



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON
MELATONINA EN EL MODELO DE
ENFERMEDAD DE PARKINSON INDUCIDO
POR INHALACION DE MANGANESO EN
RATONES.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A

PRESENTA:

**MARIANA STEPHANIA
RODRÍGUEZ ALCÁNTARA**

Directora de tesis: Dra. María Rosa Avila Costa





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“Por mi raza hablará el espíritu”

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Neuromorfología de la
Unidad de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud y la
Educación (UICSE).

Agradecimientos.

Agradezco a la **Universidad Nacional Autónoma de México** como mi alma mater por darme la oportunidad de crecer personal y profesionalmente, a la **Facultad de Estudios Superiores Iztacala** por brindarme los conocimientos necesarios para poder lograr el objetivo de culminar mis estudios en la carrera de Biología.

A mi comité de tesis:

Dra. María Rosa Avila Costa

Dr. José Luis Ordoñez

Mtro. Enrique Montiel

Agradezco el apoyo y orientación que me han brindado desde el inicio para sacar adelante este proyecto, valoro mucho su tiempo y paciencia con el que se dedicaron a explicarme, corregirme y escuchar mis dudas.

A mis asesores, la **Dra. Verónica Anaya** y el **Biol. Alfonso Reyes** por sus valiosos comentarios y observaciones que me ayudaron a mejorar en el proceso.

También agradezco que junto con el gran equipo del laboratorio de Neuromorfología **Ana, José Luis, Jesús, Paty, Oscar, Alan, Joshua y Erick** hemos logrado una agradable y divertida convivencia, así como aprecio mutuo.

Ana Gutiérrez, y **José Luis Ordoñez** los precursores de este importante proyecto, muchas gracias por su apoyo durante todo el proceso, sus explicaciones, sus pláticas, sus clases, su intelecto y su maravilloso amor por la neurociencia, son un gran ejemplo.

María Rosa, muchas gracias por darme la oportunidad de formar parte del laboratorio y poder concluir este maravilloso trabajo, más allá de brindarme asesoría académica me brindaste tu amistad, tu cariño y tu apoyo, eres una gran mentora y amiga, te admiro y aprecio por la humanidad y sencillez con la que nos abres tus brazos para poder aprender de tu gran experiencia, te quiero mucho.

Personales

A mis padres **Eduardo Rodríguez** y **Virginia Alcántara** gracias por sus grandes valores inculcados en mi vida, agradeceré infinitamente el amor, paciencia y apoyo incondicional que me han brindado siempre valoro todo el esfuerzo que les ha costado, gracias por sus sabios consejos que me han ayudado a ser una mejor persona, los momentos en los que me guiaron y me tomaron de la mano para enseñarme a continuar con mi camino, agradezco a la vida por tenerlos, los amo.

A mi hermano **Erick Rodríguez** agradezco tu apoyo y comprensión en este largo camino de la vida, a lado de ti he aprendido a valorar nuestro tiempo y el significado de lo importante que es estar juntos, eres uno de mis principales motivos para seguir adelante, gracias por tu cariño, siempre estaré para ti, te amo.

A mi abuelito **Raúl Rodríguez**, aun cuando no estás conmigo físicamente siempre te llevo en mi corazón, gracias por todo el tiempo que nos regalaste, por cuidarnos y querernos, nos enseñaste una gran parte de la felicidad que puede brindarnos la vida, nunca olvidare las risas, los enojos, los momentos increíbles y únicos que le regalaste a nuestra familia, siempre te vamos a extrañar.

A mi abuelita **Virginia Rodríguez**, gracias por la educación y valores que me inculcaste desde pequeña, me has dado un gran camino a seguir para ir superándome cada día más, te admiro mucho y agradezco todos los momentos que me has regalado, siempre me has enseñado a ser una mujer fuerte e independiente, gracias por todo tu amor y cariño, te adoro Micky.

A mi familia, mis tíos **Jorge, Eva, y Karla Alcántara, Lorena Cruz, David García, Fausto Rosales y Guadalupe Rodríguez** quienes han estado en el transcurso de mi crecimiento personal y profesional, quienes me han cuidado, apoyado, orientado, aconsejado y amado incondicionalmente, me han ofrecido su amistad y su cariño, me motivaron y exigieron llevar un buen camino en mi vida, muchas gracias.

A **Oscar Mejía** por ser mi amigo, mi equipo, mi compañero de vida, por darme tu apoyo infinito en el transcurso de este gran logro, por ser mi mano derecha y darme un empujón cuando es necesario, eres parte fundamental de este proceso y agradezco infinitamente tu amor junto con todas las experiencias y momentos que durante esta etapa de nuestras vidas nos han hecho crecer.

A **Christian Aguilera y Mitzy De La Rosa**, mis mejores amigos, gracias por darme momentos llenos de diversión, anécdotas inolvidables, consejos de vida, gracias por hacer de esta etapa tan importante uno de los mejores recuerdos.

A mis amigos **Frida, Karina y Lomelí** gracias por ser parte del mejor equipo, compartir esos momentos juntos y ser parte de este largo camino, me han dejado grandes e inolvidables y divertidos momentos durante este maravilloso capítulo de nuestra vida.

Gracias a todos, cada uno aportó en mi vida momentos que han formado parte de mi crecimiento, el presente trabajo es el resultado de un camino que he forjado con el apoyo de todos ustedes.

Abreviaturas.

6-OHDA	6-Hidroxidopamina
CAT	Catalasa
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
EP	Enfermedad de Parkinson
GB	Ganglios basales
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía.
GP	Globo pálido
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
GPx	Glutación peroxidasa
GRd	Glutación reductasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
L- DOPA	Levodopa
MAO-B	Monoamino oxidasa B
Mn	Manganeso
Mn(OAc) ₃	Acetato de manganeso
MnCl ₂	Cloruro de Manganeso
MPTP	1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina
NE	Núcleo estriado

NEM	Neuronas espinosas medianas
NDA	Neuronas dopaminérgicas
NST	Núcleo subtalámico
O ₂ ⁻	Superóxido
OH•	Hidroxilo
RL	Radicales libres
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SN	Sustancia nigra
SNc	Sustancia nigra compacta
SNr	Sustancia nigra reticulada
SOD	Superóxido dismutasa
TH	Tirosina hidroxilasa

Índice

Resumen	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Enfermedad de Parkinson.....	3
Aspectos clínicos	3
Anatomía Patológica.....	4
Ganglios Basales.....	4
Ganglios basales y el sistema Dopaminérgico.....	5
Sistemas de proyección estriatal: vía directa e indirecta.....	6
Etiología de la EP	8
Factores Ambientales.....	8
Estrés Oxidativo.....	9
Disfunción Mitocondrial.....	11
Modelos experimentales de la EP	11
MPTP	11
6-OHDA.....	12
Rotenona	13
Inhalación de manganeso (Mn).....	13
Alternativas terapéuticas para la EP	16
Terapia celular y con factores neurotróficos.....	16
Agonistas dopaminérgicos.....	17
Antioxidantes.....	18
Melatonina	18
Justificación	21
Hipótesis	21
Objetivos.....	22
General.....	22
Particular.....	22

Materiales y Método	22
Pretratamiento con melatonina	23
Evaluación motora	23
Prueba de la viga.....	23
Prueba de “reaching Task”.....	24
Inhalación de Mn	25
Sacrificio	25
Tinción de Golgi.	26
Inmunohistoquímica anti tirosina hidroxilasa (TH).	27
Resultados.....	29
Evaluación motora	29
Cuento de espinas dendríticas de las NEM’s en el núcleo estriado	33
Neuronas inmunopositivas a TH en la SNc.	35
Discusión	37
Conclusión.....	40
Referencias bibliográficas.	41

Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) es un proceso neurodegenerativo progresivo caracterizado por la muerte de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y pérdida de dopamina en el núcleo estriado, presentando como consecuencia problemas en la coordinación motora y la cognición; en la presente investigación se utilizó el modelo de EP mediante inhalación de la mezcla de cloruro (MnCl_2) y acetato ($\text{Mn}(\text{OAc})_3$) de manganeso, que promueve la autooxidación de la dopamina produciendo degeneración progresiva y bilateral de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta (SNc) en ratones, por lo que es un el modelo más apegado a lo que sucede en humanos; por otro lado, a la melatonina se le han atribuido importantes propiedades antioxidantes, también, se ha encontrado que 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 enfermedades neurodegenerativas. Por ello se determinó si el pretratamiento con melatonina presenta un efecto neuroprotector contra las alteraciones producidas por la exposición a la mezcla de MnCl_2 y $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ en ratones. Se formaron grupos previamente entrenados para realizar pruebas motoras: 1) grupo control, 2) grupo expuesto a la mezcla de MnCl_2 y $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ sin pretratamiento y 3) grupo expuesto a la mezcla de MnCl_2 y $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ con un mes de pretratamiento con melatonina (10 mg/kg vía oral), se evaluó la coordinación motora mediante las pruebas de coordinación motora fina “reaching task” y viga de equilibrio; se realizó el conteo de espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas y el conteo de neuronas inmunorreactivas a tirosina hidroxilasa (TH) en la SNc. Nuestros resultados muestran que los animales pretratados con melatonina presentaron mejor coordinación motora, así como menor pérdida de espinas dendríticas y de neuronas inmunopositivas a TH, en comparación con los animales que no recibieron pretratamiento; por lo que el pretratamiento con melatonina tiene efecto neuroprotector.

Abstract

Parkinson disease is a neurodegenerative process characterized for dopaminergic neurons loss of the substantia nigra and dopamine depletion in the striatum, and as consequence motor coordination and cognitive alterations. Here we used the experimental model of inhalation of the mixture of $MnCl_2$ and $Mn(OAc)_3$ for inducing Parkinson disease. This model promotes the auto-oxidation of the dopamine (DA), inducing bilateral and progressive degeneration of the dopaminergic neurons in the SNc in mouse, which is a more similar model to what happens in humans. On the other hand, melatonin has antioxidant properties, and increases the activity of complex I and IV of the respiratory chain, furthermore it has been suggested that this action contributes to the protective effect in neurodegenerative diseases. Therefore, in this study it was determined if the pre-treatment with melatonin have a neuroprotective effect against alterations produced by the exposure to the mixture of $MnCl_2$ and $Mn(OAc)_3$. Before Mn inhalation, three groups were trained for motor performance (control group, exposed to Mn mixture without pretreatment and pretreatment groups) for motor tests, it was evaluated the motor coordination through the single-pellet reaching task and in the narrow beam were counted dendritic spines in medium-size spiny neurons of the striatum and the number of TH-immunoreactive neurons in the SNc. Our findings show that melatonin pretreated animals had better motor coordination as well as less dendritic spines loss and TH immunoreactive neurons compared with the animals that received pretreatment. Therefore, melatonin pretreatment has a neuroprotective effect.

Introducción

Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor prevalencia después del Alzheimer (Willis, 2013; Schapira, 2013). Este trastorno está puede presentarse por lo regular en edades medias/avanzadas con progresión gradual y evolución prolongada, además es incapacitante e incurable. La prevalencia estimada de la EP es del 0.3% en población general y del 3% en mayores de 60 años. En México la prevalencia varía de 40 a 50 casos por 100000 habitantes/año (Ventura et al., 2019). La EP fue descrita por James Parkinson en 1817 donde se refiere al síndrome de “parálisis agitante” como *“Movimientos temblorosos involuntarios con disminución de la fuerza muscular, en zonas que no están en actividad e incluso cuando se les ayuda; propensión a inclinar el tronco hacia adelante y pasar de la marcha a la carrera, mientras que los sentidos y el intelecto permanecen inalterados”* (Micheli, 2006). Los primeros síntomas de la EP son evidentes tras la depleción de aproximadamente el 80% de las neuronas dopaminérgicas (NDA) (Tanner, 1989).

Aspectos clínicos

Los individuos con EP regularmente presentan postura encorvada, rigidez y lentitud en los movimientos, inexpressividad facial, temblor rítmico tras la relajación completa, por lo general el temblor es más pronunciado en las manos, aunque también puede afectar a piernas, labios, lengua y músculos del cuello, además se observa marcha festinante (Flint et al., 1994). A medida que la enfermedad avanza, las palabras se tornan “apenas entendibles”, la saliva cae con frecuencia de la boca y presentan incapacidad para controlar los esfínteres (Micheli, 2006), sin embargo, no existen alteraciones sensitivas y el deterioro intelectual no es una característica constante en las fases iniciales (Flint et al., 1994).

Anatomía Patológica

La EP es un desorden neurodegenerativo, en la cual se observa pérdida neuronal y gliosis reactiva en las neuronas que sintetizan dopamina en el tallo encefálico (sustancia nigra compacta), junto con inclusiones de alfa sinucleína denominadas cuerpos de Lewy. Los estudios bioquímicos demuestran disminución en la concentración de dopamina (DA) en el núcleo caudado y en el putamen por lo que se considera una enfermedad del sistema neuronal por afectación primordial del sistema dopaminérgico nigroestriatal (Flint et al., 1994). Esta pérdida es causada, probablemente, por la sobreexpresión y mal plegamiento de proteínas tales como α -sinucleína, lo que genera malformaciones estructurales que llevan a la disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial y a la formación de cuerpos de Lewy (Lansbury, y Brice, 2002). La formación de los cuerpos de Lewy se debe a un proceso de mal funcionamiento iniciado por la α -sinucleína que induce polimerización de la proteína TAU, llevando a su hiperfosforilación, la α -sinucleína hiperfosforilada se presenta hasta en un 90% en los individuos que presentan Parkinson (Waxman y Giasson, 2011).

Ganglios Basales

Como se mencionó, los Ganglios basales (GB) son las estructuras cerebrales relacionadas con la EP y poseen un papel importante en la conducta motora, cognición, emociones y aprendizaje; son un grupo de núcleos localizadas en telencéfalo, diencefalo y mesencéfalo constituidas por: Núcleo Estriado (NE) (Caudado y Putamen), Globo Pálido (GP, interno y externo) en sus porciones externa e interna, sustancia nigra reticulada (SNr) y compacta (SNc), núcleo Subtalámico (NST) (Albin et al., 1989).

Anatomía de Ganglios Basales

Desde el punto de vista anatómico se pueden subdividir en dorsales y ventrales; los núcleos de la porción dorsal incluyen al NE, Globo pálido interno (GPi) y globo pálido externo (GPe), NST, SNr y SNc (Ospina, 2017). El NE se le considera como el núcleo de entrada hacia los GB y se desarrolla en la porción telencefálica mientras que el GPi y la SNr constituyen los núcleos de salida, el NST está en la porción basal del diencefalo y la sustancia nigra en el mesencéfalo, y presenta dos porciones, una ventral (SNr) y la dorsal (SNc) la cual está compuesta de células dopaminérgicas pigmentadas con neuromelanina en los primates

(DeLong y Georgopoulos, 2011), la neuromelanina se forma a partir de procesos de oxidación de DA y su biosíntesis tiene lugar en el mesencéfalo, específicamente en la SNc, en los trastornos neurodegenerativos como la EP donde la síntesis de ésta es alterada, puede observarse en preparaciones histológicas de la sustancia nigra en donde el hecho más evidente es la pérdida del color oscuro característico de esta región (Hirsch et al., 1988).

Ganglios basales y el sistema Dopaminérgico

La DA es una catecolamina neuromoduladora que participa en diversas funciones como la actividad motora, cognición, emoción, secreción hormonal, entre otras (Missale et al., 1998), el sistema dopaminérgico está involucrado en algunas patologías como la EP debido a la inadecuada regulación de la transmisión dopaminérgica, las aferencias dopaminérgicas dentro de los GB llegan al NE provenientes de la SNc y del área ventral tegmental (Wilson, 1993). La SN está compuesta por dos tipos de neuronas, las GABAérgicas, que se encuentran en la SNr mientras que las NDA están principalmente en la SNc y proyectan al caudado-putamen (neoestriado NE) constituyendo la vía nigroestriatal, y a prácticamente todos los núcleos que conforman los GB (Fallon y Moore, 1978; Haber et al., 2000; Lin et al., 2010).

El NE está constituido por un 95% de neuronas GABAérgicas de proyección llamadas neuronas espinosas medianas (NEM), las cuales tienen el papel de modular la información proveniente de la corteza (Schmidt et al., 1996) y su característica morfológica es la alta densidad de espinas dendríticas localizadas en la porción distal del árbol dendrítico (Wilson y Groves, 1981) los axones dopaminérgicos nigro estriatales hacen sinapsis con el cuello de las espinas dendríticas de las NEM del estriado (Freund et al., 1984), el efecto de la dopamina sobre las neuronas estriatales puede ser tanto aumento como disminución de la descarga de potenciales de acción (Kitai et al., 1976). Es necesario mencionar que las neuronas estriatales expresan dos tipos de receptores dopaminérgicos distintos (receptores D1 y D2) cuya estimulación produce efectos antagónicos (Gómez et al., 2014) por lo que la degeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal afecta directamente la actividad de las NEM ya que se sabe que la transmisión dopaminérgica regula la morfogénesis de la NEM (Smith et al., 2009) por ello la denervación dopaminérgica está asociada a la reducción de la densidad de espinas dendríticas (Ingham et al., 1999)

Sistemas de proyección estriatal: vía directa e indirecta

El NE es el principal núcleo de entrada del circuito de los GB y a su vez el GPi y la SNr representan los principales núcleos de salida, formando un circuito que proyecta información hacia el tálamo y la corteza cerebral (Obeso y Lanciego, 2011). Para procesar, integrar y transmitir el flujo de información proveniente de la corteza cerebral a través de los GB el circuito motor se basa en dos vías, la “vía directa” y la “vía indirecta” (Smith et al., 1998).

Ambas vías inician en el NE, la diferencia radica en que la vía directa proyecta directamente hacia los núcleos de salida (GPi y SNr) (Reiner y Anderson, 1990; Alexander y Crutcher, 1990) mientras que en la vía indirecta las neuronas estriatales proyectan al GPe y de ahí las eferencias GABAérgicas proyectan al NST cuyas proyecciones glutamatérgicas excitatorias conectan con los núcleos de salida (GPi y SNr) (Nakanashi y Kita, 1987; Smith y Parent, 1988). El incremento en la actividad de ambas vías se ha relacionado con la facilitación del movimiento (vía directa) y con su inhibición (vía indirecta), la EP es el resultado del desbalance en la actividad de ambas vías (DeLong, 1990).

En la figura 1 observamos de manera esquemática y simplificada, el modelo de la anatomía funcional del circuito motor en donde explica que las NEM de la vía directa expresan receptores de la familia D1 y las de la vía indirecta los receptores de la familia D2 (Hardman et al., 1996). La activación de ambas vías produce efectos opuestos, la vía directa conformada por neuronas GABAérgicas del NE (NEM de proyección) que proyectan hacia la SNr/GPi. Esta vía es activada por el glutamato (proveniente de la corteza) y modulada por la dopamina (proveniente de la SNC), esta actividad induce la inhibición de los núcleos de salida de los GB, que por ser también GABAérgica y estar inhibida, desinhibe los núcleos talámicos ventral lateral y ventral anterior. Como resultado, la vía tálamo cortical es estimulada y los movimientos iniciados corticalmente son facilitados. La vía indirecta está compuesta por neuronas estriatales (otra población de NEM de proyección), que son GABAérgicas y que proyectan hacia el GPe. La inhibición del GPe desinhibe el NST (formado por neuronas glutamatérgicas de proyección), lo que trae como resultado la excitación de los núcleos de salida de los GB, provocando la inhibición talámica, lo que reduce la estimulación tálamo-cortical de las áreas motoras precentrales resultando en la disminución del movimiento voluntario (Hardman et al., 1996; Ropper y Samuels, 2007).

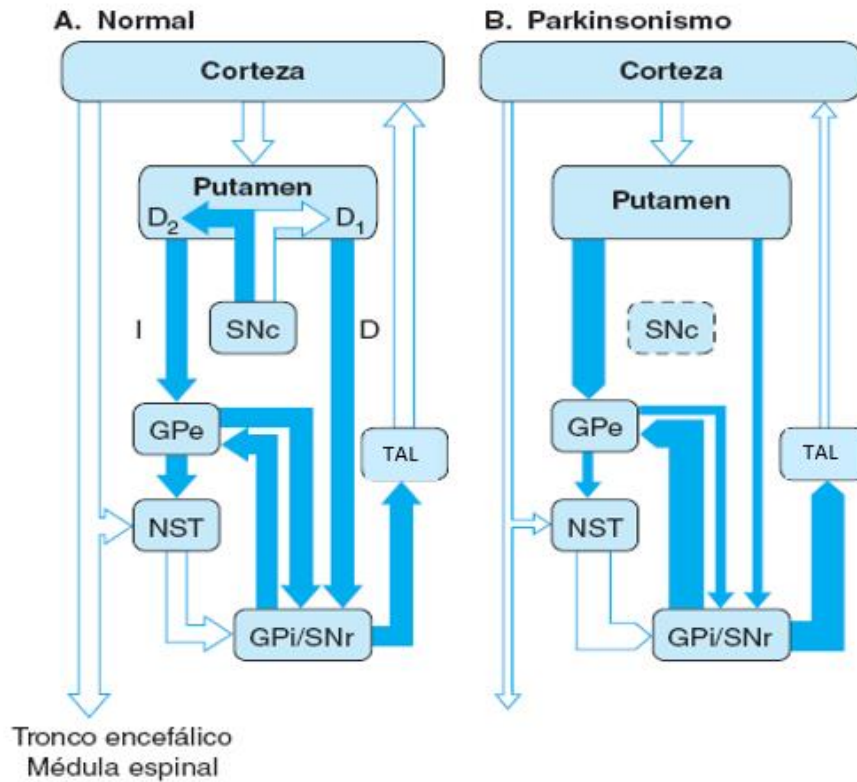


Figura 1. Modelo esquemático de la anatomía funcional del circuito motor (Corteza-ganglios basales-tálamo-corteza) mostrando las líneas paralelas directa e indirecta. Las flechas blancas representan conexiones glutamatergicas (GLU) excitatorias, mientras que las flechas azules muestran las conexiones inhibitorias. (A) **Circuito normal** en donde la vía directa incluye al globo pálido interno (GPe) y la Sustancia nigra reticular (SNr), mientras que la vía indirecta incluye el Globo pálido externo (GPe) y al Núcleo subtalamico (NST). La dopamina (DA) proveniente de la sustancia nigra pars compacta (SNc) ejerce funciones diferenciales sobre las proyecciones de la vía directa e indirecta, mediante la activación de los receptores D1 y D2, respectivamente. El GPe/SNr proyecta de regreso hacia la corteza cerebral vía tálamo (TAL). (B) **Circuito con parkinsonismo**, el resultado que se presenta después de la pérdida dopaminérgica en todo el circuito está indicado por el grosor de las líneas. La hiperactividad glutamatergica del NST, es la posible causa de los síntomas parkinsonicos, ya que se incrementa la actividad de la SNr y el GPe, y se sobre inhibe el circuito tálamo-cortical. Modificado de Wichman y DeLong (1993).

En otras palabras, la disminución de DA estriatal provoca aumento en la densidad de los receptores D2 y decremento de los receptores D1 (Joyce, 1991), estas alteraciones inducen cambios funcionales en los circuitos de los GB disminuyendo la actividad de la vía directa y aumentándola en la vía indirecta; lo que trae como resultado la sobre inhibición talamocortical que es la causante del temblor, rigidez y bradicinesia en pacientes con EP (DeLong, 1990); también, como consecuencia de la depleción dopaminérgica se ha observado, a nivel ultraestructural incremento en el tamaño de los botones presinápticos, aumento en el número de sinapsis perforadas así como cambios en los blancos postsinápticos, observándose menos contactos con espinas dendríticas (Colin-Barenque, 1994; Avila-Costa, 1996; Avila-Costa et al., 2005; 1998).

Etiología de la EP

La neurodegeneración de las NDA inicia algunos años antes de que la EP sea sintomática y dificulta establecer la causa del desarrollo de la enfermedad; algunos factores genéticos y ambientales han sido relacionados con la etiología de la enfermedad (Mizuno et al., 2001). Aunque se sabe que en el 10% de los casos el origen es genético, de transmisión mendeliana; la gran mayoría (el 90%) se cataloga como EP esporádica, definida como poligénica y multifactorial (Ventura et al., 2019). Por ello se han establecido diferentes hipótesis sobre su origen entre los cuales incluyen:

Factores Ambientales

Se propone que a lo largo de su vida el individuo pudo haber sido expuesto a muchos agentes tóxicos, o inclusive, a la interacción entre ellos, que le hayan conferido cierta vulnerabilidad a la neurodegeneración dopaminérgica (McGuire et al., 2011). El primer incidente que permitió correlacionar claramente la exposición a factores exógenos con neurotoxicidad en el sistema nigroestriatal sucedió a comienzos de los años 80, cuando un grupo de jóvenes se inyectaron intravenosamente 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP), y desarrollaron alteraciones motoras de tipo parkinsoniano (Langston et al., 1984). Esto sugirió la existencia de sustancias tóxicas ambientales causales de EP idiopática.

Diversos estudios epidemiológicos sugieren la relación entre la industrialización y el uso de agroquímicos como factores de incidencia de la EP, como por ejemplo el paraquat y la rotenona (Betarbet et al., 2002).

Factores Genéticos

Durante los últimos años se han identificado varios genes relacionados con la susceptibilidad y locus de riesgo asociados con la EP, las investigaciones se han centrado en las mutaciones de los genes **SNCA**(PARK 1/PARK 4) que es el primer gen de transmisión autonómica dominante identificado en la EP (Hernández et al., 2016), la mutación en el gen **GBA**, que es el mayor factor de riesgo genético para desarrollar EP (Kalia y Lang, 2015) y la forma más frecuente es el gen **LRRK2** (PARK 8) que representa el 4% de la EP hereditaria (Ferreira y Massano, 2017). También se han determinado polimorfismos en el gen de la catecol-O-metiltransferasa (**COMT**) que es el regulador de los niveles de DA sináptica (Foltynie et al., 2004) así como la mutación en el gen que codifica la proteína α -sinucleína, la cual está relacionada con apoptosis, supervivencia neuronal bajo condiciones de estrés oxidativo y forma los cuerpos de Lewy. Tres genes están asociados a la EP e implicados en la formación de los cuerpos de Lewy: PARK 1, PARK 2 Y PARK (Polymeropoulos, 1997; Krüger 1998), sin embargo, aún se desconoce cómo están relacionadas las mutaciones de los tres genes en el desarrollo de los cuerpos de Lewy y, cómo se asocian con el estrés oxidativo (Gómez et al., 2012).

Estrés Oxidativo

Las propiedades oxidativas del oxígeno juegan un papel importante en los fenómenos biológicos, y puede provocar daño dentro de las células, principalmente a través de la formación de especies reactivas de oxígeno como: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilos ($OH\bullet$) y superóxido (O_2^-) (Fhan y Coenen, 1992). Parece probable la implicación de procesos de estrés oxidativo en la patogénesis de esta enfermedad (Larumbe et al., 2001) debido al metabolismo oxidativo de la DA para producir H_2O_2 y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) (Halliwell y Gutteridge, 1985), es decir, el estrés oxidativo es una condición dañina para las NDA y resulta de la eliminación deficiente de las ROS que se generan por las reacciones relacionadas con la dopamina, normalmente estas ROS son eliminadas por el sistema antioxidante intracelular, sin embargo por envejecimiento o alguna alteración

patológica éste se encuentra dañado (Sohal y Weindruch, 1996). Entonces cuando este sistema no se mantiene en balance ya sea por pérdida o disminución del sistema protector o por aumento en la producción de los radicales libres, el tejido entra en “estrés oxidativo” que provoca la destrucción de macromoléculas celulares como proteínas, ADN, carbohidratos y lípidos (Oyama et al., 1996; Clarke, 1999).

En la EP se ha reportado que el estrés oxidativo es el principal causante del deterioro de las NDA en la SNc (Hattori et al., 2009), la muerte neuronal en la SNc se puede dar por (Olanow y Tatton, 1999):

- a) Incremento en el recambio de DA que da como resultado el exceso en la formación de H_2O_2 .
- b) Deficiencia del glutatión peroxidasa, que como consecuencia disminuye la capacidad de limpiar H_2O_2 .
- c) Incremento en el hierro reactivo, que promueve la formación de (OH^-)

Los mecanismos principales por los cuales se pueden generar radicales libres en la EP son por medio de (Ebadi et al., 1996; Birben et al., 2012):

1. Reacción de Haber-Weiss, donde se generan radicales libres (OH^-) a partir de H_2O_2 y del O_2 .
2. Reacción de Fenton donde se generan radicales O_2^- y (OH^-) en presencia de fierro.

Mediante la reacción de Fenton se induce la auto oxidación de la DA para formar el OH^\bullet , el cual se considera el radical más dañino (Ebadi et al., 1996; Barzilai et al., 2001 y Cardoso et al., 2005). Existen diversos estudios que apoyan la teoría que el estrés oxidativo aumenta en la EP, especialmente en la SNc (Jenner y Olanow, 1996).

En la EP las células de la SNc parecen estar en un elevado estado de estrés oxidativo, lo que se deduce por el aumento en productos de la oxidación de lípidos, proteínas y DNA; en la SNc de pacientes parkinsonianos es posible detectar las alteraciones oxidativas utilizando diferentes marcadores como el malondialdehído, el cual se encuentra hasta diez veces más de su valor normal (Gómez et al., 2012).

Adicionalmente, la concentración de glutatión se encuentra disminuido en la EP (Schul et al., 2000), mientras se incrementa la actividad del superóxido dismutasa, así como los niveles de

Fe^{2+} (Marttila et al., 1988), el cual funciona como catalizador de la reacción de Fenton y por tanto promueve el incremento en la generación de radicales libres (RL) resultando en estrés oxidativo, que provoca la degeneración progresiva de las NDA de la SNc (Dexter et al., 1989).

Disfunción Mitocondrial

En la actualidad se ha propuesto que el mecanismo de acción de una gran cantidad de los agentes tóxicos empleados como modelos, involucra la inhibición del complejo I mitocondrial y la generación de ROS, por lo que el papel de la mitocondria durante el desarrollo de la EP es fundamental (Alarcón et al., 2010). La primera evidencia se reportó en el Parkinson inducido por MPTP que produce deficiencia en el complejo I y daño oxidativo solo en la SNc confiriendo toxicidad y muerte neuronal (Ebadi et al., 2001), sin embargo, es poco probable que la mayoría de los casos de EP sea explicada por una sola causa (Olanow y Tatton, 1999).

Modelos experimentales de la EP

Actualmente se utilizan algunas neurotoxinas para modelar algunos rasgos fisiopatológicos de la EP, como, por ejemplo: el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP) 6-hidrohidropamina (6-OHDA), y rotenona entre otros; con el fin de recrear y estudiar los mecanismos básicos que regulan la función neural tanto a nivel celular, molecular o conductual de la enfermedad (Anaya, 1997) y así probar nuevos posibles tratamientos.

MPTP

El cuadro parkinsoniano generado por este compuesto neurotóxico en los individuos se caracteriza por temblor, acinesia, rigidez, postura en flexión, alteración de los reflejos posturales y, todo ello se revierte con la administración de L-DOPA o agonistas dopaminérgicos (Alarcón et al., 2010); este compuesto químico tiene la capacidad de atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica debido a que la enzima monoamino oxidasa B (MAO-B) metaboliza de MPTP a 1-metil,1-4-fenilpiridinio (MPP^+) por oxidación espontánea en los astrocitos. El MPP^+ es liberado por los astrocitos al espacio extracelular. Es una molécula polar y depende de los transportadores de membrana plasmática para entrar en la célula, por ello es selectivamente incorporado por las NDA a través del transportador

de dopamina (DAT), una vez dentro de la célula inhibe el complejo I mitocondrial (Alarcón et al., 2010; Bezard et al., 1999; Dauer y Przedborski, 2003) y ocasiona la generación de ROS, así como el decremento del contenido de ATP y del potencial redox (Przedborski y Vila., 2003; Alexi et al., 2000).

Algunas de las limitaciones de este modelo son, el hecho de que la muerte neuronal se da en un lapso muy corto (la EP es un padecimiento lento y progresivo) y existe susceptibilidad entre especies, se ha reportado que los ratones son más susceptibles que las ratas a este compuesto (Russo et al., 1994), no se observan los característicos cuerpos de Lewy y algunos animales con lesión de leve a moderada muestran recuperación espontánea (Morrow et al., 2012).

6-OHDA

En el desarrollo de modelos experimentales de EP, la 6-OHDA es la neurotoxina más utilizada, se ha observado que induce la muerte de neuronas adrenérgicas de los ganglios simpáticos, y carece de acción tóxica a nivel del sistema nervioso central cuando es administrada vía sistémica, sin embargo, cuando la administración es por inyección intracerebral se produce la muerte selectiva de neuronas catecolaminérgicas (dopaminérgicas de la SNc y sus terminales en el núcleo estriado) debido a su alta afinidad por el sistema de transporte de catecolaminas (Ungerstedt, 1968; Blum et al., 2001).

Diversos estudios han mostrado que la 6-OHDA posee acción inhibitoria de la cadena respiratoria mitocondrial y la muerte neuronal está ligada a la formación de H₂O₂, radicales libres y quinonas (Przedborski y Ischiropoulos, 2005). Algunas de las principales desventajas de este modelo son:

1. La 6-OHDA no puede cruzar la barrera hematoencefálica, debe ser administrada localmente mediante inyección esterotáxica dentro de la SNc, el haz medial del cerebro anterior o el núcleo estriado, ya sea bilateral o unilateralmente (Dauer y Przedborski, 2003), esto provoca mayor invasión al sistema y se corre el riesgo de que los animales lesionados de esta manera mueran debido a que presenten marcada adiposidad y afagia (Ungerstedt, 1971).
2. No se detectan los cuerpos de Lewy característicos de la EP.
3. Es un modelo agudo (Betarbet et al., 2002).

Rotenona

Este compuesto es un isoflavonoide de origen vegetal que se utiliza como insecticida (Schuler y Casida, 2001). Este modelo reproduce algunas características neuroquímicas, histológicas, patológicas y conductuales de la EP, con degeneración predominante de la zona nigroestriada, se observa la inclusión de cuerpos de Lewy y deficiencias motoras como hipocinesia, rigidez con postura encorvada y temblores en uno o más miembros (Betarbet et al., 2000), también actúa como inhibidor del complejo I mitocondrial, además, la acumulación de daño por estrés oxidativo conduce a la apoptosis dependiente de la caspasa 3 en las NDA (Alarcón et al., 2010).

Algunas de las desventajas de este modelo son, la susceptibilidad de los animales, ya que algunos muestran alteraciones y otros no, también el daño celular se extiende a otros grupos neuronales y es importante señalar que la tasa de mortalidad es muy alta, ya que la rotenona es altamente tóxica para varios órganos como el corazón, hígado, riñones y el tracto intestinal (Blandini y Armenteno, 2012; Bertabet et al., 2002).

A pesar de que existen diferentes modelos animales para el estudio de EP, ninguno representa el curso temporal y las alteraciones neuropatológicas y motoras observadas en humanos con esta enfermedad, por ello en nuestro laboratorio se ha desarrollado el modelo por inhalación de dos compuestos de manganeso, cloruro de Manganeso ($MnCl_2$) y Acetato de Manganeso ($Mn(OAc)_3$).

Inhalación de manganeso (Mn)

El Mn es el doceavo elemento más abundante en la corteza terrestre y está presente en rocas, suelo y agua, existe en componentes orgánicos e inorgánicos, las formas más comunes en el ambiente son las inorgánicas, se encuentra en frutos secos, semillas, chocolate, leguminosas, almejas, fruta y vegetales con hojas (Sistrunk et al., 2007). Tiene 2, 3, 4, 6 y 7 estados de oxidación (Pérez, 2019). El Mn inorgánico se utiliza en la producción de hierro y acero, en la manufactura de baterías, de vidrio, blanqueamiento de textiles, cerillos y fuegos pirotécnicos, sustancias químicas, fungicidas, y como agentes de contraste en las imágenes de resonancia magnética (Santamaría, 2007).

En ambientes biológicos el Mn existe como Mn^{+2} y Mn^{+3} , y el 80% de Mn^{+2} en plasma está unido a la β 1-globulina y albúmina: una fracción pequeña de Mn se une a la transferrina y al unírsele se forma un complejo en donde el Mn se encontrará exclusivamente como Mn^{+3} (Foradori, 1967; Aisen et al., 1969)

Papel biológico del Mn

Es requerido para reacciones enzimáticas que incluyen la síntesis de proteínas, lípidos y carbohidratos (Takeda, 2003); es necesario para el crecimiento y desarrollo normal, para un buen desarrollo y para la homeostasis celular (Erikson et al., 2005). Tiene un papel fundamental en el desarrollo del cerebro como cofactor de varias enzimas involucradas en la síntesis y metabolismo de neurotransmisores, por ejemplo, la glutamina sintetasa (Takeda, 2003), arginasa (Shishova et al., 2009), piruvato descarboxilasa (Zwingmann et al., 2004) y superóxido dismutasa mitocondrial (Heran et al., 2003). El Mn se ha relacionado con la formación de ROS con los estados divalente y trivalente del metal, sin embargo, se ha mostrado que el Mn^{+2} elimina las ROS, las especies reactivas de superóxido y los $OH\cdot$ (De Rycker y Halliwell, 1978; HaMai et al., 2001).

Absorción, bioacumulación, distribución, metabolismo y excreción del Mn

Aproximadamente del 3-5% del Mn ingerido se absorbe por el tracto gastrointestinal y se envía al hígado por la vena porta, el resto es excretado en las heces, cualquier exceso de Mn se excreta a través de la bilis (Au et al., 2008); el Mn absorbido a través de los pulmones se considera la fuente principal de toxicidad en humanos, las partículas con un diámetro menor a 5 μm llegan a los alveolos pulmonares en donde se absorbe en forma iónica y pasa al flujo sanguíneo para ser transportado a los tejidos (Andersen, 1999).

El Mn se acumula principalmente en el cerebro, y puede entrar por diferentes rutas:

1. Mediante las células endoteliales de los capilares cerebrales de la barrera hematoencefálica (Rabin et al., 2006).
2. Mediante el plexo coroideo hacia el fluido cerebroespinal (Murphy et al., 1991).
3. Mediante el nervio olfatorio hacia la cavidad nasal directo al cerebro (Brenneman et al., 2000).

El Mn ingresa a las células mediante el transportador de metales divalente tipo I (DMT1), transportador de solutos ZIP-8, receptor de transferrina, canales de calcio, entre otros; sin embargo, ninguno de éstos parece ser específico del Mn (Kwakye et al., 2015); la captación neuronal de Mn involucra a la transferrina y al transportador de dopamina (DAT) (Suarez y Eriksson, 1993).

El Mn tiende a acumularse en regiones dopaminérgicas, específicamente en los ganglios basales (Aschner et al., 2005). La degeneración dopaminérgica asociada a la exposición de Mn y a la EP comparten mecanismos moleculares como la disfunción mitocondrial, la disminución de energía celular, la agregación de proteínas y activación de vías de muerte celular necrótica y apoptótica, así como el estrés oxidativo (Milatovic et al., 2009), el Mn induce la autooxidación de la DA, seguida de la formación de quinonas tóxicas y depleción de DA (Takeda, 2003).

Otros estudios reportan que el Mn^{+2} produce aumento en la generación de ROS, pero esta actividad oxidante es bloqueada mediante un quelador de metales trivalentes (DFO). Por ello se propone que aun cuando el Mn^{+2} no tiene propiedades oxidantes intrínsecas, la presencia de Mn^{+3} en cantidades traza promueve la formación de radicales libres, quinonas tóxicas que son producto de la autooxidación de la DA mediada por Mn (Archibald y Tyree, 1987), esto indica que el Mn^{+3} puede tener un efecto catalítico en la oxidación del Mn^{+2} (Archibald y Tyree, 1987; HaMai et al., 2001).

Ordoñez-Librado y colaboradores en 2008; Sánchez-Betancourt y colaboradores en 2012 establecieron el modelo de inhalación de la mezcla de Mn^{+2} y Mn^{+3} en ratones y ratas, lo anterior proporcionó las bases para lograr representar los principales eventos de la EP, como las alteraciones motoras que empeoran con el transcurso del tiempo y que son irreversibles, que responden de forma positiva al tratamiento con L-DOPA (Ordoñez-Librado et al., 2010) al igual que en el contexto clínico, donde la respuesta positiva e inmediata a este fármaco confirma el diagnóstico de esta enfermedad (Zuazua-Vidal et al., 2019), así como la pérdida de NDA cambios morfológicos en el NE (pérdida de espinas dendríticas) y depleción de DA en los GB.

Por ello tenemos elementos para decir que el modelo de inhalación de la mezcla de Mn es una herramienta válida y confiable para el estudio de la EP; sin embargo, en el modelo hasta este momento no se han reportado la presencia de cuerpos de Lewy (característicos de la EP); y en cuanto al tiempo de experimentación este modelo tiene una larga duración a comparación de los modelos anteriores.

Alternativas terapéuticas para la EP

Los tratamientos actuales comprenden tratamientos tanto farmacológicos como quirúrgicos, pero a pesar de los avances ninguno de éstos consigue modificar el curso clínico de la enfermedad (Rascol et al., 2003), a continuación, se mencionan algunas alternativas terapéuticas:

Terapia celular y con factores neurotróficos

El objetivo principal de esta terapia consiste en reemplazar las células que han degenerado por otras que puedan suplir su función, normalmente estas células implantadas en la sustancia nigra son células productoras de DA e idealmente debería restaurar la conectividad funcional de la vía nigro-estriatal (Garbayo et al., 2006), para ello se han utilizado los siguientes tipos celulares:

- Células madre fetales y adultas.
- Células de la carótida (productoras de DA y de factores neurotróficos).
- Células de médula suprarrenal (productoras de DA).
- Células que liberan factores tróficos y promotores de supervivencia neuronal (células de Schwann, astrocitos, y células modificadas genéticamente para producir estos factores) (Espejo et al., 1998; Rosenblad et al., 1998; Shingo et al., 2002).

Sin embargo, los inconvenientes más frecuentes que surgen con la terapia celular son: infecciones, rechazos, en caso de que las células no sean del propio individuo y degeneración de las células implantadas (Garbayo et al., 2006).

Los factores neurotróficos también regulan la proliferación, supervivencia, migración y diferenciación de todos los tipos celulares del sistema nervioso, además de regular el establecimiento de las conexiones adecuadas, tanto en fases del desarrollo embrionario como en el adulto, entre ellos el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) es el más apropiado

para el tratamiento de dicha patología, ya que es el factor neurotrófico más potente descrito hasta la fecha (Beck et al., 1995) ya que ejerce una acción trófica más potente sobre las neuronas dopaminérgicas (Mínguez y Escamilla, 2005)

Agonistas dopaminérgicos

La 2-bromo- α -ergocriptina (bromocriptina) fue el primer agonista dopaminérgico propuesto, y es utilizada para las etapas iniciales de la EP debido a que retarda las complicaciones motoras inducidas por la administración de largo plazo de L-Dopa (Ramaker et al., 2000; Segura et al., 2003), sin embargo, induce efectos colaterales como náuseas, vómito, confusión y alucinaciones (Molina et al., 1999). Avila-Costa et al., (2005) reportaron que en el modelo de EP inducido con 6-OHDA, el tratamiento con bromocriptina atenuó el efecto neurotóxico.

La apomorfina es otro agonista dopaminérgico, el cual se puede administrar por vía subcutánea, sublingual y rectal, pero se ha reportado que la administración intermitente de apomorfina puede causar problemas adversos como inflamación de la piel (paniculitis), costras y obstrucción nasal (Radad et al., 2005; Gutiérrez-Valdez, 2013).

En la actualidad, el tratamiento más común para manejar los síntomas motores asociados a EP, es la terapia de remplazo de DA, (Lang, 2009; Obeso et al., 2010). El tratamiento más usado es con el precursor de dopamina Levodopa (L-DOPA), se utiliza el precursor debido a la incapacidad de la DA para cruzar la barrera hematoencefálica (Mercuri y Bernardi, 2005), sin embargo la L-DOPA pierde su eficacia tras algunos años debido a que la muerte neuronal continua, y por ello la dosificación tiene que ser incrementada y, en la mayoría de los pacientes, la administración crónica de L-DOPA causa discinesias (Ahlskog y Muentner, 2001) las cuales afectan a los pacientes al grado de incapacitarlos para continuar con sus actividades (Whetten-Goldstein et al., 1997).

Durante el tratamiento crónico (5-10 años) se presentan algunos efectos secundarios (Ahlskog y Muentner, 2001) por ejemplo, cuando la dosis de L-DOPA no es suficiente para mejorar los síntomas de la enfermedad, antes del tiempo indicado para la siguiente dosis se le conoce como la “pérdida del efecto al final de la dosis” o wearing-off y cuando la complicación se presenta después de un tiempo impredecible, la cual consiste en periodos de

buena respuesta a la L- DOPA y periodos de poca respuesta a este fármaco se le conoce como estado “ efectivo-inefectivo” u on-off (Samadi et al., 2006) .

Por ello, algunas alternativas para prolongar la eficacia de la L-DOPA o, al menos disminuir la severidad de las discinesias es a través de la administración conjunta de inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa como de la monoaminoxidasa (MAO), o con Amantadina, por su papel como antagonista de receptores glutamatérgicos de tipo NMDA (Jankovic y Stacy, 2007).

Otro tratamiento empleado comúnmente es el pramipexol que estimula los receptores D3 y en menor grado los D2 y D4 (Piercy, 1998) que se ha evaluado contra placebo, con la demostración de eficacia absoluta en el control de la sintomatología (Linazasoro, 2004), comparado con la L-DOPA el pramipexol presenta menor incidencia de discinesias y fluctuaciones motoras; sin embargo se han descrito efectos indeseables con el uso de este fármaco, como alteraciones en la memoria verbal a acorto plazo, en las funciones ejecutivas en la fluidez verbal en comparación con los pacientes tratados con L-DOPA (Brusa et al., 2003).

Antioxidantes

La propuesta de utilizar estrategias terapéuticas basadas en fármacos con propiedades antioxidantes se debe a que las enzimas antioxidantes juegan un papel muy importante en la protección contra el estrés oxidativo, que desempeña un papel significativo en la neurodegeneración de la EP (Rao et al., 1990; Chance et al., 1979), algunos de estos como la vitamina E, la co-enzima Q y la melatonina se han propuesto ampliamente como estrategias terapéuticas (Chandan et al., 2004;Cardoso et al., 2005; León et al., 2005).

Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una neurohormona sintetizada principalmente en la glándula pineal a partir del aminoácido triptófano, que posteriormente se convierte en 5-hidroxitriptamina a través de las enzimas triptófano hidrolasa y 5-hidroxitriptófano descarboxilasa (Hardeland et al., 2011). A partir de este momento, la 5-hidroxitriptamina se transforma en N-acetilserotonina por acción de la N-acetil transferasa (NAT), la enzima limitante en la síntesis de melatonina y finalmente, la N-acetilserotonina

es convertida en melatonina mediante O-metilación, por medio de la hidroxindol-Ometiltransferasa (Hardeland et al., 2011).

La melatonina está involucrada en múltiples procesos biológicos, regula principalmente los ritmos circadianos por el efecto que ejerce sobre el hipotálamo y en el núcleo supraquiasmático durante la fase oscura del fotoperíodo. Sin embargo, sus funciones son mucho más amplias, en términos de los sitios de biosíntesis y acción (Tan et al., 2003; Hardeland et al., 2011).

Esta molécula ha sido ampliamente estudiada ya que se le han atribuido importantes propiedades antioxidantes (Piñol-Ripoll et al., 2006), se ha reportado que es dos veces más eficiente que la vitamina E y cuatro veces más que el glutatión peroxidasa y el ácido ascórbico (Kundurovic y Sofic, 2006). La melatonina actúa a través de dos receptores de membrana acoplados a la proteína G: MT1 y MT2 (Dubocovich et al., 2010), y además la melatonina muestra afinidad por otro sitio de unión, los receptores MT3, los cuales representan una enzima quinona reductasa 2, la cual puede participar en la protección antioxidante a través de la eliminación de quinonas prooxidantes (Srinivasan et al., 2006).

La melatonina por su naturaleza lipídica se puede difundir libremente a través de las membranas celulares, cruza la barrera hematoencefálica (Bondy et al., 2004). Protege a las células contra el daño oxidativo induciendo la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes (Bondy y Sharman, 2007) como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GRd) y catalasa (CAT) (Reiter y Benítez, 2009), se ha reportado que la melatonina incrementa la actividad del complejo I y IV de la cadena respiratoria con lo que reduce la activación de las vías relacionadas con la apoptosis (Reiter y Benitez, 2009) y se ha demostrado que la melatonina no presenta toxicidad significativa en grupos de estudio tanto en personas adultas como en niños (Acuña et al., 2006; Campos, 2002).

También se ha reportado el precursor de melatonina, la N-acetilserotonina actúa como un potente agonista del receptor TrkB, (Sung-Wuk et al., 2009) también conocido como receptor

de tirosina quinasa B que es un factor neurotrófico derivado del cerebro (Nakagawara et al., 1995); los factores neurotróficos son familias de polipéptidos que regulan procesos que participan en los procesos de migración, crecimiento, diferenciación y supervivencia en las células nerviosas (Castillo-Padilla et al., 2011), las neurotrofinas que activan TrkB son: BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), neurotrofina-4 (NT-4) y neurotrofina-3 (NT-3) (Hohfeld et al., 2000)

Se ha reportado que el BDNF y su receptor TrkB son fundamentales para el mantenimiento de procesos fisiológicos del cerebro adulto como la supervivencia celular neuronal, crecimiento de neuritas, migración celular, regulación de la actividad del glutamato dependiente de la espina dendrítica y crecimiento dendrítico, formación de sinapsis (Deogracias, 2007). Así como la modulación de las ramificaciones dendríticas, la morfología de las espinas dendríticas (Horch et al., 2002).

En 1998 Jin y colaboradores describieron que la melatonina es capaz de incrementar la actividad de la TH, también Rocchita y colaboradores en 2006 reportaron que evita la autoxidación de la L-DOPA exógena.

En 2007 Gutiérrez-Valdez compara el efecto de la administración crónica de L-DOPA y melatonina en ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA en donde obtiene como resultado que el tratamiento con melatonina es capaz de proteger las alteraciones producidas por la lesión por lo que sugiere que la melatonina puede ser un posible candidato para el tratamiento de la EP.

Justificación

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor prevalencia a nivel mundial y lamentablemente con los tratamientos de elección se han descrito efectos secundarios desfavorables que pueden llegar a ser muy frecuentes e incapacitar al paciente; se sabe que una de las hipótesis más aceptadas respecto a su etiología de la EP es la del daño celular provocado por el estrés oxidativo; se han buscado alternativas terapéuticas para disminuir el daño secundario provocado por los tratamientos, y se ha encontrado que la melatonina presenta propiedades antioxidantes importantes que podrían evitar el daño citológico y no causar efectos adversos, ya que no se ha reportado que presente toxicidad para los grupos de estudio, podría favorecer la calidad de vida del paciente. En el presente trabajo se determinó el posible efecto protector (evitando o retardando el daño neuronal) del pre-tratamiento con melatonina mediante el modelo de EP por inhalación de la mezcla de compuestos de Mn, que es un modelo más similar a lo que se observa en pacientes con EP debido a que la degeneración de las NDA se lleva a cabo de manera gradual y bilateral.

Hipótesis

Si la melatonina posee propiedades antioxidantes es probable que pueda prevenir el daño oxidativo y así proteger de la neurodegeneración inducida por la inhalación de la mezcla de los dos compuestos de manganeso.

Si la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNc es producto de la acción prooxidante de la mezcla de $MnCl_2$ y $MnOAc_3$, la acción antioxidante de la melatonina evitara su pérdida.

Objetivos

General

Determinar el efecto del pretratamiento con melatonina en el modelo de enfermedad de Parkinson inducido por la inhalación de cloruro y acetato de Manganeso en ratones.

Particular

Comparar el efecto del pretratamiento con melatonina mediante la evaluación de su coordinación motora mediante las pruebas motoras de la viga de equilibrio y Reaching task.

Comparar el efecto del pretratamiento con melatonina mediante el conteo del número de neuronas dopaminérgicas en la SNc.

Comparar el efecto del pretratamiento con melatonina mediante conteo del número de espinas dendríticas en el NE.

Materiales y Método

Se utilizaron ratones macho CD1 (n=17) con peso inicial de 33 ± 3 gramos que fueron mantenidos en ciclos luz/oscuridad 12:12, con libre acceso al agua y alimento (excepto los días de evaluación en pruebas motoras).

Se formaron 3 grupos de estudio:

Tabla 1. Grupos

Grupo	Exposición a:	Tratamiento
Control n5	Agua desionizada	-
Expuesto n5	MnCl ₂ y Mn(OAc) ₃	-
Pretratado n7	MnCl ₂ y Mn(OAc) ₃	Melatonina (10 mg/kg 30 días antes de exposición)

Pretratamiento con melatonina

Al grupo pretratado se les administraron 10 mg/kg de melatonina mezclada con Cerelac de Nestlé®, diariamente por vía oral en las tardes (14:30), los animales (n=7) del grupo pretratado recibieron la dosis durante 30 días previos a la inhalación de $MnCl_2$ y $Mn(OAc)_3$.

Evaluación motora

En el día 23 de administración de melatonina los animales de los tres grupos fueron entrenados en las pruebas motoras de la viga de equilibrio y “reaching task”.

Prueba de la viga

Se utilizó un aparato de madera con dos pedestales, a los cuales va unida una viga de madera de 1 m de largo con una inclinación de 15° con 3 mm de ancho (figura 2), por donde los animales debían caminar hasta alcanzar su caja hogar desde la parte inferior del aparato. Se registró con un cronómetro el tiempo en que los animales tardaron en atravesar la viga (tiempo total) (Ordoñez–Librado et al., 2008), se esperaba como tiempo máximo 16 segundos, y si al término de este tiempo el ratón no cruzaba se daba por terminada la actividad. Los parámetros evaluados por esta prueba son: el deterioro motor en términos de lentitud, balance y rigidez muscular, además del uso alternado de las extremidades para el desplazamiento (Sánchez-Betancourt et al., 2012).



Figura 2. Viga de equilibrio.

Prueba de “reaching Task”

Paralelo al entrenamiento en la viga, los ratones se entrenaron en la prueba motora “reaching task”. Se colocó a cada ratón dentro de una caja de acrílico, la cual en la parte frontal tiene una abertura de 1 cm (figura 3) por la cual el animal tenía que alcanzar un trozo de alimento (pellet) con la extremidad delantera y comerlo, se contó como acierto cada vez que el animal tomaba el pellet y lo llevaba hasta su boca, y como error cuando no lo podía sujetar o se le caía, a cada animal se le dieron 10 oportunidades, es decir se les puso 10 pellets y se cuantificó cuántos aciertos y errores tenían, también se evaluó la siguiente secuencia de movimientos de las extremidades delanteras (Ordoñez – Librado et al., 2008):

1. En la parte delantera de la caja el animal huele el trozo de alimento.
2. Levanta el miembro anterior ajustando su postura para proyectar la extremidad hacia el alimento.
3. Sujeta el alimento y regresa su miembro anterior hacia la boca y lo introduce.

Con esta prueba podemos observar el deterioro motor en términos de lentitud en la secuencia de movimientos, temblor en las extremidades, así como disminución en la fuerza y precisión (Sánchez-Betancourt, 2016), las evaluaciones de ambas pruebas se realizaron una vez por semana durante cinco meses (Ordoñez – Librado et al., 2008) y cabe mencionar que un día antes de cada evaluación en la prueba de “reaching task” los animales fueron privados de alimento al 90% de su peso (Sánchez-Betancourt, 2016).



Figura 3. Ratón en prueba “reaching task”.

Los criterios de inclusión/exclusión de los ratones entrenados para seguir con el experimento fueron, en el caso de la prueba de la viga aquellos animales que tardaron menos de 16 segundos en realizar la prueba, y en el caso de la prueba de “reaching task” se utilizaron solo los ratones que obtuvieron 7 aciertos o más.

Inhalación de Mn

Los ratones fueron expuestos a la mezcla de cloruro de manganeso $MnCl_2$ 0.04 M y acetato de manganeso $Mn(OAc)_3$ 0.02 M por vía inhalada, en una caja de acrílico una hora dos veces por semana en un periodo de cinco meses (Ordoñez-Librado, 2007).

Sacrificio

Al término de la exposición a la inhalación de la mezcla de $MnCl_2$ y $Mn(OAc)_3$ los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico dosis letal i.p. (0.2 mg/kg), se perfundieron vía aorta con solución salina isotónica al 0.9% y se fijó el tejido con paraformaldehído al 2% en amortiguador de fosfatos al 0.2M pH 7.4. Una vez perfundidos, se extrajeron los cerebros y se colocaron en el mismo fijador por dos horas (Ordoñez-Librado, 2007), posteriormente el tejido se procesó con técnicas inmunohistoquímicas para TH y tinción de Golgi.

Tinción de Golgi.

Para el análisis del conteo de las espinas dendríticas se tomaron muestras del NE para procesarse con el método de tinción de Golgi.

Preparación de muestras

Se tomaron las muestras previamente fijadas, se lavaron en buffer fosfatos y se introdujeron en una mezcla de osmio-dicromato de potasio (OsO_4 1g, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 8g, H_2O 300ml) durante 7 días a temperatura ambiente en obscuridad (se utilizaron 10ml de mezcla para cada cerebro), posteriormente las muestras se lavaron rápidamente con agua destilada, después con nitrato de plata al 0.75%, los fragmentos se colocaron en nitrato de plata durante 24 horas a temperatura ambiente (Ordoñez-Librado, 2012).

Análisis de tejido

Se limpió el exceso de nitrato de plata con papel filtro y se encastraron en un bloque de parafina, la parte libre de la muestra se bañó en alcohol al 95% y se obtuvieron los cortes de $120\mu\text{m}$ en un micrótopo de deslizamiento, lubricando constantemente la cuchilla con alcohol. Los cortes se deshidrataron en dos baños de alcohol absoluto 10 minutos cada uno, posteriormente, en esencia de clavo durante 10 minutos para ser aclarados, y después dos cambios de xilol, finalmente, se montaron en un portaobjetos con resina sintética (Ordoñez-Librado, 2012).

Para el conteo del número de espinas dendríticas de las NEM se contaron cinco dendritas secundarias de 10 neuronas por ratón, con una reglilla colocada en el ocular del microscopio, en una longitud de $10\mu\text{m}$ (figura 4).

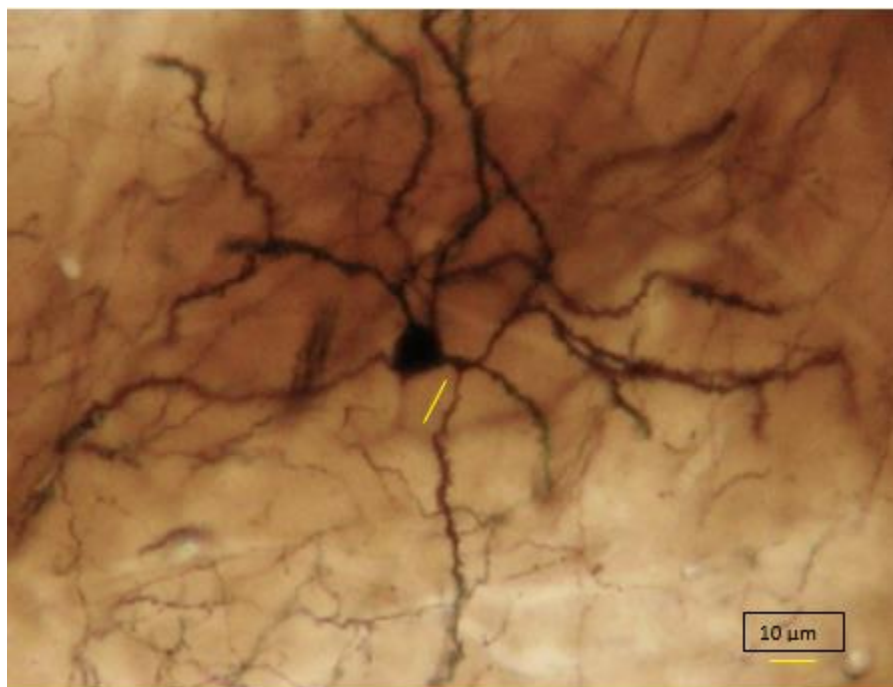


Figura 4. Impregnación argéntica de Golgi en NEM, se contaron las espinas dendríticas secundarias a lo largo de 10 μm a 10x.

Inmunohistoquímica anti tirosina hidroxilasa (TH).

Preparación de muestras

Para la técnica de inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa (TH) se realizaron cortes histológicos del mesencéfalo ventral a nivel de la SNc de 50 μm en un vibratomo y posteriormente, se hicieron lavados sucesivos en amortiguador PBS; 3 veces por 10 minutos; 3 lavados en amortiguador TRIS de 10 minutos; amortiguador TRIS y peróxido de hidrógeno al 0.3% (30 min); amortiguador TRIS y borohidrido de sodio al 0.01% (30 min); amortiguador TRIS con 1% de suero normal de cabra y 0.3% de tritón (durante 1 h), todos con agitación, posteriormente se incubaron los cortes en alícuota de anticuerpo primario anti-TH monoclonal en amortiguador TRIS 1:1000 con 1% de suero normal de cabra por 3 días a 4°C. Posteriormente se lavaron los cortes 3 veces en amortiguador TRIS con 1% de suero normal de cabra durante 10 minutos con agitación. Se incubaron 2 horas a temperatura ambiente en el anticuerpo secundario. Anti- IGg de conejo 1:200 en TRIS con 1% de suero de cabra. Se hizo un lavado en TRIS con 1% de suero normal de cabra, para después incubar en Abidina-Biotina (2 h) a temperatura ambiente. Después de 3 lavados en TRIS con agitación se reveló

la tinción con 3-3 Diaminobencidina (DAB) al 0.05% y 0.03% y peróxido de hidrógeno. El tejido se lavó por última vez en TRIS por 10 min y se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados, se dejan secar un día. Para cubrir con resina se realizó la deshidratación de los cortes con alcoholes y xilol, diez minutos cada uno (Ordoñez–Librado, 2007).

Análisis de tejido

Para realizar el conteo de las neuronas inmunorreactivas a TH en la SNc, se tomó un área de 1500 μm en 10 cortes por animal a partir del inicio del núcleo hasta el borde o porción terminal medial del tracto óptico accesorio (figura 4), el análisis se llevó a cabo en una foto microscopio Nikon (Ordoñez–Librado, 2007).

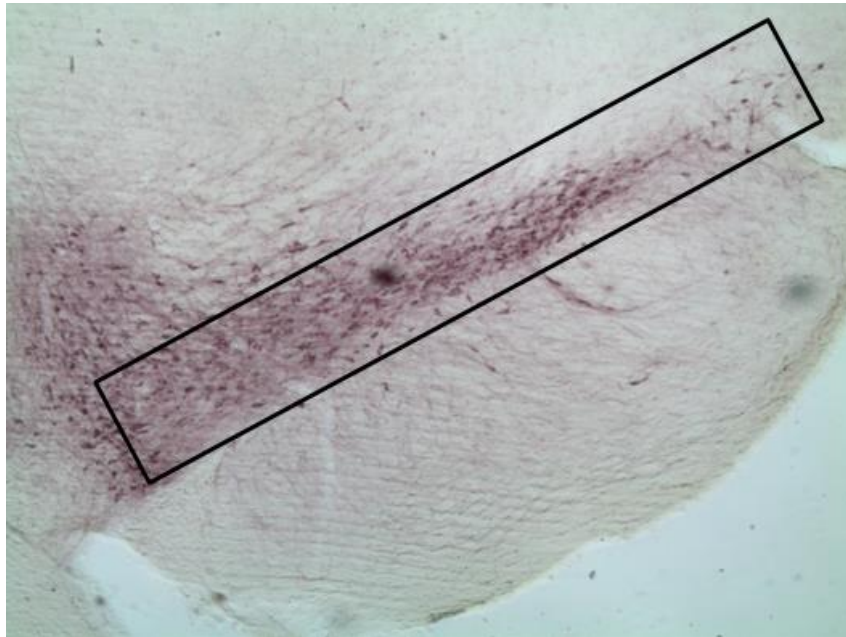


Figura 5. Corte donde se muestra la SNc donde se llevó a cabo el conteo de neuronas inmunorreactivas a TH en SNc en un área de 1500 μ^2 a 10x.

Análisis Estadístico

Para el análisis de resultados se utilizó ANOVA de dos vías para analizar las pruebas motoras y el análisis histológico seguida de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni con el software GraphPadPrism 7 para graficar y determinar las diferencias entre los grupos,

graficando las medias más-menos error estándar y se consideraron como diferencias significativas cuando $P < 0.05$.

Resultados

El deterioro motor inducido por la exposición a la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$ vía inhalada fue de manera gradual, y provocó la pérdida de espinas dendríticas y neuronas dopaminérgicas; el pre tratamiento con melatonina mostró resultados significativos respecto a la protección contra la degeneración neuronal.

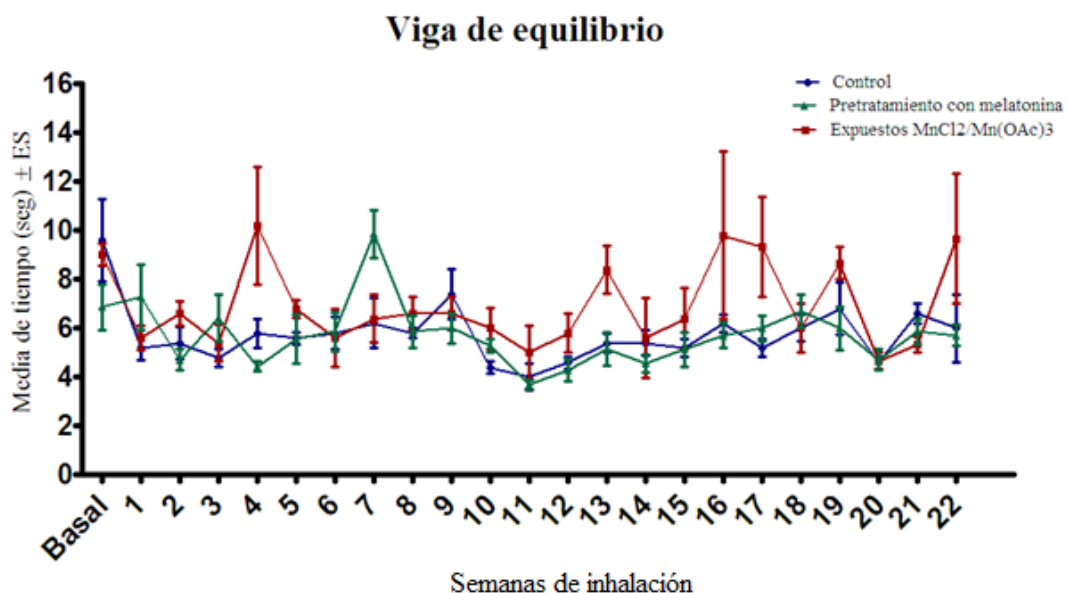
Evaluación motora

Al evaluar el déficit motor que se presentó en la prueba de la viga y en la prueba de “reaching task” durante 44 inhalaciones (5 Meses) se observó que en ambos casos el grupo pretratado con melatonina obtuvo mejor desempeño en su coordinación, mientras que el grupo expuesto disminuyó su habilidad motora progresivamente; es decir en cada inhalación se mostraba decremento en su coordinación.

En las siguientes gráficas se muestran los resultados obtenidos, en la prueba de la viga (gráfica 1), se determinó el tiempo promedio en que tardaron en atravesarla, podemos observar que a partir de las 18 inhalaciones los ratones del grupo expuesto a la mezcla de Mn mostraron un leve aumento en el tiempo de realización de la prueba y los grupos melatonina y control se mantuvieron de manera constante. Sin embargo, no existen diferencias significativas entre ellos, aunque se observó que el grupo expuesto sin pretratamiento tenía mayor dificultad en cruzar la viga.

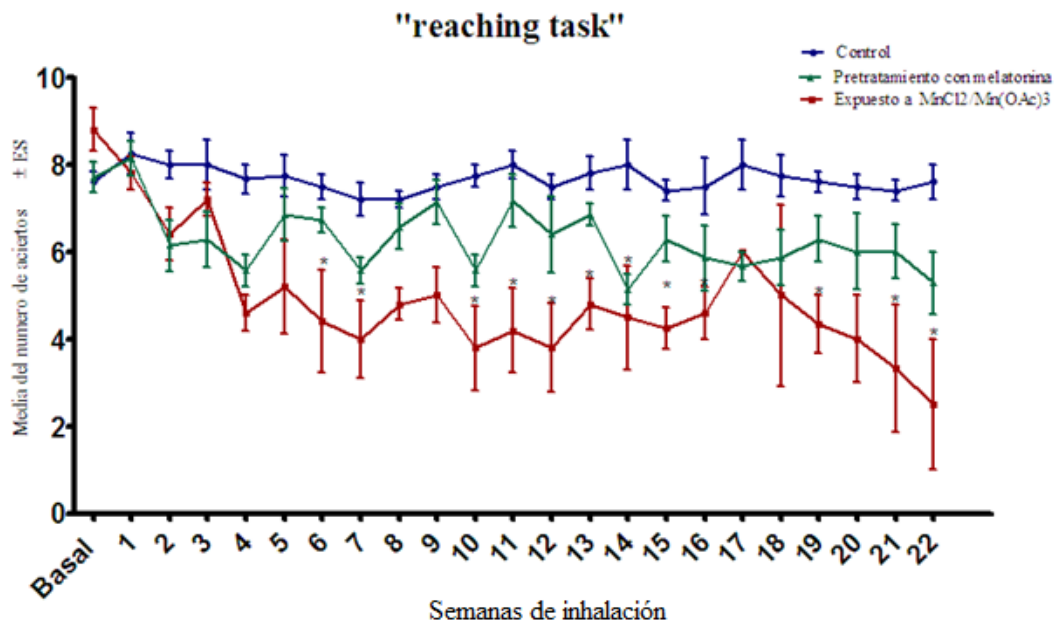
De manera cualitativa se observó que los ratones expuestos a la mezcla de Mn tenían una postura irregular al atravesar la viga a pesar de que no varía demasiado el tiempo de realización; algunas de las irregularidades que presentaban los animales en la coordinación motora son que se encorbaban al atravesar la viga así como un leve temblor, algunas veces solo utilizaban sus dos extremidades delanteras para sostenerse, también se observó que se arrastraban en lugar de caminar con las cuatro extremidades.

Por otro lado, los grupos control y pre tratado mostraron estabilidad postural ya que estos animales, a diferencia del grupo expuesto y sin tratamiento utilizaban sus cuatro extremidades de manera alternada y no se encorvaban.



Gráfica 1. Media del tiempo recorrido en segundos en la viga \pm error estándar (ANOVA con análisis de Bonferroni $\ast=p < 0.05$ vs grupo control).

En cuanto a la evaluación de la prueba de “reaching task” mediante el conteo del número de aciertos y errores, en la gráfica 2 podemos observar que durante los cinco meses, el grupo control mantuvo un promedio de 8 aciertos, mientras que el grupo expuesto a la mezcla de Mn, a partir de la sexta inhalación disminuyó el número de aciertos y bajó hasta un promedio de 2 aciertos, sin embargo, el grupo pretratado con melatonina no presenta diferencias significativa respecto al grupo control; es decir, que la coordinación de los ratones no se mostró tan afectada, a pesar de no obtener el mismo resultado del grupo control.



Gráfica 2. Media del número de aciertos en la prueba de “reaching task” ± error estándar (ANOVA con análisis de Bonferroni * = <math>P < 0.05</math> vs control).

Observamos que en el grupo de ratones expuestos (Fig. 6C) presenta un ajuste en su postura siendo deficiente la alineación como se aprecia en las fotografías y proyección de la extremidad hacia la abertura, así como los dígitos abiertos sin sujeción del alimento, en lugar de ello, lo jalaban al interior de la caja para posteriormente tomarlo del piso con la boca, por otro lado, el comportamiento motor en el grupo pretratado con melatonina (Fig. 6B) también es irregular; es decir no mantienen una postura alineada, pueden o no mantener los dígitos abiertos pero aciertan más veces a la sujeción del alimento y lo llevan a la boca, en comparación con el grupo expuesto sin tratamiento. En contraste, en el grupo control (Fig. 6A) los animales realizan esta secuencia de movimientos de manera correcta.

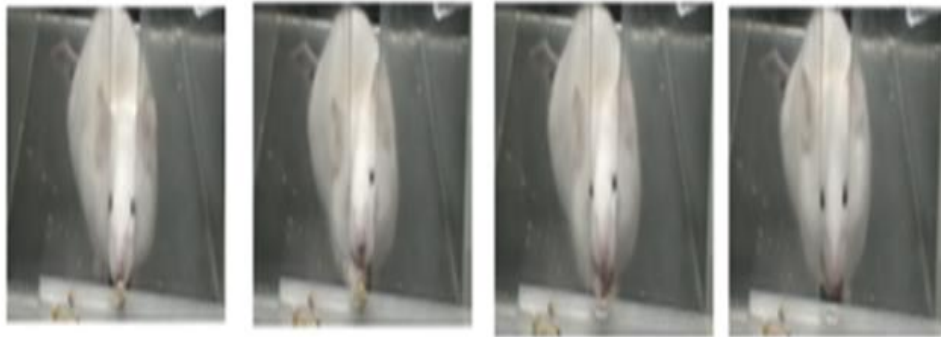


Fig. 6 (A) Grupo control.

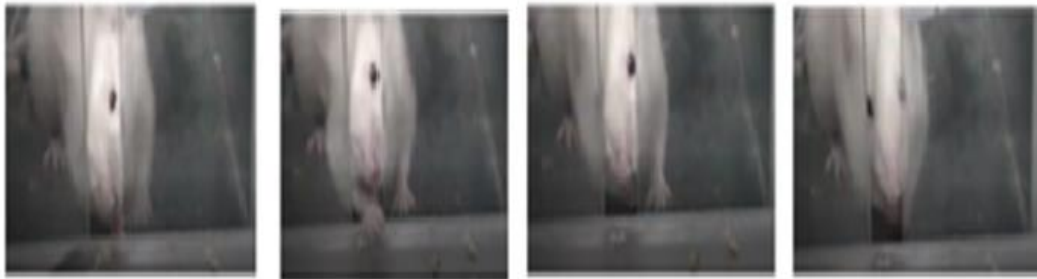


Fig. 6 (B) Grupo pretratado con melatonina.



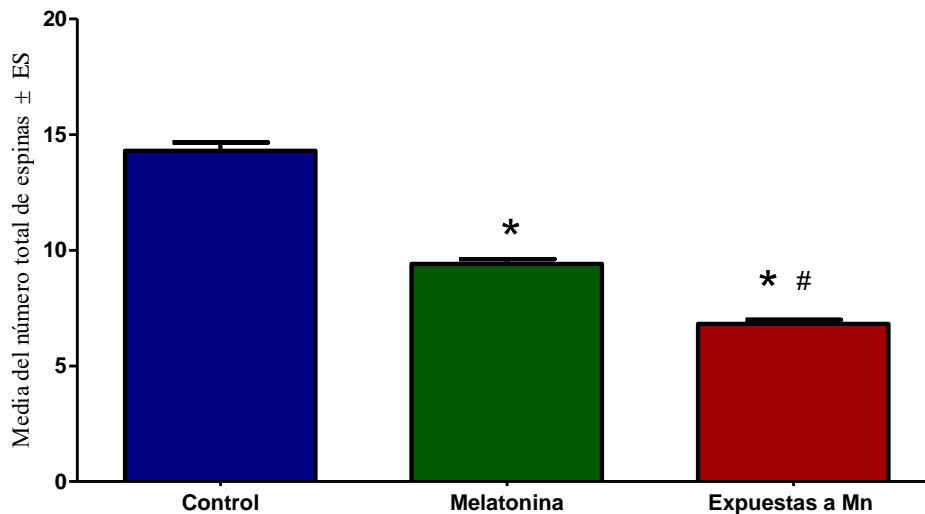
Fig. 6 (C) Grupo expuesto a la inhalación de la mezcla de Mn.

Figura 6. Secuencia de movimientos de la coordinación motora en la prueba motora de “reaching task”.

Conteo de espinas dendríticas de las NEM's en el núcleo estriado

Al analizar el conteo de las NEM en el núcleo estriado con la técnica de impregnación de Golgi se observó (gráfica 3 y figura 7) que el número de espinas dendríticas disminuyó significativamente en el grupo expuesto a la mezcla de Mn y en el grupo pretratado respecto al control; sin embargo también se muestra que el grupo expuesto a Mn muestra diferencias significativas con respecto al grupo pretratado, es decir, que a pesar de presentar pérdida de espinas dendríticas importante, ésta es menor a la que se observa en el grupo expuesto a Mn.

Espinass dendríticas en NEM



Gráfica 3. Media del número total de espinas dendríticas de NEM en grupos control (14.2), pretratado con melatonina (9.4) y expuesto a mezcla de Mn sin pretratamiento (6.8) ± error estándar de espinas dendríticas en las NEM en el núcleo estriado (ANOVA con análisis de Bonferroni * = $P < 0.05$ vs grupo control; # grupo expuesto a mezcla de Mn vs al grupo pretratado).

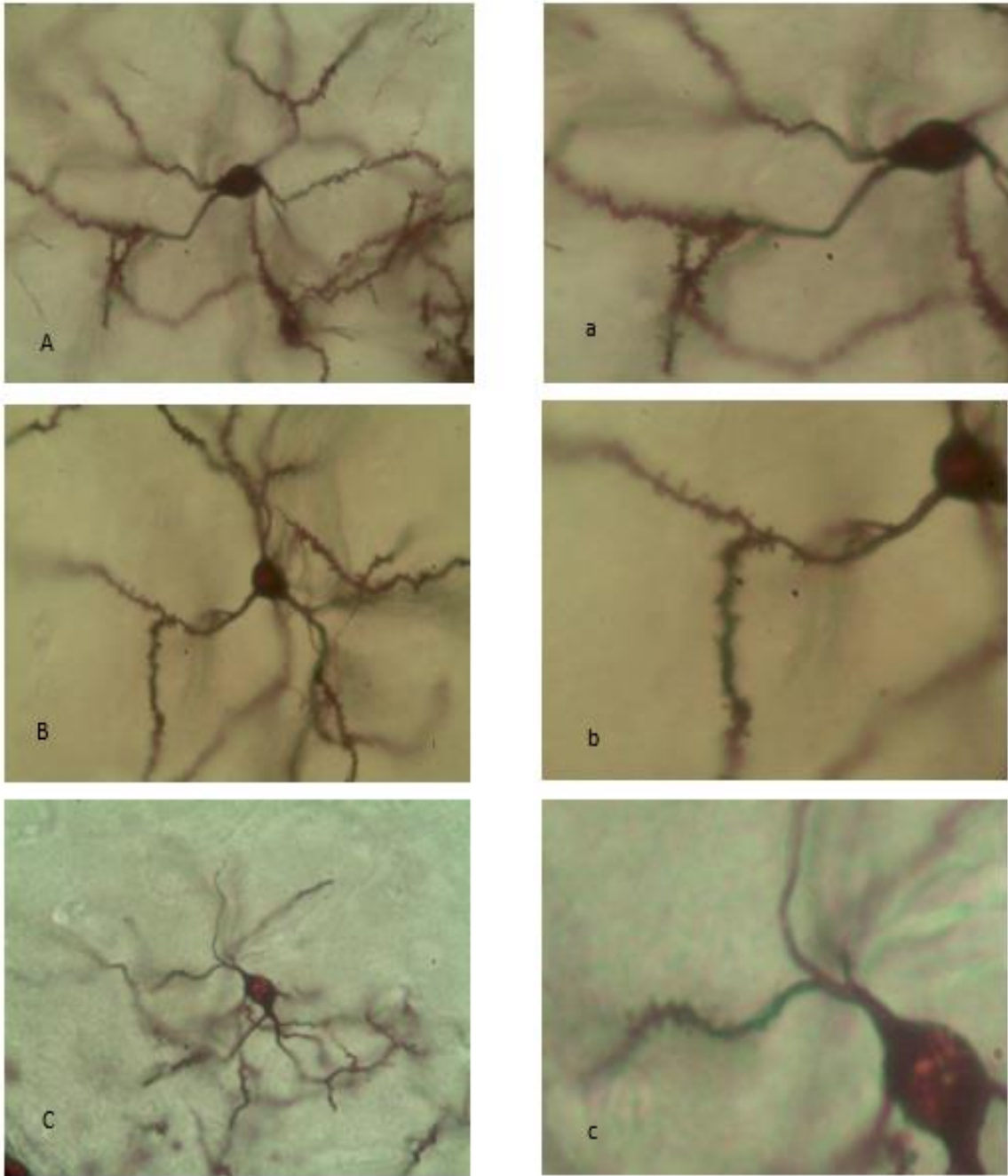
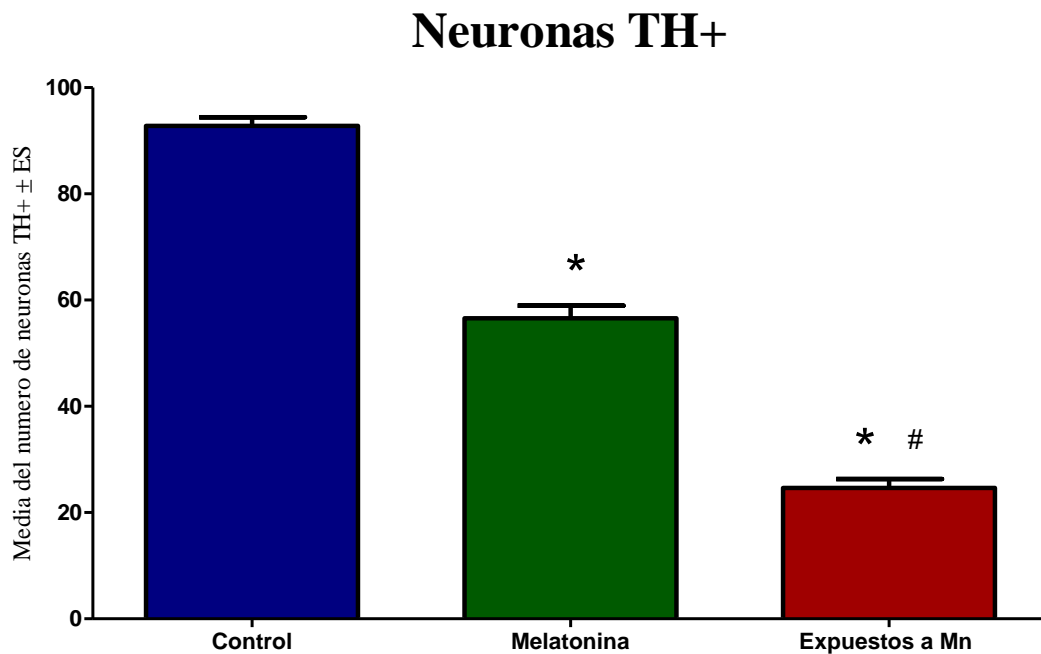


Figura 7. Espinas dendríticas en NEM en los grupos control (A,a), pretratado (B,b) y expuesto a Mn (C,c), A,B y C 10x y a,b y c 100x.

Neuronas inmunopositivas a TH en la SNc.

En el conteo del número de neuronas inmunorreactivas a TH (gráfica 4 y figura 8) en la SNc, se observó que el grupo expuesto a la mezcla de Mn presentó pérdida significativa de neuronas en comparación con el grupo pretratado; ambos grupos tuvieron diferencias significativas respecto al grupo control. Sin embargo, se observa que, aunque el grupo con pretratamiento tuvo pérdida significativa de neuronas TH+, dicha pérdida fue en menor proporción que el grupo que solo inhaló Mn, existiendo diferencias significativas entre ambos.



Gráfica 4. Media del número total de neuronas inmunorreactivas a TH en la SNc en los grupos control (92.8), pretratado con melatonina (56.5) y expuesto a mezcla de Mn sin pretratamiento (24.3) \pm error estándar (ANOVA con análisis de Bonferroni * = $P < 0.05$ grupo expuesto a Mn y grupo con pretratamiento vs grupo control; # = $P < 0.05$ grupo expuesto a Mn vs grupo con pre tratamiento).

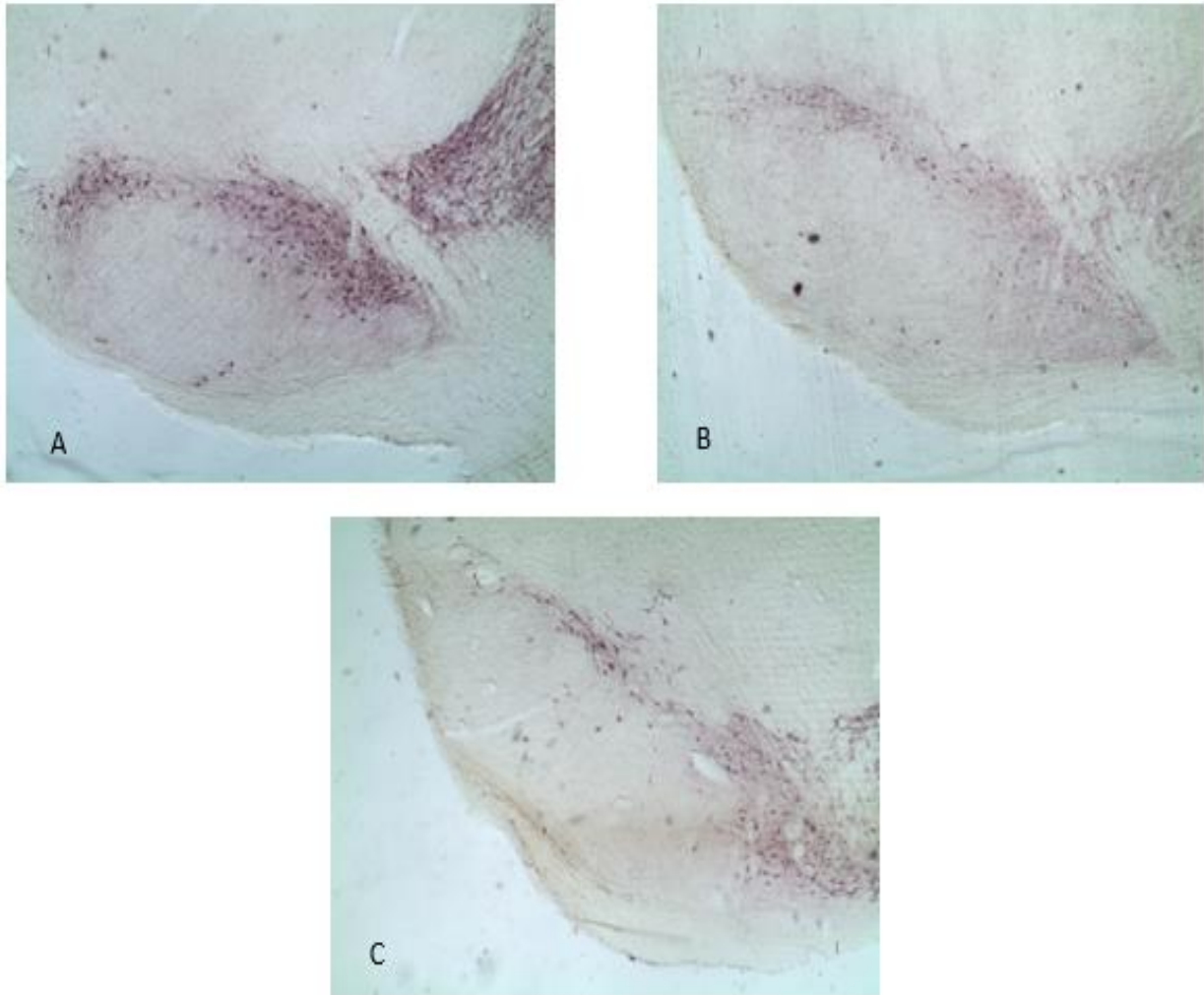


Figura 8. Inmunohistoquímica de neuronas TH+ en grupos control (A), pre tratado con melatonina (B) y expuesto a Mn (C) a 10x.

Discusión

La EP es un trastorno degenerativo, se determina clínicamente a partir de alteraciones del movimiento y se reporta que las características motoras se presentan relativamente tarde, cuando se ha perdido un 70-80% de NDA de la SNc (Hornykiewicz, 2001). La pérdida celular progresiva conduce al aumento de la discapacidad física, paralela al deterioro cognitivo (Noyce y Bandopadhyay, 2017). Ordoñez-Librado y colaboradores en el 2008 indican que el modelo de inhalación de la mezcla de $MnCl_2$ y $Mn(OAc)_3$ es una alternativa que nos permite realizar evaluaciones en las diferentes etapas de evolución de la enfermedad ya que produce degeneración progresiva y bilateral de las NDA de la SNc en ratones expuestos, así como alteraciones motoras, por lo que es un el modelo más apegado a lo que sucede en humanos.

En nuestros resultados observamos que en ambas pruebas motoras (gráficas 1,2 y figura 6) los ratones que fueron pretratados con melatonina no tuvieron un decremento tan drástico en la coordinación motora como se observa en los animales expuestos a Mn; en trabajos anteriores Sánchez-Betancourt en 2016 y Ordoñez-Librado en 2007 reportaron que los animales expuestos a la mezcla de compuestos de Mn presentan alteraciones motoras conforme aumenta el número de inhalaciones; las alteraciones motoras están relacionadas estrechamente con los GB, los cuales tienen un papel fundamental en la iniciación y ejecución del movimiento continuo, es decir participan en la planificación de movimientos complejos (Bustamante, 2007), por ejemplo, en el control automático de movimientos como la marcha principalmente a través de su interacción con áreas motoras corticales, sin embargo, la interrupción de dicho sistema puede provocar trastornos en la marcha como en la EP (Elble et al., 1996), los trastornos de la marcha son síntomas comunes del parkinsonismo (Moriss et al., 1994, 1998), los pacientes con EP presentan una longitud de zancada acortada con paso arrastrado y velocidad reducida (festinante) (Blin et al., 1990), lo cual sirve como parámetro de la disfunción de los GB (Andre' et al., 2001). Fernagut y colaboradores en 2002 observaron que los ratones a los que se les administraron MPTP presentaban alteraciones en la coordinación de las extremidades; en nuestros resultados obtenidos en la prueba motora de la viga no se encontraron diferencias significativas, sin embargo los ratones expuestos a Mn no coordinaban sus extremidades correctamente; por otro lado mediante la prueba de

“reaching task” que consiste en una serie de subcomponentes de movimiento podemos obtener una descripción detallada de los movimientos de alcance del ratón cuando hay cambios en la postura (Miklyyaeva et al., 1994), ya que los movimientos de alcance se acortan y la pronación y supinación de la extremidad están deteriorados debido a la disminución de dopamina (Miklyyaeva et al., 1994; 1995), en humanos podemos observar que la destreza manual empeora a medida que la EP progresa (Castiello et al., 1999); Iwaniuk y Whishaw en 2000 mencionan que los movimientos de alcance de las ratas son muy similares a los de los humanos y, debido a esto se sugiere la homología entre ellos. Whishaw y colaboradores en 2002 sugirieron que usar esta prueba es útil en estudios de sujetos con EP para evaluar la eficacia del movimiento, así como también evaluar la disminución de dopamina.

Por otro lado al analizar el número de espinas dendríticas en el NE de las NEM (gráfica 3 y figura 7 B, b) se encontró daño producido por la exposición a la mezcla de Mn observando pérdida de espinas dendríticas, lo que concuerda con lo reportado por Ordoñez-Librado (2012) y Sanchez-Betancourt (2016) que observaron decremento de la densidad de espinas dendríticas posterior a la exposición a la mezcla de Mn; Archibald y Tyree, en 1987 sugirieron que el Mn interactúa con grupos catecoles de las NDA causando depleción de DA y daño en dichas neuronas, dicha pérdida de DA estriatal está por lo tanto asociada a la reducción de las espinas dendríticas como mecanismo compensatorio (Ingham et al., 1998) ya que al reducir el número de espinas dendríticas también disminuye la posibilidad de contacto sinápticos glutamatérgicos (Cavazos et al., 1991; Day et al., 2006; Gerfen, 2006) evitando la muerte por excitotoxicidad (Cavazos et al., 1991; Day et al., 2006; Gerfen, 2006; Segal, 1995) debido a la inervación de los contactos excitatorias provenientes de la corteza (KucukKaya, Haklar y Yalcin, 1996). Esto es resultado de las complejas alteraciones en el circuito de los GB (figura 1) ya que la denervación dopaminérgica provoca aumento en la densidad de receptores D2 (vía indirecta) y disminución de receptores D1 (vía directa) (Qin et al., 1994) que, como se mencionó la vía indirecta está compuesta por neuronas GABAérgicas que proyectan hacia el GPe, la inhibición del GPe desinhibe la actividad del NST (formado por neuronas glutamatérgicas de proyección) lo que trae como resultado la excitación de los núcleos de salida de los GB, provocando la inhibición tálamo cortical, dicha

inhibición es la causa del temblor, rigidez y la bradicinesia que se observa en los pacientes con EP (DeLong, 1990), por lo tanto, la deficiencia en la coordinación motora puede ser explicada debido a que la exposición constante a Mn induce cambios en las concentraciones de DA (Bonilla, 1984).

Sin embargo, observamos que la melatonina tiene acción protectora de la vía dopaminérgica nigroestriatal ya que, como se mencionó, en las pruebas motoras los animales pretratados mostraron mejor estabilidad en la coordinación, también podemos observar que en el grupo pretratado con melatonina (gráfica 3 y figuras 7 C,c) los ratones tuvieron pérdida significativa de espinas dendríticas respecto al grupo expuesto, esto concuerda con lo reportado por Gutiérrez-Valdez en 2007 donde muestra que los animales tratados con melatonina que fueron lesionados por inyección de 6-OHDA mostraron mejoría a los 28 días de lesión, así como también la administración de melatonina previno la pérdida de espinas dendríticas de las NEM, Gutiérrez-Valdez (2007) sugiere que la melatonina puede activar algunas vías de señalización para aumentar la defensa contra las ROS. La melatonina estimula el sistema de enzimas antioxidantes (Núñez, 2013), como SOD, GPx, GRd, y CAT (Reiter et al., 2000) e impide la peroxidación de lípidos en el cuerpo estriado, preservando mayor número de NDA en la SNc, esto se puede explicar por el efecto de barredor de radicales libres que tiene la melatonina y algunos de sus metabolitos (Reiter et al., 2009); entonces, es probable que debido a estas propiedades la melatonina impide que se degeneren las NDA lo que es evidenciado con la preservación de las espinas dendríticas, ya que al evitar la pérdida de NDA se mantiene la transmisión dopaminérgica al estriado, y también la morfogénesis de las espinas dendríticas (Smith et al., 2009)

Rajib y colaboradores (2018) mencionan que la melatonina revierte la pérdida de neuronas positivas a TH en la sustancia nigra; Gutierrez-Valdez y colaboradores (2013) reportaron que el tratamiento con melatonina favoreció la conservación de las NDA en la SNc y sugieren que es por la acción directa como antioxidante o indirectamente, estimulando enzimas antioxidantes.

Como podemos observar en la (gráfica 4 y figura 8) el grupo pretratado muestra diferencias significativas con el grupo expuesto a la mezcla de Mn. Ordoñez-Librado (2012) encontró disminución en ratones y Sánchez-Betancourt (2016) en ratas en el número de neuronas TH positivas debido a la exposición a Mn. Algunos estudios han encontrado que la exposición a la mezcla de Mn provoca disminución de las NDA de la SNc debido a que el Mn ingresa a ellas por medio del DAT (Nagatomo et al., 1999; Calne et al., 1994) e intracelularmente se acumula en la mitocondria por la vía del canal uniporte del Ca^{2+} (Zhang et al., 2004) inhibiendo el complejo I de la cadena respiratoria y así propiciando la formación de radicales libres (Erikson et al., 2004), llevando a las neuronas a presentar estrés oxidativo y por tanto su muerte. Como sabemos la melatonina incrementa la actividad mitocondrial del complejo I y IV debido a que ésta aumenta la expresión de DNA mitocondrial (León et al., 2005). El DNA mitocondrial expresa el polipéptido de la subunidad I, II y III del complejo IV que se relaciona con el incremento de la actividad mitocondrial (León et al., 2005). Además, la propiedad de la melatonina como barredor de radicales libres neutraliza los radicales como el $OH\bullet$ y el $O_2\bullet^-$ (Tan et al., 2003). El tratamiento con melatonina, al reducir la producción de radicales libres, también puede estar beneficiando la respiración mitocondrial y por ende los procesos metabólicos de la célula (Núñez, 2013).

Por ello con los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos decir que la melatonina tiene efecto neuroprotector para las NDA de la SNc y de las NEM del estriado ya que, la degeneración neuronal es menor y hay menor deterioro en la ejecución motora, sin embargo, el tiempo de pre-tratamiento al parecer no fue suficiente para evitar por completo el efecto degenerativo, por lo que se sugiere realizar un estudio ampliando el tiempo de administración de melatonina.

Conclusión.

El pretratamiento con melatonina en el modelo de EP inducido por inhalación de $MnCl_2$ y $Mn(OAc)_3$ en ratones evita la pérdida significativa de neuronas dopaminérgicas de la SNc y de espinas dendríticas en el núcleo estriado protegiendo a la vía nigroestriatal del daño y así disminuyo las alteraciones motoras; por ello podemos considerar el uso de la melatonina como tratamiento preventivo de la EP.

Referencias bibliográficas.

A

- Acuña D., Escames G., Lopez L. y Mulero M. (2006), Protective role of melatonin against mitochondrial damage in inflammation. Chapter XX, in: Melatonin: From Molecules to therapy. Nova Science Publishers, Inc.
- Ahlskog, J. y Muentner, M. (2001), Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov. Disord.* 16: 448-458.
- Aisen P., Aasa R., y Reifield A. (1969), The chromium, manganese and cobalt, complexes of transferrin. *J. Biol. Chem.* 244:4628-4633.
- Alarcón A., Santamaría A., Königsberg M. (2010), Modelos Neurotóxicos de la Enfermedad de Parkinson y disfunción mitocondrial. *REB.* 29: 92-100.
- Albin R., Young A., Penney J. (1989), The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12: 366-375.
- Alexander G. y Crutcher H. (1990), Functional architecture of basal ganglia circuits: Neuronal substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* 137: 266-271.
- Alexi T., Borlangan C., Faull R., Williams C., Clark R., Gluckman P. y Hughes P. (2000), Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntingtons's diseases. *Prog neurobiol* 60: 409-470.
- Anaya M. (1997), Estudio morfofuncional comparativo entre los trasplantes de la médula adrenal colocados en el ventrículo lateral o en el parénquima estriatal. Tesis para obtener el título de Maestra en Neurociencias. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.
- Andersen M., Gearhart J., y Clewell H. (1999), Pharmacokinetic data needs to support risk assessments for inhaled and ingested manganese. *Neurotoxicology* 20: 161- 171.
- Andre´ JM., Paysant J., Martinet N., Beis JM. y Beyaert C. (2001), Georges Gilles de la Tourette, pioneer of gait analysis in the nervous system diseases. *Rev Neurol.* 157: 293–6.

- Archibald F. y Tyree C. (1987), Manganese poisoning and attack of trivalent manganese upon catecholamines, *Arch Biochem Biophys.* 256: 638-650.
- Aschner M., Erikson K. y Dorman D. (2005), Manganese dosimetry: Species differences and implications for neurotoxicity. *Crit Rev Toxicol.* 35:1-32.
- Au C., Benedetto A., y Aschner M. (2008), Manganese transport in eukaryotes: The role of DMT1. *Neurotoxicology.* 29: 569-576.
- Avila Costa M.R. (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. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.
- Avila-Costa, M.R., Colín B., Espinoza V. y Machado S. (1998), Degeneración del neuropilo del núcleo caudado en la enfermedad de Parkinson y en el modelo experimental provocado con 6-OHDA: Análisis ultraestructural comparativo. *Rev Mex Patol Clin Med Lab.* 36: 297-301.
- Avila-Costa, M.R., Colín, B., Aley-Medina P., Gutiérrez-Valdez A., Ordoñez-Librado J., Martínez E. y Fortoul T. (2005), Bilateral increase of perforated synapses after unilateral dopamine depletion. *J. Neurosci.* 115: 79-86.
- Avila-Costa, M.R., Colín B., Montiel E., Aley-Medina P., Gutiérrez-Valdez A., Ordoñez-Librado J., Flores E., Anaya V., Mussali P. y Fortoul T. (2005), Bromocriptine treatment in a murine Parkinson's model: Ultraestructural evaluation after dopamine deafferentation. *J Neurosci.* 115: 851-859.

B

-
- Barzilai A., Mellamed E. y Shirvan A. (2001), Is there a rationale for neuroprotection against Dopamine toxicity in Parkinson's disease? *Cellular and Molecular Neurobiology.* 21: 215-230.
 - Beck K., Valverde J., Alexi T., Poulsen K., Moffat B., Vandlen R. (1995), Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature.* 373: 339-341.

- Betarbet R., Sherer T., MacKenzie G., GarciaOsuna M., Panov A. y Greenamyre T. (2000), Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 3:1301–1306.
- Betarbet R., Sherer T., Mackenzie G., Garcia-Osuna M. y Greenamyre, J. (2002), Animal models of Parkinson's disease. *Bioassays.* 24:308-318.
- Bezard E., Gross CE., Fournier MC., Dovero S., Bloch B. y Jaber M. (1999), Absence of MPTP-Induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporters. *Exp Neurol.* 155: 268-273.
- Birben E., Sahiner UM., Sackesen C., Erzurum S., y Kalayci O. (2012), Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ;* 5:9-19.
- Blandini F. y Armentero MT. (2012), Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J.* 279:1156-1166.
- Blin O., Ferrandez AM. y Serratrice G. (1990), Quantitative analysis of gait in Parkinson patients: increased variability of stride length. *J Neurol Sci.* 89:91–97.
- Blum D., Torch N., Lambeng M., Nissou A., Benabid R., Sadoul y Verna JM. (2001) Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 65: 135-172.
- Bondy SC., Lahiri DK., Perreau VM., Sharman KZ., Campbell A. y Sharmana EH. (2004), Retardation of Brain Aging by Chronic Treatment with Melatonin. *Ann. N.Y. Acad Sci.* 1035: 197–215.
- Bondy SC. y Sharman EH. (2007), Melatonin and the aging brain. *Neurochem Int* 50:571–580.
- Bonilla E. (1984), Intoxicación crónica con Mn. *Avances recientes. Inv clin.* 27: 49-64.
- Breneman KA., Wong B., Bucellato M., Costa E., Gross E. y Dorman D. (2000) Direct olfactory transport of inhaled manganese ($^{54}\text{MnCl}_2$) to the rat brain: Toxicokinetic investigations in a unilateral nasal Occlusion Model. *Toxicol Appl Pharmacol.* 169: 238-248.
- Brusa L., Bassi A y Stefani A. (2003), Pramipexole in comparison to L-DOPA: a neuropsychological study. *J Neural Transm.* 110(4): 373-380.

- Bustamante E. (2007). Cerebelo, ganglios basales y movimiento voluntario. En El sistema nervioso: desde las neuronas hasta el cerebro humano (140-166). Colombia: Universidad de Antioquia.

C

- Calne DB., Chu NS., Huang CC., Lu CS. y Olanow W. (1994), Manganism and idiopathic parkinsonism: Similarities and differences. *Neurology*. 44: 1583-1586.
- Campos M. (2002), Melatonina y epilepsia. *Rev neurol*. 35:51-58.
- Cardoso SM., Moreira PI., Agostinho P., Pereira C y Olivera CR (2005), Neurodegenerative pathways in Parkinson's disease therapeutic strategies. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 4:405-419.
- Castiello U., Bennett K., Bonfiglioli C., Lim S. y Peppard RF. (1999), The reach-to-grasp movement in Parkinson's disease: response to a simultaneous perturbation of object position and object size. *Exp Brain Res*. 125: 453-462.
- Castillo D y Rivas S. (2011), Interacción entre factores neurotróficos y especies reactivas de oxígeno en los mecanismos de muerte y proliferación celular. *Archivo de Neurociencias*. 16(1): 26-32.
- Cavazos JE., Golarai G. y Sutulo TP. (1991), Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development progression and permanence. *J Neurosci*. 11: 2279-2803.
- Chance B., Sies H. y Boveris A. (1979), Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev*. 59: 527-605.
- Chandan K., Savita K y Sashwati R. (2004), Tocotrienol The Natural Vitamin E to Defend the Nervous System?. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 1031: 127-142
- Clarke PGH. (1999), Apoptosis versus necrosis. How valid a dichotomy for neurons? *Cell death and diseases of then nervous system*. Totowa, NJ: Humana Press Inc: 3-28.
- Colin-Barenque L. (1994), Estudio morfológico del núcleo caudado del ser humano normal y con Enfermedad de Parkinson: Un estudio con el método de Golgi y

microscopía electrónica. Tesis para obtener el grado de Maestría en Neurociencias. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

D

- Dauer W. y Przedbroski S. (2003), Parkinson's disease: Mechanisms and models. *Neuron*. 39: 889-909.
- 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. y Surmeier DJ. (2006), Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat Neurosci*. 9: 251-259
- DeLong M.R (1990), Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci*. 13: 281-285.
- DeLong MR y Georgopoulos AP. (2011), Motor functions of the basal ganglia. En *Handbook of physiology-The nervous system (1017-1061)*. Baltimore, Maryland: American Physiological Society.
- Deogracias R. (2007), Regulación de la expresión del receptor de neurotrofinas TrkB en células nerviosas. Mecanismos moleculares e implicaciones biológicas. Madrid.s.n.. Presentada en Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC – UAM para la obtención del grado de Doctor.
- De Rycker J. y Halliwell B. (1978), Oxidation of thiol compounds by catalase and peroxidase in the presence of manganese (II) and phenols. *Biochem Soc Trans*. 6:1343-1345.
- Dexter DT., Wells FR., Lees AJ., Agaid Y., Jenner P y Marsden (1989), Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 52:1830–1836
- Dubocovich M., Delagrang P., Krause D., Sugden D., Cardinali D., Olcese J. (2010), Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev*. 62: 343–380.

E

-
- Ebadi M., Govitrapong P., Sharma S., Muralikrishnan D., Shavali S., Pellet L. (2001), Ubiquinone (Coenzyme q10) and mitochondria in oxidative stress of Parkinson's disease. *Biol Signals Recept.* 10:224-53.
 - Ebadi M., Srinivasan SK., Baxi MD. (1996.), Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 48:1-19.
 - Elble RJ., Cousins R., Leffler K. y Hughes L. (1996), Gait initiation by patients with lower-half parkinsonism. *Brain.* 119:1705–1716.
 - Erikson KM., Dobson A., Dorman D., Aschner M. (2004), Manganese exposure and induced oxidative stress in the rat brain. *Sci Total Environ.* 334: 409-416.
 - Erikson KM., John CE., Jones SR. y Aschner M. (2005), Manganese accumulation in striatum of mice exposed to toxic doses is dependent upon a functional dopamine transporter. *Environ Toxicol Pharmacol.* 20: 390-394.
 - Espejo EF., Montoro RJ., Armengol JA., Lopez-Barneo J. (1998), Cellular and functional recovery of Parkinsonian rats after intrastriatal transplantation of carotid body cell aggregates. *Neuron.* 20: 197-206.

F

- Fallon J. y Moore R. (1978), Catecholamine innervation of the basal forebrain IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *JCN.* 180: 545-579.
- Fernagut PO., Diguët E., Labattu B. y Tison F. (2002), A simple method to measure stride length as an index of nigrostriatal dysfunction in mice. *J Neurosc Meth.* 113: 123–130
- Ferreira M. y Massano J. (2017), An updated review of Parkinson's disease genetics and clinicopathological correlations, *Acta Neurol Scand* 135: 273-284.
- Fhan S. y Coen G. (1992), The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: Evidence supporting it. *Annals of Neurol.* 32: 804–812.

- Flint M., Fink J. y Martin J. (1994), Enfermedad de Parkinson y otros trastornos extrapiramidales". En Harrison principios de medicina interna. (2620-2626). Madrid: Interamericana McGraw Hill.
- Foltynie T., Goldberg TE., Lewis SGJ., Blackwell AD., Kolachana BS., Weinberg DR., Robbins TW. y Barker RA. (2004), Planning ability in Parkinson's disease is influenced by the COMT val58met polymorphism. *Mov Disord.* 19: 885-891.
- Foradori AC. (1967), The discrimination between Magnesium and Manganese by serum proteins. *J Gen Physiol.* 50: 2255-2266.
- Freund T., Powell J. y Smith A. (1984), Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience.* 13:1189-1179

G

-
- Garbayo E., Aymerich MS, Ansorena E., Lanciego JL. y Blanco-Prieto MJ. (2006), Terapias neuroprotectoras y neurorestauradoras para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. *Anales Sis San Navarra.* 29: 325-335.
 - Gerfen CR. (2006), Indirect-pathway neurons lose their spines in Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 9:157-158.
 - Gómez M., Roldan G., Morales R., Pérez G. y Torner C. (2012), Mecanismos fisiopatológicos involucrados en la enfermedad de Parkinson. *Arch Neurocién (Mex),* 17: 25-33.
 - Gómez M., Santos M., García R., Torner C. y Báez-Saldaña A. (2014), Desarrollo de la vía dopaminérgica nigroestriatal. *Arch Neurocién Mex.* 19(2), 95-103.
 - Gutiérrez-Valdez A. (2007), Comparación del efecto de diferentes Fármacos en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson. Tesis para obtener el grado de Maestría, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.
 - Gutiérrez-Valdez A., García-Ruiz R., Anaya-Martínez V., Torres-Esquível C., Espinosa-Villanueva J., Reynoso-Erazo L., Tron-Alvarez R., Aley-Medina P., Sánchez-Betancourt J., Montiel-Flores E. y Avila-Costa M. (2013), The combination of oral L-DOPA/rimonabant for the effective dyskinesia treatment and cytological

preservation in a rat model of Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia..
Behavioural pharmacology. 24: 640-652.

H

- Haber S., Fude J. y Mc Farland N. (2000), Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *J Neurosci.* 20: 2369-2382
- Halliwell B. Y Gutteridge J. (1985), Oxygen radicals and the nervous system. *TINS.* 8:22-29.
- HaMai D., Cambell A. y Bondy SC. (2001), Modulation of oxidative events by multivalent manganese complexes in brain tissue. *Free Radic Biol Med.* 31:763-768.
- Hardeland R., Cardinali D., Srinivasan V., Spence D., Brown G y Pandi-Perumal S. (2011), Melatonin: A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol.* 93:350-84.
- Hardman J., Limbird L., Molinoff P. y Ruddon R. (1996), Neurotransmisión: sistema nervioso motor autónomo y somático. En *Las bases farmacológicas de la Terapéutica* (524-549). Nueva York: McGraw-Hill.
- Hattori K., Naguro I., Runchel C. y Ichijo H. (2009), The roles of ASK family proteins in stress responses and diseases. *Cell Commun Signal.* 7:9.
- Heran AS., Stroupe ME., Cabelli DE., Ramilo CA., Luba JP., Tainer JA. y Silverman DN. (2003), Catalytic and structural effects of amino acid substitution at histidine 30 in human manganese superoxide dismutase: insertion of valine Cgamma into the substrate access channel. *Biochemistry.* 42: 2781-2789.
- Hernández DG., Reed X. y Singleton AB. (2016), Genetics in Parkinson disease: Mendelian versus non-mendelian inheritance. *J neurochem* 139:59-74.

- Hirsch E., Graybiel AM y Agid Y. (1988), Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature*. 334:345-348.
- Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H. (2000). The neuroprotective effect of inflammation: implications for therapy of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*.107:161-166.
- Horch, H y Katz, L. (2002). BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nature Neuroscience*. 5: 1177–1184.
- Hornykiewicz O. (2001), Parkinson Disease. En *Encyclopedia of life sciences* (10: 1-10). Australia. Nature Publishing Group.

I

- Ingham CA., Hood SH., Taggart P. y Arbuthnott GW. (1998), Plasticity of Synapses in the Rat Neostriatum after Unilateral Lesion of the Nigrostriatal Dopaminergic Pathway. *Jour Neurosci*. 18: 4732–4743.
- Iwaniuk AN. Y Whishaw IQ. (2000), On the origin of skilled forelimb movements. *Trends Neurosci*. 23: 372-376.

J

- Jankovic J. y Stacy M. (2007), Medical management of levodopa-associated motor complications in patients with Parkinson's disease. *CNS Drugs*. 21: 677-692.
- Jenner P. y Olanow CW. (1996), Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology*; 6: S161-70.
- Jin K.B., Shin Y.D., Jeong Y.M., Gwag R.M, Baik W.H., Yoon S.K., Cho H.Y., Joo S.W., Kim S.Y. y Baik H.H. (1998), Melatonin protects nigral dopaminergic neurons from MPP+ neurotoxicity in rats. *Neuroscience Letters* 245:61-64

- Joyce JN. (1991), Differential response of striatal dopamine and muscarinic cholinergic receptor subtypes to the loss of dopamine I. Effects of intranigral or intracerebroventricular 6-hydroxydopamine lesion of mesostriatal dopamine system. *Exp Neurol.* 113: 261-271.

K

- Kalia LV. y Lang AE. (2015), Parkinson's disease. *Lancet.* 386: 896-912.
- Kitai ST., Sugimori M. y Kocsis JD. (1976), Excitatory nature of dopamine in the nigro-caudate pathway. *Exp Brain Res.* 24(4):351-63
- Krüger R. (1998), Ala30Pro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease. *Nature Genet.* 18:106-8
- Kucukkaya B., Haklar G. y Yalcin AS. (1996), NMDA excitotoxicity and free radical generation in rat brain homogenates: application of a chemiluminescence assay. *Neurochem. Res.* 21:1533-1536.
- Kundurovic Z. y Sofic E. (2006), The effects of exogenous melatonin on the morphology of thyrocytes in pinealectomized and irradiated rats. *J neural Transm* 113: 49-58
- Kwakye GF., Paoliello MMB., Mukhopadhyay S., Bowman AB. y Aschner M. (2015), Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease: Shared and distinguishable features. *Int J Environment Res Public Health.* 12:7519-7540.

L

- Lang AE. (2009), When and how should treatment be started in Parkinson disease *Neurology.* 72:S39-S43.
- Langston JW., Langston EB. y Irwin I. (1984), MPTP-induced parkinsonism in human and non-human primates-- clinical and experimental aspects. *Acta Neurol Scand Suppl.* 100:49-54.
- Lansbury PT. y Brice A. (2002), Genetics of Parkinson's disease and biochemical studies of implicated gene products. *Curr Opin Cell Biol.* 14: 653-660.

- Larumbe-Ilundain RI., Ferrer-Valls JV., Viñes-Rueda JJ., Guerrero D. y Fraile P. (2001), Estudio casos-control de marcadores de estrés oxidativo y metabolismo del hierro plasmático en la enfermedad de Parkinson. *Rev Esp Salud Publica.* 75: 43–53.
- León J., Acuña-Castroviejo D., Escames G., Tan DX y Reiter RJ. (2005), Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res.* 38: 1-9.
- Lin B., Levy S., Raval A., Perez-Pinzon M y Defazio R. (2010), Forebrain ischemia triggers GABAergic system degeneration in substantia nigra at chronic stages in rats. *Cardiovasc psychiatry neurol.* 2010: 1-16.
- Linazasoro G. (2004), Spanish Dopamine Agonists Study Group. Conversion from dopamine agonists to pramipexole. An open-label trial in 227 patients with advanced Parkinson's disease. *J Neurol.* 251: 335-339

M

- Marttila RJ., Lorentz H. y Rinne UK. (1988), Oxygen toxicity protecting enzymes in Parkinson's disease. Increase of superoxide dismutase-like activity in the substantia nigra and basal nucleus. *J Neurol Sci.* 86:321-31.
- Mercuri NB. y Bernardi G. (2005), The 'magic' of L-Dopa: why is it the gold standard Parkinson's disease therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 26:341-344.
- McGuire V., Van Den Eeden SK., Tanner CM., Kamel F., Umbach DM., Marder K., Mayeux R., Ritz B., Ross GW., Petrovitch H., Topol B., Popat RA., Costello S., Manthripragada AD., Southwick A., Myers RM y Nelson LM. (2011), Association of DRD2 and DRD3 polymorphisms with Parkinson's disease in a multiethnic consortium. *J Neurol Sci.* 307:22-29.
- Micheli F. (2006), *Enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados.* Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Miklyyaeva EI., Castaneda E. y Whishaw IQ. (1994), Skilled reaching deficits in unilateral dopamine-depleted rats: impairments in movement and posture and compensatory adjustments. *J Neurosci.* 14:7148-1758.

- Miklyyaeva EI., Martens DJ. y Whishaw IQ. (1995), Impairments and compensatory adjustments in spontaneous movement after unilateral dopamine depletion in rats. *Brain Res.* 681: 23-40
- Milatovic D., Zaja-Milavitovic S., Gupta RC., Yu Y. y Aschner M. (2009), Oxidative damage and neurodegeneration in manganese induced neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 240: 219-225.
- Minguez A. y Escamilla F. (2005), Terapia celular y otras estrategias neuroregenerativas en la Enfermedad de Parkinson (II). *Rev Neurol.* 41(11): 684-693.
- Missale C, Russel N, Robinson SW, Jaber M. y Caron MG. (1998), Dopamine receptors from structure to function. *Physiol Rev.* 78: 189-225.
- Mizuno Y., Hattori N., Kitada T., Matsumine H., Mori H., Shimura H. Kubo S., Kobayashi H., Asakawa S., Minoshima S. y Shimizu N. (2001), Familial Parkinson's disease. Alpha-synuclein and parkin. *Adv Neurol.* 86: 13-21.
- Molina JA., Jimenez-Jimenez FJ., Orti-Pareja M. (1999), Complicaciones motoras y psíquicas en el tratamiento prologado con levodopa de la enfermedad de Parkinson complicada. *Rev Neurol.* 28: 982-990.
- Moriss M., Iansek R., Matyas T. y Summers J. (1994), The pathogenesis of gait hypokinesia in Parkinson's disease. *Brain.* 117:1169–1181.
- Moriss M., Iansek R., Matyas T. y Summers J. (1998), Abnormalities in the stride length–cadence relation in parkinsonian gait. *Mov Disord.* 13:61–69
- Morrow BA., Roth RH., Redmond DE., Diano S. y Elsworth JD. (2012), Susceptibility to a parkinsonian toxin varies during primate development. *Exp Neurol.* 235: 273-281.
- Murphy VA., Wadhvani KC., Smith QR. y Rapoport SI. (1991), Saturable transport of manganese II across the rat blood-brain barrier. *J neurochem.* 57: 948-954.

N

- Nagatomo S., Umehara F., Hanada K., Nobuhara Y., Takenaga S., Arimura K. y Osame M. (1999), Manganese intoxication during total parenteral nutrition: Report of two cases and review of the literature. *J Neurol Sci.* 162: 102-105.
- Nakagawara A., Liu X., Ikegaki N., White P., Yamashiro D., Nycum L., Biegel J y Brodeur G. (1995), "Clonación y localización cromosómica del gen del receptor de tirosina quinasa TRK-B humana (NTRK2)". *Genómica.* 25 (2): 538–46
- Nakanashi H. y Kita S. (1987), Intracellular Study of rat substantia nigra pars reticulata neurons in an vivo slice preparation: Electrical membrane properties and response Characteristic to subthalamic stimulation. *Brain Research.* 437: 45-55.
- Noyce A. y Bandopadhyay R. (2017), Parkinson's disease: Basic pathomechanisms and a clinical overview. En *Neurodegenerative Diseases Pathology, mechanisms, and Potential Therapeutic Targets.* (55-63). Switzerland: Springer.
- Núñez-Rosas A. (2013), Efecto de la melatonina en la actividad motora y citología de la corteza, hipocampo, cuerpo estriado y sustancia nigra compacta en ratas envejecidas. Tesis para obtener el grado de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

O

- Obeso JA. y Lanciego JL. (2011), Past, present and future of the pathophysiological model of the basal ganglia. *Front Neuroanat* 5: 1-6
- Obeso JA., Rodriguez-Oroz MC., Goetz CG., Marin C., Kordower JH., Rodriguez M., Hirsch EC., Farrer M., Schapira HV. Y Halliday G. (2010), Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med.* 16: 653-661.
- Olanow CW y Tatton WG. (1999), Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurosci.* 22:123-144.
- Ordoñez-Librado JL. (2007), Caracterización de un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson por inhalación de manganeso. Tesis para obtener el título de Maestría, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.
- Ordoñez-Librado JL., Gutierrez-Valdez AL., Colín-Barenque L., Anaya-Martínez V., Díaz-Bech P. y Avila-Costa MR. (2008), Inhalation of divalent and trivalent

manganese mixture induces a Parkinson's disease model: immunocytochemical and behavioral evidences. *Neuroscience*. 155:7-16.

- Ordoñez-Librado JL., Anaya-Martinez V., Gutierrez-Valdez AL., Montiel-Flores E., Corona DR., Martinez-Fong D., Avila-Costa MR. (2010). L-DOPA treatment reverses the motor alterations induced by manganese exposure as a Parkinson disease experimental model. *Neurosci Lett*. 471: 79-82.
- Ordoñez-Librado JL. (2012), Caracterización de un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson por inhalación de Mn: Aspectos bioquímicos, morfológicos y conductuales. Tesis para obtener el título de doctorado, Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM.
- Ospina N., Pérez C., Vargas J., Cervantes A. y Rodríguez M., (2017), Ganglios Basales y conducta. *Rev. Mex Neuroci*. 18: 74-86.
- Oyama Y., Okasaki E., Chikaisha L., Nagano T. y Sadakata C. (1996), Oxidative stress induced increase in intracellular Ca^{+2} and $Ca^{±2}$ induced increase in oxidative stress; An experimental model using dissociated rat brain neurons. *Jpn J Pharmacol*. 72: 381-385.

P

-
- Pérez AO. (2019), Interacción entre rotenona y manganeso para reproducir las características histológicas de la Enfermedad de Parkinson. Tesis para obtener el grado de Licenciatura, Ciudad universitaria, UNAM.
 - Piercy M. (1998), Pharmacology of pramipexole, a dopamine D3-preferring agonist useful in treating Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol*. 21:141-151.
 - Piñol-Ripoll G., Fuentes-Broto L., Millán-Plano S., Reyes-González M., Mauri J.A., Martínez-Ballarín E., Reiter R.J. y Garcia J.J. (2006), Protective effect of melatonin and pinoline on nitric oxide-induced lipid and protein peroxidation in rat brain homogenates. *Neurosci Lett*. 405:89-93.

- Polymeropoulos MH. (1997), Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 276: 2045-2047.
- Przedborski S. y Ischiropoulos H. (2005), Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*. 7: 685-693.
- Przedborski S, y Vila M. (2003), The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann NY Acad Sci*. 991: 189-198.

Q

- Qin ZH., Chen JF. y Weiss B. (1994), Lesions of mouse striatum induced by 6-hydroxidopamine differentially after the density, rate of synthesis, and level of gene expression of D1 and D2 dopamine receptors. *J. Neurochem*. Raven Press, NY. 411-420.

R

- Rabin O., Hegedus L., Bourre JM. y Smith QR. (2006), Rapid brain uptake of manganese II across the blood- rat barrier. *J Neurochem*. 61: 509-517.
- Radad K., Gille G. y Rausch WD. (2005), Short review on dopamine agonists insight into clinical and research studies relevant to Parkinson's disease. *Pharmacol Rep*. 57: 701-712.
- Rajib P., Banashree C., Arokiasamy J., Thamilarasan M., Pallab B. y Anupom B. (2018), Melatonin protects against behavioral deficits, dopamine loss and oxidative stress in homocysteine model of Parkinson's disease. *Life Sciences*. 192: 238-245.
- Ramaker C., Van de Beeck J., Finken J. y Van Hilten J. (2000), The efficacy and safety of adjunct bromocriptine therapy for levodopa-induced motor complications: A systemic review. *Mov Dis*. 15: 54-64.
- Rao G., Xia E. y Richardson A. (1990), Effect of age on the expression of antioxidant enzymes in male Fischer F344 rats. *Mech Ageing Dev*. 5: 49-60

- Rascol O., Payoux P., Ory F., Ferreira JJ., Brefel-Courbon C. y Montastruc JL. (2003), Limitations of current Parkinson's disease therapy. *Ann Neurol.* 53: S12-15.
- Reiner A. y Anderson K. (1990), The patterns of neurotransmitter and neuropeptide co-occurrence among striatal projection neurons: Conclusions based on recent findings. *Brain Res Rev.* 15: 251-265.
- Reiter R., Tan DX., Osuna C. y Gitto E. (2000), Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci.* 7: 444-458
- Reiter R. y Benitez G. (2009), Melatonin reduces neuronal loss and cytoskeletal deterioration: implications for psychiatry. *Salud Ment.* 32: 3-11.
- Reiter R., Paredes S., Manchester L. y Tan D. (2009), Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 44: 175–200.
- Rocchitta G., Rossana M., Esposito E., Marchetti B., Desole M.S., Miele E. y Serra P.A. (2006), Endogenous melatonin protects L-DOPA autooxidation in the striatal extracellular compartment of the freely moving rat: potential implication for long-term L-DOPA therapy in Parkinson's disease. *Journal of Pineal Research* 40(3):204-213
- Ropper A. y Samuels M. (2007), The Acquired Metabolic Disorders of the Nervous System. En Adams and Victor's Principles of Neurology (1011-1081). New York: McGraw-Hill's.
- Rosenblad C., Martinez-Serrano A. y Bjorklund A. (1998), Intrastratial glial cell line-derived neurotrophic factor promotes sprouting of spared nigrostriatal dopaminergic afferents and induces recovery of function in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 82: 129-137.
- Russo SM., Daniels AJ., Viveros OH. y Reinard JF. (1994), Differences in the reserpine- sensitive storage in vivo of 1-methyl-4-phenylpyridinium in rats and mice may explain differences in catecholamine toxicity to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurotoxicol Terato.* 16: 277-81.

S

- Sánchez-Betancourt J., Anaya-Martínez V., Gutierrez-Valdez AL., Ordoñez-Librado JL., Montiel-Flores E., Espinosa-Villanueva J., Reynoso-Erazo L. y Avila-Costa MR. (2012), Manganese mixture inhalation is a reliable Parkinson disease model in rats. *Neuro Toxicol.* 33: 1346-1355.
- Sánchez-Betancourt J. (2016), Caracterización de un modelo de la Enfermedad de Parkinson en rata por inhalación de manganeso. Tesis para obtener el título de Doctor en Psicología, Facultad de Estudios Superiores, UNAM.
- Santamaría AB., Cushing CA., Antonini JM., Finley BL. y Mowat FS. (2007), State of the Science Review: Does Manganese Exposure During Welding Pose a Neurological risk?. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 10: 417-465.
- Samadi P., Bédard PJ. y Rouillard C. (2006), Opioids and motor complications in Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 27: 512–517.
- Schapira AH. (2013), Recent developments in biomarkers in Parkinson disease. *Curr Opin Neurol.* 26: 395-400.
- Schmidt U., Beyer C., Oestreicher AB., Reisert I., Schilling K. y Pilgrim C. (1996), Activation of dopaminergic D1 receptors promotes morphogenesis of developing striatal neurons. *Neuroscience.* 74(2): 453-60
- Schul JB. y Lindenau J. (2000), Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem.* 267: 4904-4911.
- Schuler F. y Casida J. (2001), The insecticide target in the PSST subunit of complex I. *Pest Manag Sci.* 57: 932-940.
- Segal M. (1995), Dendritic spines for neuroprotection: a hypothesis. *Trends Neurosci.* 18: 468-441.
- Segura T., Galindo M., Rallo-Gutierrez B., Ceña V. y Jordan J. (2003), Dianas farmacológicas en las enfermedades neurodegenerativas. *Rev Neurol.* 36: 1047-1057.
- Shingo T., Date I., Yoshida H. y Ohmoto T. (2002), Neuroprotective and restorative effects of intrastriatal grafting of encapsulated GDNF-producing cells in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci Res.* 69: 946-954.
- Shishova E., Costanzo LD., Emig FA., Ash DE., y Christianson DW. (2009), Probing the specificity determinants of amino acid recognition by arginase. *Bochemistry.* 48: 121-131.

- Sistrunk SC., Ross MK. y Filipov N. (2007), Direct effects of manganese compounds on dopamine and its metabolite DOPAC. An in vitro Study. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2: 286-296.
- Smith Y., Beyan M., Shink E. y Bolam J. (1998), Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience.* 86: 353-388
- Smith Y. y Parent A. (1988), Neurons of the subthalamic nucleus in primates display glutamate but not GABA Immunoreactivity. *Brain Res.* 453: 353-356.
- Smith Y., Raju D., Nanda B., Pare JF., Galvan A. y Wichmann T. (2009), The thalamostriatal systems: anatomical and functional organization in normal and parkinsonian states. *Brain Res Bull.* 78: 60–68.
- Sohal RS. y Weindruch R. (1996), Oxidative stress caloric restriction, and aging. *Science.* 273: 59-63.
- Srinivasan V., Pandi- Perumal SR., Cardinali D., Poeggeler B. y Hardeland R. (2006), Melatonin in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Behav Brain Funct.* 2: 15.
- Suarez N. y Eriksson H. (1993), Receptor-mediated endocytosis of a manganese complex of transferrin into neuroblastoma (SHSY5Y) cells in culture. *J Neurochem.* 61: 127-131.
- Sung-Wuk J., Xia L., Sompol P., Gianluca T., Qiang., P. Michael I. y Keqiang Y.. (2009). N-acetylserotonin activates TrkB receptor in a circadian rhythm. *PNAS.* 107:3876–3881.

T

- Takeda A. (2003), Manganese action in brain function. *Brain Res Rev.* 41: 79-87.
- Tan D., Manchester L., Hardeland R., Lopez-Burillo S., Mayo J., Sainz R. y Reiter R. (2003), Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res.* 34: 75-8.
- Tanner C. (1989), The role of environmental toxins in the etiology of Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 12: 49-54.

U

- Ungerstedt U. (1968), 6-Hydroxipamine induced degeneration of central monoaminergic neurons. *Eur J Pharmacol.* 5:107-110.
- Ungerstedt U. (1971), Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl.* 367: 95-122.

V

- Ventura-Chávez R., Gil A. y García S. (2019), Factores asociados a la enfermedad de Parkinson en pacientes de la Comarca Lagunera, México. *Rev Mex Neuroci.* 20: 174-179.

W

- Waxman EA. y Giasson BI. (2011). Induction of intracellular tau aggregation is promoted by alpha-synuclein seeds and provides novel insights into the hyperphosphorylation of tau. *J.Neurosci.* 31:7604-7618.
- Whetten-Goldstein K., Sloan F., Kulas E., Cutson T. y Schenkman M. (1997), The burden of Parkinson's disease on society, family, and the individual. *J Am Geriatr Soc.* 45: 844-849.
- Wichman T, DeLong MR. (1993), Pathophysiology of parkinsonian motor abnormalities. *Adv Neurol.*60: 53–61.
- Willis AW. (2013), Parkinson disease in the elderly adult. *Mo Med.* 110: 406-410.
- Wilson CJ, Groves PM. (1981). Spontaneous firing patterns of identified spiny neurons in the rat neostriatum. *Brain Res,* 7;220(1):67-80.
- Wilson CJ. (1993), The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. *Prog Brain Res.* 991: 277-297
- Whishaw IQ., Suchowersky O., Davis L., Sarna J., Metz GA. y 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. *Behavioral Brain Res,* 133: 165–176.

- Wurtman, R.J., Axelrod, J. (1968). The formation, metabolism and physiologic effects of melatonin. *Adv Pharmacol*6, 141-151.

Z

- Zhang S., Fu J. y Zhou Z. (2004), In vitro effect of manganese chloride exposure on reactive oxygen species generation and respiratory chain complexes activities of mitochondria isolated from rat brain. *Toxicol in Vitro*. 18: 71–77.
- Zuazua-Vidal L., Navarro-Roa C., Balderas-Juárez Á., Alcocer-Salas Á., Pérez-González V., Cervantes-Arriaga A., Rodríguez-Violante M. (2019), Pruebas Terapéuticas con Fines Diagnósticos en Trastornos del Movimiento. *Rev. Ecuat. Neurol*. 28: 70-80.
- Zwingmann C., Leibfritz, D. y Hazell AS. (2004), Brain Energy metabolism in a sub-acute rat model of manganese Neurotoxicity: An Ex Vivo Nuclear Magnetic Resonance Study Using (1-13 C) Glucose. *Neurotoxicology* 25: 573-587.