors: therapeutic implications in Parkinson's disease and abuse liability. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **91**:90–103.
- Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D (1999). Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci* **2**:358–363.
- Glass M, Felder CC (1997). Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci* **17**:5327–5333.
- Golembiowska K, Dziubina A, Kowalska M, Kaminska K (2008). Paradoxical effects of adenosine receptor ligands on hydroxyl radical generation by L-DOPA in the rat striatum. *Pharmacol Rep* **60**:319–330.
- Guedet C, Santucci V, Rinaldi-Carmona M, Soubrie P, Le Fur G (1995). The CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A affects A9 dopamine neuronal activity in the rat. *Neuroreport* **6**:1421–1426.
- Gutiérrez-Valdez AL, Anaya-Martínez V, Ordóñez-Librado JL, García-Ruiz R, Torres-Esquivel C, Moreno-Rivera M, *et al.* (2012). Effect of chronic L-dopa or melatonin treatments after dopamine deafferentation in rats: dyskinesia, motor performance, and cytological analysis. *ISRN Neurol* **2012**:360379.
- Hahn Z, Karadi Z, Lenard L (1981). Striatal dopamine levels after unilateral lesions of the substantia nigra: evidence for a contralateral decrease. *Acta Physiol Acad Sci Hung* **57**:249–253.
- Hallday G, Lees A, Stern M (2011). Milestones in Parkinson's disease – clinical and pathologic features. *Mov Disord* **26**:1015–1021.
- Hansen HH, Azcoitia I, Pons S, Romero J, García-Segura LM, Ramos JA, *et al.* (2002). Blockade of cannabinoid CB(1) receptor function protects against in vivo disseminating brain damage following NMDA-induced excitotoxicity. *J Neurochem* **82**:154–158.
- Hefti F, Melamed E, Wurtman RJ (1980). Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. *Brain Res* **195**:123–137.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, *et al.* (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* **54**:161–202.
- Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ (2004). Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* **47** (Suppl 1):345–358.
- Hudson JL, van Horne CG, Stromberg I, Brock S, Clayton J, Masserano J, *et al.* (1993). Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res* **626**:167–174.
- Ingham CA, Hood SH, Taggart P, Arbuthnott GW (1998). Plasticity of synapses in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *J Neurosci* **18**:4732–4743.
- Iravani MM, Jenner P (2011). Mechanisms underlying the onset and expression of levodopa-induced dyskinesia and their pharmacological manipulation. *J Neural Transm* **118**:1661–1690.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* **89**:309–380.
- Kelsey JE, Harris O, Cassin J (2009). The CB(1) antagonist rimonabant is adjunctively therapeutic as well as monotherapeutic in an animal model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* **203**:304–307.
- Kozłowski DA, Miljan EA, Bremer EG, Harrod CG, Gerin C, Connor B, *et al.* (2004). Quantitative analyses of GFRalpha-1 and GFRalpha-2 mRNAs and tyrosine hydroxylase protein in the nigrostriatal system reveal bilateral compensatory changes following unilateral 6-OHDA lesions in the rat. *Brain Res* **1016**:170–181.
- Lach B, Grimes D, Benoit B, Minkiewicz-Janda A (1992). Caudate nucleus pathology in Parkinson's disease: ultrastructural and biochemical findings in biopsy material. *Acta Neuropathol* **83**:352–360.
- Lindner MD, Plone MA, Francis JM, Emerich DF (1996). Validation of a rodent model of Parkinson's disease: evidence of a therapeutic window for oral Sinemet. *Brain Res Bull* **39**:367–372.
- Lundblad M, Andersson M, Winkler C, Kirik D, Wierup N, Cenci MA (2002). Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* **15**:120–132.

- Maccarrone M, Gubellini P, Bari M, Picconi B, Battista N, Centonze D, *et al.* (2003). Levodopa treatment reverses endocannabinoid system abnormalities in experimental parkinsonism. *J Neurochem* **85**:1018–1025.
- Machado-Salas J, Ibarra O, Martinez Fong D, Cornejo A, Aceves J, Kuri J (1990). Degenerative ultrastructural changes observed in the neuropil of caudate nuclei from Parkinson's disease patients. *Stereotact Funct Neurosurg* **54–55**:297–305.
- Maharaj H, Sukhdev Maharaj D, Scheepers M, Mokong R, Daya S (2005). L-DOPA administration enhances 6-hydroxydopamine generation. *Brain Res* **1063**:180–186.
- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1992a). Localization of cannabinoid receptor in the human developing and adult basal ganglia. Higher levels in the striatonigral neurons. *Neurosci Lett* **148**:173–176.
- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1992b). Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radio-autography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* **48**: 655–668.
- Martin AB, Fernandez-Espejo E, Ferrer B, Gorriti MA, Bilbao A, Navarro M, *et al.* (2008). Expression and function of CB1 receptor in the rat striatum: localization and effects on D1 and D2 dopamine receptor-mediated motor behaviors. *Neuropsychopharmacology* **33**:1667–1679.
- Melamed E (1979). Early-morning dystonia. A late side effect of long-term levodopa therapy in Parkinson's disease. *Arch Neurol* **36**:308–310.
- Meschler JP, Howlett AC, Madras BK (2001). Cannabinoid receptor agonist and antagonist effects on motor function in normal and 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated non-human primates. *Psychopharmacology (Berl)* **156**:79–85.
- Mesnage V, Houeto JL, Bonnet AM, Clavier I, Arnulf I, Cattelin F, *et al.* (2004). Neurokinin B, neurotensin, and cannabinoid receptor antagonists and Parkinson disease. *Clin Neuropharmacol* **27**:108–110.
- Mones RJ, Elizan TS, Siegel GJ (1971). Analysis of L-dopa induced dyskinesias in 51 patients with Parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **34**: 668–673.
- Morgan S, Huston J (1990). The interhemispheric projection from the substantia nigra to the caudate-putamen as depicted by the anterograde transport of [3H]leucine. *Behav Brain Res* **38**:155–217.
- Morgese MG, Cassano T, Cuomo V, Giuffrida A (2007). Anti-dyskinetic effects of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: role of CB(1) and TRPV1 receptors. *Exp Neurol* **208**:110–119.
- Naudin B, Bonnet JJ, Costentin J (1995). Acute L-DOPA pretreatment potentiates 6-hydroxydopamine-induced toxic effects on nigro-striatal dopamine neurons in mice. *Brain Res* **701**:151–157.
- Neely M, Schmidt D, Deutch A (2007). Cortical regulation of dopamine depletion-induced dendritic spine loss in striatal medium spiny neurons. *Neuroscience* **149**:457–521.
- Neve KA, Kozlowski MR, Marshall JF (1982). Plasticity of neostriatal dopamine receptors after nigrostriatal injury: relationship to recovery of sensorimotor functions and behavioral supersensitivity. *Brain Res* **244**:33–44.
- Nutt JG (1990). Levodopa-induced dyskinesia: review, observations, and speculations. *Neurology* **40**:340–345.
- Nutt JG (2007). Continuous dopaminergic stimulation: Is it the answer to the motor complications of levodopa? *Mov Disord* **22**:1–9.
- Nutt JG, Chung KA, Holford NH (2010). Dyskinesia and the antiparkinsonian response always temporally coincide: a retrospective study. *Neurology* **74**:1191–1197.
- Olanow CW, Obeso JA, Stocchi F (2006). Drug insight: continuous dopaminergic stimulation in the treatment of Parkinson's disease. *Nat Clin Pract Neurol* **2**:382–392.
- Padovan-Neto FE, Echeverry MB, Tumas V, Del-Bel EA (2009). Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. *Neuroscience* **159**:927–935.
- Paxinos G, Watson C (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 3rd ed. San Diego: Academic Press.
- Pearce JM (1978). Aetiology and natural history of Parkinson's disease. *Br Med J* **2**:1664–1666.
- Pegorini S, Zani A, Braidà D, Guerini-Rocco C, Sala M (2006). Vanilloid VR1 receptor is involved in rimonabant-induced neuroprotection. *Br J Pharmacol* **147**:552–559.
- Pérez-Rial S, García-Gutiérrez MS, Molina JA, Pérez-Nievas BG, Ledent C, Leiva C, *et al.* (2011). Increased vulnerability to 6-hydroxydopamine lesion and reduced development of dyskinesias in mice lacking CB1 cannabinoid receptors. *Neurobiol Aging* **32**:631–645.
- Picconi B, Centonze D, Rossi S, Bernardi G, Calabresi P (2004). Therapeutic doses of L-dopa reverse hypersensitivity of corticostriatal D2-dopamine receptors and glutamatergic overactivity in experimental parkinsonism. *Brain* **127**:1661–1669.
- Picconi B, Paille V, Ghiglieri V, Bagetta V, Barone I, Lindgren HS, *et al.* (2008). L-DOPA dosage is critically involved in dyskinesia via loss of synaptic depotentiation. *Neurobiol Dis* **29**:327–335.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Muthane U, Jiang H, Ferreira M, Naini AB, Fahn S (1993). Chronic levodopa administration alters cerebral mitochondrial respiratory chain activity. *Ann Neurol* **34**:715–723.
- Raju DV, Ahem TH, Shah DJ, Wright TM, Standaert DG, Hall RA, Smith Y (2008). Differential synaptic plasticity of the corticostriatal and thalamostriatal systems in an MPTP-treated monkey model of parkinsonism. *Eur J Neurosci* **27**:1647–1658.
- Rall W (1962). Electrophysiology of a dendritic neuron model. *Biophys J* **2**:145–167.
- Rascol O, Fabre N (2001). Dyskinesia: L-dopa-induced and tardive dyskinesia. *Clin Neuropharmacol* **24**:313–323.
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Alonso R, Shire D, Congy C, *et al.* (1995). Biochemical and pharmacological characterisation of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist. *Life Sci* **56**:1941–1947.
- Rinaldi-Carmona M, Pialot F, Congy C, Redon E, Barth F, Bachy A, *et al.* (1996). Characterization and distribution of binding sites for [3H]-SR 141716A, a selective brain (CB1) cannabinoid receptor antagonist, in rodent brain. *Life Sci* **58**:1239–1247.
- Roeber A, Winkler C, Samii M, Walter GF, Brandis A, Nikkiah G (2001). Comparison of unilateral and bilateral intrastriatal 6-hydroxydopamine-induced axon terminal lesions: evidence for interhemispheric functional coupling of the two nigrostriatal pathways. *J Comp Neurol* **432**:217–229.
- Sauer H, Oertel W (1994). Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* **59**:401–416.
- Schallert T, Norton D, Jones TA (1992). A clinically relevant unilateral rat model of parkinsonian akinesia. *J Neural Transplant Plast* **3**:332–333.
- Scherflier C, Schwarz J, Antonini A, Grosset D, Valdeolmillos F, Marek K, *et al.* (2007). Role of DAT-SPECT in the diagnostic work up of parkinsonism. *Mov Disord* **22**:1229–1238.
- Schuster S, Doudnikoff E, Rylander D, Berthet A, Aubert I, Ittrich C, *et al.* (2009). Antagonizing L-type Ca^{2+} channel reduces development of abnormal involuntary movement in the rat model of L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *Biol Psychiatry* **65**:518–526.
- Schwartz RK, Huston JP (1996). The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol* **50**:275–331.
- Segovia G, Mora F, Crossman AR, Brotchie JM (2003). Effects of CB1 cannabinoid receptor modulating compounds on the hyperkinesia induced by high-dose levodopa in the reserpine-treated rat model of Parkinson's disease. *Mov Disord* **18**:138–149.
- Sieradzka K, Fox S, Hill M, Dick J, Crossman A, Brotchie J (2001). Cannabinoids reduce levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a pilot study. *Neurology* **57**:2108–2119.
- Sidló Z, Reggio PH, Rice ME (2008). Inhibition of striatal dopamine release by CB1 receptor activation requires nonsynaptic communication involving GABA, H_2O_2 , and KATP channels. *Neurochem Int* **52**:80–88.
- Smith Y, Villalba RM, Raju DV (2009). Striatal spine plasticity in Parkinson's disease: pathological or not? *Parkinsonism Relat Disord* **15** (Suppl 3): S156–S161.
- Smith Y, Wichmann T, Factor SA, DeLong MR (2012). Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa. *Neuropsychopharmacology* **37**:213–246.
- Soderstrom KE, O'Malley JA, Levine ND, Sortwell CE, Collier TJ, Steece-Collier K (2010). Impact of dendritic spine preservation in medium spiny neurons on dopamine graft efficacy and the expression of dyskinesias in parkinsonian rats. *Eur J Neurosci* **31**:478–490.
- Staunton DA, Wolfe BB, Groves PM, Molinoff PB (1981). Dopamine receptor changes following destruction of the nigrostriatal pathway: lack of a relationship to rotational behavior. *Brain Res* **211**:315–327.
- Stephens B, Mueller AJ, Shering AF, Hood SH, Taggart P, Arbutnot GW, *et al.* (2005). Evidence of a breakdown of corticostriatal connections in Parkinson's disease. *Neuroscience* **132**:741–754.
- Tadaesky MT, Dombrowski PA, Da Cunha C, Takahashi RN (2010). Effects of SR141716A on Cognitive and Depression-Related Behavior in an Animal Model of Premotor Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis* **2010**:238491.
- Truong L, Allbutt H, Kassiou M, Henderson JM (2006). Developing a preclinical model of Parkinson's disease: a study of behaviour in rats with graded 6-OHDA lesions. *Behav Brain Res* **169**:1–9.
- Ungerstedt U (1971). Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl* **367**:69–93.

- Valverde F (1970). The Golgi method. A tool for comparative structural analysis. In: Nauta WJH, Ebesson S, editors. *Contemporary research methods in neuroanatomy*. New York: Springer. pp. 12–28.
- Van der Stelt M, Fox SH, Hill M, Crossman AR, Petrosino S, Di Marzo V, Brotchie JM (2005). A role for endocannabinoids in the generation of parkinsonism and levodopa-induced dyskinesia in MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. *FASEB J* 19:1140–1142.
- Van Laere K, Casteels C, Lunsken S, Goffin K, Grachev ID, Bormans G, Vandenberghe W (2012). Regional changes in type 1 cannabinoid receptor availability in Parkinson's disease in vivo. *Neurobiol Aging* 33: 620.e1–620.e8.
- Van Vliet SA, Vanwersch RA, Jongsma MJ, Olivier B, Philippens IH (2008). Therapeutic effects of delta9-THC and modafinil in a marmoset Parkinson model. *Eur Neuropsychopharmacol* 18:383–389.
- Villalba RM, Smith Y (2010). Striatal spine plasticity in Parkinson's disease. *Front Neuroanat* 4:133.
- Walsh S, Mnich K, Mackie K, Gorman AM, Finn DP, Dowd E (2010). Loss of cannabinoid CB1 receptor expression in the 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal terminal lesion model of Parkinson's disease in the rat. *Brain Res Bull* 81:543–548.
- Yang J, Sadler TR, Givrad TK, Maarek JM, Holschneider DP (2007). Changes in brain functional activation during resting and locomotor states after unilateral nigrostriatal damage in rats. *Neuroimage* 36:755–773.
- Zaja-Milatovic S, Milatovic D, Schantz A, Zhang J, Montine K, Samii A, et al. (2005). Dendritic degeneration in neostriatal medium spiny neurons in Parkinson disease. *Neurology* 64:545–547.
- Zuardi AW, Crippa JA, Hallak JE, Pinto JP, Chagas MH, Rodrigues GG, et al. (2009). Cannabidiol for the treatment of psychosis in Parkinson's disease. *J Psychopharmacol* 23:979–983.
- Zuch CL, Nordstroem VK, Briedrick LA, Hoernig GR, Granholm AC, Bickford PC (2000). Time course of degenerative alterations in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion. *J Comp Neurol* 427:440–454.