



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DEL ESTADO DE MORELOS**

FACULTAD DE FARMACIA



*Facultad
de Farmacia*
Conocimiento al servicio de la salud

**EFFECTO DEL HIDROXITIROSOLO SOBRE LOS NIVELES DE
DOPAMINA Y RECUPERACIÓN FUNCIONAL EN EL
MODELO DE NADO FORZADO DE RATAS TRATADAS
CON MPP⁺**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN FARMACIA

PRESENTA

QFB. KATIA DINORAH SÁNCHEZ GONZÁLEZ

Director de Tesis

Dr. ANTONIO MONROY NOYOLA

Enero 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UAEM
*Facultad
de Farmacia*
Compromiso al servicio de la salud

FACULTAD DE FARMACIA

Consejo Interno de Posgrado

MAESTRÍA EN FARMACIA

Fecha: 07 de junio de 2018

Asunto: jurado

Medio de notificación: Impresa/personal

Folio: FF/D/Sac/CIP/MF/096/2018

**Q.F.B. KATIA DINORAH SÁNCHEZ GONZÁLEZ
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA
P R E S E N T E**

Por este medio le informo que, con base en la propuesta hecha en su solicitud, el Consejo Interno de Posgrado le asigno el siguiente jurado para evaluar la tesis **"EFECTO DEL HIDROXITIRO SOL SOBRE LOS NIVELES DE DOPAMINA Y RECUPERACIÓN FUNCIONAL EN EL MODELO DE NADO FORZADO DE RATAS TRATADAS CON MPP"**

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

Presidente: Dra. María de Lourdes Rodríguez Fragoso

Secretario: Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

Vocal 1: Dr. Pedro Iván Pérez Neri

Vocal 2: Dr. German Bernal Fernández

Vocal 3: Dr. Sergio Montes López

Se le solicita entregar las tesis al jurado designado y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dr. Julio César Rivera Leyva.
Jefatura de Posgrado

ccp: archivo, Dra. María de Lourdes Rodríguez Fragoso, Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez, Dr. Pedro Iván Pérez Neri, Dr. German Bernal Fernández, Dr. Sergio Montes López

mitv

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, 1er. Piso Torre de Rectoría,
Tel. (777) 329 701 1, 329 70, 00, Ext. 3582 / administracion@uaem.mx

**UA
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Neuroprotección, Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos bajo la dirección del Dr. Antonio Monroy Noyola. En colaboración con el laboratorio 17 de Conducta del Centro de Investigación y Estudios Avanzados sede Sur bajo la dirección de la Dra. Carolina López Ruvalcaba y con el departamento de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía bajo la dirección del Dr. Sergio Montes López.

Durante la elaboración de esta tesis se contó con el apoyo de CONACYT a través de la beca de maestría número 598080, así como el apoyo parcial del proyecto SEP/CONACYT 257092.

ABREVIATURAS

AAD	Enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa
BHE	Barrera Hematoencefálica
BH4	Tetrahidrobiopterina
EA	Enfermedad de Alzheimer
EH	Enfermedad de Huntington
EP	Enfermedad de Parkinson
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
CMC	Carboximetilcelulosa
CoQ	Coenzima Q10
DA	Dopamina
DJ-1	Proteín deglicasa
DBS	Estimulación cerebral profunda
DMSO	Dimetilsulfóxido
FST	Forced swimming test (Prueba de nado forzado)
GPCR	Proteína 7 transmembrana G
GPI	Globus pallidus internus
HT	Hidroxitirosol
HVA	Ácido homovanílico
IC50	Concentración máxima inhibitoria 50
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
MAO	Monoaminoxidasa
MAO-A	Monoaminoxidasa A

MAO-B	Monoaminoxidasa B
MDMA	3,4-metilendioximetanfetamina
mGluR	Receptores metabotrópicos de glutamato
MMP	Potencial de membrana mitocondrial
MPP⁺	4-fenil-1-metilpiridinio
MPT	Permeabilidad mitocondrial
MPPP	1-metil-4-fenilpropionoxipiperidina
MPTP	4-fenil-1-metil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NA	Noradrenalina
nM	Nanomolar
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintasa
PCA	<i>p</i> -cloroanfetamina
TAD	Transportador de dopamina
TH	Tirosina Hidroxilasa
Thy-1	Gen, también llamado CD90 (Cluster of Differentiation 90)
TID	Transtorno de identidad disociativa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SNC	Sistema nervioso central
SNCA	Gen alfa-sinucleína
SNpc	Sustancia nigra pars compacta
STN	Núcleo subtalámico
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas
6-OHDA	Oxidopamina

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE GRÁFICAS	V
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
MARCO TEÓRICO	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 ENFERMEDAD DE PARKINSON	8
1.1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS	9
1.1.2 TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	10
1.1.3 Modelos de estudio de la enfermedad de Parkinson	12
1.1.3.1 Modelos basados en el uso de plaguicidas	13
1.1.3.2 Modelos farmacológicos	18
1.1.3.3 Modelos basados en el uso de toxinas	20
1.1.3.4 Modelos genéticos de inducción de Parkinson	25
1.2 DOPAMINA	29
1.3 VÍAS DOPAMINÉRGICAS	31
1.3.1 Vía mesolímbica	31
1.3.2 Vía mesocortical	31
1.3.3 Vía nigroestriada	31
1.3.4 Vía tuberoinfundibular	31
1.4 SÍNTESIS DE LA DOPAMINA	32
1.5 CATABOLISMO DE LA DOPAMINA	33
1.6 HIDROXITIROSONOL	34
1.7 DEPRESIÓN	35
1.7.1 Definición	35
1.7.2 Descripción clínica	36
1.8.3 Modelos de estudio de la depresión	38
a) Modelos farmacológicos	38
b) Modelos de estrés	39
c) Modelos quirúrgicos	40
d) Modelos genéticos	41

JUSTIFICACIÓN	43
HIPÓTESIS.....	45
OBJETIVO GENERAL	46
DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	47
2.1 Animales, grupos, tratamientos	48
2.2 Prueba de actividad motriz	48
2.3 Modelo de la EP por MPP+	49
2.4 Modelo de nado forzado	49
2.5 Evaluación del daño neuronal por prueba conductual	50
2.6 Catecolaminas por HPLC	51
2.7 Estadística	51
RESULTADOS Y	52
DISCUSIÓN	52
3.1 Prueba de actividad motriz	53
3.2 Prueba de nado forzado	55
3.3 Prueba conductual de giros	58
3.4 Niveles de dopamina y HVA	61
CONCLUSIONES	66
PERSPECTIVAS.....	68
BIBLIOGRAFÍA.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura química de la dopamina.	13
Figura 2. Mecanismo fisiopatológico de los principales agentes neurotóxicos empleados en modelos de parkinsonismo.	15
Figura 3. Comparación estructural de herbicida paraquat con MPP+, metabolito de la toxina MPTP.	17
Figura 4. Estructura química de la dopamina.	21
Figura 5. Estructura química del MPTP.	24
Figura 6. Estructura química de la dopamina.	29
Figura 7. Síntesis de la adrenalina.	32
Figura 8. Catabolismo de la dopamina.	33
Figura 9. Estructura química del hidroxitirosol.	34
Figura 10. El hidroxitirosol como atrapador de radicales libres.	35
Figura 11. Prueba de actividad motriz.	48
Figura 12. Administración intraestriatal de MPP ⁺ por cirugía estereotáxica.	49
Figura 13. Modelo de nado forzado.	50
Figura 14. Evaluación del daño neuronal por prueba conductual.	50

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Prueba de actividad motriz	53
Gráfica 2. Prueba de nado forzado: Escalamiento	55
Gráfica 3. Prueba de nado forzado: Nado	56
Gráfica 4. Prueba de nado forzado: Inmovilidad	57
Gráfica 5. Prueba conductual de giros ipsilaterales	59
Gráfica 6. Efecto del hidroxitirosol sobre los niveles de DA en el cuerpo estriado en la rata	62
Gráfica 7. Efecto del hidroxitirosol sobre los niveles de HVA en el cuerpo estriado en la rata	64

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo progresivo caracterizado por la pérdida irreversible de neuronas dopaminérgicas en la vía nigroestriada. La rigidez muscular, temblor en reposo, así como la pérdida y la lentitud de movimiento (acinesia y bradicinesia) son los principales signos motores de la EP a la que en un principio se le denominó “parálisis agitante”. La 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) se usa para modelar la enfermedad en los primates, en los humanos se presentó alguna vez una intoxicación que llevó a una concisión semejante a la enfermedad, en la cual hay una disminución de los niveles de dopamina (DA) inducida por una pérdida neuronal dopaminérgica por un incremento del estrés oxidativo. Actualmente la EP es una enfermedad neurodegenerativa irreversible sin tratamiento farmacológico que la revierta. El hidroxitirosol es un polifenol con actividad biológica antioxidante, el cual se encuentra en productos naturales como la aceituna y en el aceite de oliva virgen en forma libre o en forma de éster, contribuyendo en un 70 a un 80% a la fracción fenólica total. Este compuesto es responsable junto con otros compuestos fenólicos del sabor amargo característico del aceite de oliva así como de su elevada estabilidad debido a la actividad antioxidante del hidroxitirosol. En el presente estudio muestra el efecto neuroprotector del hidroxitirosol en el modelo de nado forzado en rata. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (250-280 g; n=9/grupo) los cuales fueron divididos en 5 grupos con base en su tratamiento farmacológico: 1) grupo sham (S), 2) grupo control (C), 3) grupo hidroxitirosol (H), 4) grupo MPP⁺ (M) y 5) grupo MPP⁺/hidroxitirosol (MH). El día 1, todos los grupos recibieron una inyección intraestriatal. Mientras los animales del grupo S solo recibieron un daño mecánico; las ratas del grupo C recibieron una inyección por vía intravenosa (i.v.) de solución salina (1.5 mg/Kg) y 5 minutos después recibieron una inyección intraestriatal también de solución salina (8 µL); los animales del grupo H recibieron por vía i.v. hidroxitirosol (1.5 mg/Kg) y solución salina (8 µL) intraestriatalmente; las ratas del grupo M fueron inyectados estriatalmente con MPP⁺ (8 µg/µL); y finalmente, los animales del grupo MH fueron administrados por vía i.v. con hidroxitirosol (1.5 mg/Kg) y con MPP⁺ (8 µL) por estriatalmente. Al quinto día posterior a la administración de MPP⁺ cada uno de los animales se sometieron a la pre prueba de nado forzado, para después evaluarse al sexto día en esta prueba. También, se evaluó en este día la motricidad y la conducta de giros ipsilaterales administrando apomorfina.

Finalmente se disectó la región cerebral cuerpo estriado derecho para la cuantificación de dopamina y HVA por HPLC con detección electroquímica.

Los resultados muestran que una vez que fueron manipulados los animales con los diferentes tratamientos no presentaron ninguna alteración motora. Mientras que en la prueba de nado forzado mostró que el tratamiento de hidroxitirosol incrementó de manera significativa ($p < 0.05$) la conducta de escalamiento (50%) de ratas tratadas con MPP⁺ en comparación con el grupo M que fue tratado sólo con MPP⁺. Así también dicho tratamiento con este fenilpropanoide disminuyó significativamente ($p < 0.05$) la conducta de inmovilidad que fue de un 60%. Esta recuperación funcional de la administración de hidroxitirosol en el modelo de nado forzado de ratas tratadas con MPP⁺ fue corroborado con el incremento de los niveles de DA y HVA en comparación con los niveles de ratas tratadas sólo con la neurotoxina.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by the irreversible loss of dopaminergic neurons in the nigrostriatal pathway. Muscle rigidity, tremor at rest, as well as loss and slowness of movement (akinesia and bradykinesia) are the main motor signs of PD that was initially called "agitation paralysis". 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) causes EP in humans and higher primates by decreasing dopamine (DA) levels induced by a neuronal dopaminergic loss by an increase in oxidative stress. Currently, PD is an irreversible neurodegenerative disease without any treatment that reverses it. Hydroxytyrosol is a polyphenol with antioxidant biological activity, which is found in natural products such as olives and virgin olive oil in free form or ester form, contributing 70 to 80% to the total phenolic fraction. This compound is responsible together with other phenolic compounds of the bitter taste characteristic of olive oil as well as its high stability due to the antioxidant activity of hydroxytyrosol. The present study shows the neuroprotective effect of hydroxytyrosol in the model of forced swimming in the rat. Male rats of the Wistar strain (250-280 g, n = 9 / group) were used, which were divided into 5 groups based on their treatment: 1) sham group (S), 2) control group (C), 3) MPP⁺ group (M), 4) hydroxytyrosol group (H) and 5) MPP⁺/hydroxytyrosol (MH). On day 1, all groups received an intrastriatal injection. While the animals of group S only received mechanical damage; the rats in group C received an intrastriatal injection of saline solution (8 µL) and another injection intravenously (i.v.) also saline (1.5 mg/Kg); the animals of group H received saline solution (8 µL) intrastriatally and i.v. hydroxytyrosol (1.5 mg/Kg) the rats of group M were injected striatally with MPP⁺ (8 µg/µL); and finally, the animals of the MH group were administered intrastriatally with MPP⁺ (8 µL) and hydroxytyrosol by i.v. (1.5 mg/Kg).

On the fifth day after the administration of MPP⁺, each of the animals underwent the pre-test for forced swimming, and then evaluated on the sixth day in this test. Also, motility and turn behavior was evaluated by administering apomorphine. Finally, the cerebral region of the right striatum was dissected for the quantification of dopamine HVA by HPLC with electrochemical detection. The results show that once the animals were manipulated with the different treatments they did not present any motor alteration. While in the forced swim test showed that the treatment of hydroxytyrosol significantly increased (p <0.05) the scaling behavior (50%) of rats treated with MPP⁺ compared to the group M that was

treated only with MPP⁺. Also, this treatment with this phenylpropanoid significantly decreased ($p < 0.05$) the immobility behavior that was 60%. This functional recovery of the administration of hydroxytyrosol in the forced swimming model of rats treated with MPP⁺ was corroborated with the increase in DA and HVA levels compared to the levels of rats treated only with the neurotoxin. This study demonstrates the neuroprotective effect of hydroxytyrosol in the forced swimming model of rats treated with MPP⁺.

MARCO TEÓRICO

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP), que afecta al 1% de la población mayor de 65 años, se conoce como el segundo trastorno neurodegenerativo más común después de la enfermedad de Alzheimer. La enfermedad se caracteriza por una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta (SNpc) del mesencéfalo (Kikuchi *et al.*, 2017) y la agregación de α -sinucleína y la formación de inclusiones intraneuronales en las neuronas dopaminérgicas restantes llamados cuerpos de Lewy, que es una característica patológica definitoria de la EP (Spillantini *et al.*, 1997; Tsuchida *et al.*, 2018), que acompaña a defectos motores (temblor estático, desequilibrio postural, bradicinesia y rigidez muscular) y síntomas no motores (alteraciones del sueño, depresión deterioro cognitivo (Chaudhuri *et al.*, 2005; Langston, 2006, Obeso *et al.*, 2017). Las manifestaciones clínicas de la EP se presentan hasta que hay una pérdida del 50-60% de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y una disminución del 80-85% del contenido de dopamina estriatal (Blum, D. *et al.*, 2001; Blum *et al.*, 2015). Clínicamente esta enfermedad se caracteriza por temblor en reposo, alteraciones del movimiento (bradicinesia, acinesia e hipocinesia) y rigidez muscular (Gómez A., 2007), principalmente.

La etiología de la enfermedad de Parkinson esporádica no ha sido esclarecida, existe una creciente preocupación de que los factores ambientales, como la exposición a neurotoxinas aumentan el riesgo de desarrollar EP. En este sentido, el MPTP a través de su metabolito activo ionizado de 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺) puede ser un problema que contribuye en la etiopatogenia de la enfermedad (Wang X *et al.*, 2011). El MPTP causa EP en seres humanos y primates no humanos por la disminución de los niveles de dopamina y de la actividad tirosina hidroxilasa, deteriorando la captación de dopamina e inducir la pérdida neuronal dopaminérgica. En ratas la administración sistémica de MPTP es poco usada por los riesgos que representa su manejo, por lo tanto se administra por inyección estereotáxica el metabolito tóxico del MPTP, el MPP⁺ (Staal y Sonsalla, 2000). En estudios *in vitro* e *in vivo* del modelo por MPP⁺ se muestra la degeneración de neuronas dopaminérgicas localizadas en la sustancia nigra, seguida de una disminución de dopamina, así como de su enzima biosintética, tirosina hidroxilasa. La muerte neuronal

inducida por MPP⁺, es mediada por la apertura de los poros de transición de permeabilidad mitocondrial (MPT) y el colapso del potencial de membrana mitocondrial (MMP) (Seaton *et al.*, 1997). Esto conlleva a la incapacidad de producción de ATP y al incremento de generación de radicales libres, y eventualmente la muerte neuronal dopaminérgica (Alcaraz-Zubeldía *et al.*, 2001; Boll *et al.*, 2011).

El hidroxitirosol es un *o*-difenoil con una importante actividad biológica que se encuentra en la naturaleza en la aceituna y en el aceite de oliva extra virgen en forma libre o en forma de éster, contribuyendo en un 70 a un 80% a la fracción fenólica total. Este compuesto es responsable junto con otros compuestos fenólicos del sabor amargo característico del aceite de oliva así como de su elevada estabilidad debido a su gran actividad antioxidante. Diferentes trabajos muestran que el hidroxitirosol puede proteger a las células del sistema nervioso central de morir tras la exposición a inductores de estrés oxidativo (Perona *et al.*, 2005).

1.1 ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo común, con una mayor incidencia entre las personas mayores de 60 años. La principal característica clínica de la EP es la deficiencia motora, que incluye temblores en reposo, rigidez muscular y bradicinesia. Las características patológicas de la EP son la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra (SN) y la formación de cuerpos de inclusión en el citoplasma. Las manifestaciones clínicas de la EP se presentan hasta que hay una pérdida del 50-60% de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y una disminución del 80-85% del contenido de dopamina estriatal (Blum, D. *et al.*, 2001; Tenenbaum *et al.*, 2002; Blum *et al.*, 2015). La EP tiene una etiología compleja y multifactorial que incluye disfunción mitocondrial, excitotoxicidad del glutamato, apoptosis, estrés oxidativo, disfunción del proteasoma, susceptibilidad genética y exposiciones ambientales (Riess y Kruger, 1999; Shulman *et al.*, 2011; Kalia y Lang, 2015; Poewe *et al.*, 2017). Con respecto a los factores ambientales, se han identificado varios contaminantes neurotóxicos, incluyendo 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). Además, algunos pesticidas/herbicidas, como rotenona y paraquat causan neurotoxicidad e inducen una patología de tipo EP.

El estrés oxidativo y la neuroinflamación son dos mecanismos patogénicos principales que pueden contribuir al daño neuronal dopaminérgico (Surendran *et al.*, 2010; Tiwari *et al.*, 2017). Por lo tanto, una inyección de MPTP podría causar neurotoxicidad y daño selectivo de las neuronas dopaminérgicas, y lo convierte en un método ampliamente utilizado para establecer el modelo de EP animal (Yokoyama *et al.*, 2008). La terapia de reemplazo de dopamina actual solo alivia los síntomas pero no puede impedir el proceso neurodegenerativo. Mientras tanto, su uso a largo plazo a menudo causa complicaciones motoras de efectos secundarios y discinesia (Bargiotas y Konitsiotis, 2013). Por lo tanto, la identificación de agentes neuroprotectores efectivos y la exploración de sus mecanismos contra la pérdida de neuronas dopaminérgicas sigue siendo un desafío importante para el tratamiento de la EP.

Clínicamente esta enfermedad se caracteriza por temblor en reposo, alteraciones del movimiento (bradicinesia, acinesia e hipocinesia) y rigidez muscular (Gómez A., 2007), principalmente. En ratas la administración sistémica de MPTP es poco usada por los riesgos que representa su manejo, en la gran mayoría de estudios se administra por inyección estereotáxica el metabolito tóxico del MPTP, el MPP⁺ (Staal y Sonsalla, 2000).

Se han desarrollado varios modelos de tipo EP in vitro e in vivo para comprender la fisiopatología de la EP y evaluar diferentes estrategias terapéuticas para combatir la neurodegeneración dopaminérgica.

1.1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El segundo trastorno neurodegenerativo más común en las poblaciones humanas a nivel mundial es la Enfermedad de Parkinson (EP), la cual es originada por la muerte de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (De Rijk *et al.*, 2000, Parry *et al.*, 2018). Las primeras descripciones de este padecimiento de las que se tiene registro son las realizadas por Galeno en el siglo II D.C. y Sylvius de le Boe en el siglo XVIII D.C. Este último distinguió dos tipos de temblores; uno, *tremor coactus*, que se observó en el estado de reposo y el segundo *motus tremulous*, que se presentó durante los movimientos voluntarios del paciente. Un siglo después François Boissier de Sauvages añadió a estas descripciones los temblores de reposo a los cuales les nombró plapitaciones, estos síntomas desaparecían cuando el paciente realizaba algún movimiento. Sin embargo, fue hasta 1817 cuando el Dr. James Parkinson realizó la primera descripción formal y detallada de la EP que denominó parálisis agitante. El cuadro clínico que mencionó fue el movimiento involuntario con una disminución del poder muscular, una propensión a doblar el tronco hacia delante, y pasar de un caminar a un ritmo de carrera: los sentidos e intelectos ilesos. Cincuenta años después, Jean-Martin Charcot describió a la bradicinesia como una característica cardinal separada de la enfermedad (Charcot, 1872). Charcot y sus estudiantes describieron la clínica de la EP, describieron en detalle los cambios artríticos, la disautonomía y el dolor que acompaña a la enfermedad. Charcot era el primero en sugerir el uso del término “Enfermedad de Parkinson”, rechazando la designación de parálisis agitante de James Parkinson, ya que decía que los pacientes con la enfermedad no necesariamente podrían tener temblor (Charcot, 1872).

Más tarde, William Gower contribuyó en un estudio sobre la enfermedad: “Manual de Enfermedades del Sistema Nervioso”, donde describió su experiencia con 80 pacientes. Richer y Meige (1895) proporcionaron detalles clínicos y morfológicos de las etapas progresivas de la discapacidad parkinsoniana. Babinski comentó sobre el extraño control motor de la enfermedad (1921). Brissaud propuso los daños causados a la SN pero fueron Tre'tiakoff, Foix y Nicolesco quienes estudiaron la patología en el mesencéfalo en relación con la enfermedad durante la década de 1920 (Tre'tiakoff, 1921; Brissaud 1925; Foix y Nicolesso, 1925). El análisis patológico más complejo de la EP y la delineación clara de las lesiones del tallo cerebral se realizó por Greenfield y Bosanquet en 1953. La morbilidad y la progresión clínica de la EP fue estudiado por Hoehn y Yahr (Hoehn y Yahr, 1967). Finalmente, Carlsson y Hornikyewicz en 1950 notaron la deficiencia de dopamina (DA) en cerebro humano (García *et al.*, 2008).

1.1.2 TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Existen diferentes tratamientos que permiten aliviar algunos de los síntomas de la EP y enlentecer su curso. Éstos pueden clasificarse en 4 tipos diferentes: farmacoterapia, neurocirugía funcional, trasplante y terapia génica y por último, el tratamiento farmacológico.

1.1.2.1 Farmacoterapia

Los tratamientos farmacológicos se centran en recuperar los niveles de DA a nivel cerebral, entre los más usados se encuentran agonistas dopaminérgicos, no dopaminérgicos inhibidores de la MAO e inhibidores de la COMT. (Baldessarini, 2003; Woitalla *et al.*, 2018).

a) Agonistas dopaminérgicos:

Disminuyen el riesgo de desarrollar discinesia, distonía y fluctuaciones en la actividad motora, sin embargo, se asocian a una serie de efectos secundarios como somnolencia, edema, estreñimiento, mareo, alucinaciones y náuseas, por lo tanto, los pacientes optan por abandonar el tratamiento (Hitzema, 2009; Cao *et al.*, 2018). El fármaco de elección en cuanto a sintomatología es la Levodopa (L-DOPA). Ésta se descarboxila por acción de la

enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (AAD) a nivel cerebral produciendo DA. Los agonistas dopaminérgicos pueden ser productos derivados o no del cornezuelo de centeno (ergot); los derivados son: pergolida, apomorfina y bromocriptina, y los no derivados son: ropinirol y pramipexol (Leentjens, 2011). Todos los agonistas dopaminérgicos utilizados para el control de la sintomatología motora del paciente con EP actúan sobre los receptores dopaminérgicos tipo 2 (D2), cuya concentración es alta en el cuerpo estriado.

b) No dopaminérgicos:

La amantadina es un antagonista del receptor *N*-metil-D-aspartato (NMDA) utilizada en el tratamiento de la EP que tiene beneficios sintomáticos leves y puede disminuir la TID en una proporción de pacientes (Paquette *et al.*, 2012; Rascol *et al.*, 2015).

c) Inhibidores de la MAO:

Algunos de ellos son la selegilina, rasagilina y la safinamida, éstos son inhibidores de la MAO B y se utilizan para aumentar la concentración de DA en la sinapsis al impedir la acción de la MAO (Jain, 2012).

d) Inhibidores de la COMT:

El control de síntomas de la EP requiere el agregado de otros fármacos junto con la levodopa. Algunos inhibidores de la COMT son la tolcapona y la entacapona (Zhang *et al.*, 2018), los cuales tienen como objetivo incrementar la duración del efecto de cada dosis de levodopa y por lo tanto reducir el periodo “off” de los pacientes, durante el cual permanecen relativamente inmóviles (Deane *et al.*, 2004; Maser *et al.*, 2017).

1.1.2.2 Neurocirugía funcional y trasplante

Se ha utilizado en la EP ya avanzada, incluida la estimulación cerebral profunda y la lesión (Rowland *et al.*, 2016; Vergahen Metman *et al.*, 2016). El tratamiento quirúrgico se logra mediante palidotomía y globus pallidus internus (Gpi) estimulación cerebral profunda (DBS) y subtalamotomía y DBS del núcleo subtalámico (Poortvliet *et al.*, 2015; Hamani *et al.*, 2016). La cirugía Gpi tiene un efecto directo sobre la discinesia, mientras que la estimulación cerebral profunda (DBS) del núcleo subtalámico (STN) tiene un beneficio en

la reducción de la dosis de fármaco dopaminérgico (Munhoz *et al.*, 2014; Poortvliet *et al.*, 2015).

1.1.2.3 Terapia génica

Por el momento, la terapia génica es principalmente experimental pero la ventaja aquí es que se puede liberar un gen como agente en una región específica del cerebro para alterar la función y tratar la EP (Stayte y Vissel, 2014).

1.1.3 Modelos de estudio de la enfermedad de Parkinson

Diversas líneas de evidencia señalan que algunos casos la pérdida dopaminérgica se acompaña de deficiencias colinérgicas y de otros neurotransmisores que implican la expresión de otros síntomas no motores, principalmente en estados avanzados afectándose funciones ejecutivas, habilidades y visoespaciales, memoria, lenguaje e inclusive pueden llegar a presentarse cuadros demenciales. Aunque se desconoce su etiología exacta se proponen diversos mecanismos como causa de esta patología; algunos de estos fundamentados y de carácter principalmente ambiental y genético. Dentro de los mecanismos se incluye como factor principal el estrés oxidativo como respuesta a radicales libres y peróxidos formados principalmente en las reacciones de generación energética en las mitocondrias; gases tóxicos emitidos ambientalmente, manganeso, organofosforados, monóxido de carbono, radicales ionizantes, inclusive las infecciones virales pueden desencadenar síntomas parkinsonianos. Dentro de otros mecanismos propuestos como etiología de la enfermedad se encuentran la disfunción mitocondrial, alteración del citoesqueleto neuronal y finalmente apoptosis como consecuencia de procesos subyacentes. Todos los mecanismos propuestos se basan en la excitotoxicidad debido a la constante y alterada activación de los receptores para neurotransmisores de naturaleza excitadora, como el glutamato que aumenta la permeabilidad a calcio y por ende eleva las concentraciones intracelulares de este ion lo que desencadena daño y muerte celular. Hoy en día, se han desarrollado diferentes modelos experimentales de parkinsonismo *in vivo* a base de fármacos, pesticidas, toxinas e inclusive a partir de ingeniería genética, con el objetivo de estudiar los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad de Parkinson, así como probar diferentes moléculas enfocadas al tratamiento de ésta (Zeng *et al.*, 2018).

1.1.3.1 Modelos basados en el uso de plaguicidas

El término plaguicida, se incluye en los biocidas y hace referencia a todas aquellas sustancias de origen natural o sintético utilizadas para exterminar, prevenir, repeler o controlar cualquier plaga u organismo no deseado; dentro de los plaguicidas se clasifican los insecticidas, herbicidas y fungicidas (Ortiz *et al.*, 2011). Entre los diversos factores se ha mostrado gran interés en el uso de plaguicidas para la reproducción de modelos de parkinsonismo (Ortiz *et al.*, 2011; Van-der-Mark *et al.*, 2012). Uno de los insecticidas más estudiados y utilizados en modelos de parkinsonismo es la rotenona, ésta al igual que el herbicida paraquat, es selectivamente tóxica a las neuronas dopaminérgicas nigroestriales lo que desencadena un cuadro clínico similar al que se presenta en la EP.

a) Rotenona

La rotenona es insecticida polivalente que se extrae de ciertas raíces de plantas, se usa principalmente para matar plagas vegetales y agrícolas (Figura 1). La rotenona puede cruzar la barrera hematoencefálica y la biomembrana fácilmente. Una vez en las neuronas dopaminérgicas, la rotenona inhibe la actividad del complejo mitocondrial I causando la producción de ROS y la disfunción mitocondrial (Cannon y Greenamyre, 2013; Terron *et al.*, 2018).

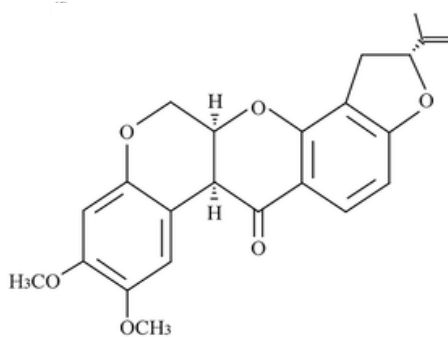


Figura 1. Estructura química de la rotenona. La rotenona inhibe el complejo I de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, disminuye la cantidad de ATP y promueve el aumento de especies reactivas de oxígeno, generando daño y muerte neuronal

Entre los modelos que hoy se manejan para representar la EP, el de rotenona es uno de los que más se han destacado, principalmente por tres puntos: 1) Reproduce la mayor

parte de los trastornos motores y las características histopatológicas de la EP, incluso cuerpos de Lewy y algunas afecciones asociadas a la α -sinucleína (Mulcahy *et al.*, 2011; Xiong N *et al.*, 2013). 2) La rotenona y otros pesticidas son potentes inhibidores de la respiración mitocondrial y asociados con una alta incidencia de parkinsonismo esporádico entre la población principalmente de zonas rurales (Ortiz *et al.*, 2011, Ma J. *et al.*, 2018). 3) Presenta alta liposolubilidad por lo que atraviesa fácilmente barreras biológicas sin depender de transportadores; aunque en ocasiones estos pueden favorecer dicho proceso (Rappolda *et al.*, 2011). La rotenona actúa por contacto e ingestión. Presenta una alta liposolubilidad por lo que se facilita su transporte a través de barreras biológicas y membranas celulares (Mulcahy *et al.*, 2011; Ma J. *et al.*, 2018). El primer uso de la rotenona como agente causal de parkinsonismo fue en el año de 1985 cuando Heikkila inyectó intracerebralmente este inhibidor del complejo mitocondrial I y demostró el daño neuronal dopaminérgico que ésta podía causar a una concentración aproximada de 5mM (Greenamyre, 2010). Sin embargo, resultados similares podrían haber sido obtenidos prácticamente por cualquier toxina mitocondrial. Este hecho abrió un nuevo campo de investigación ya que se relacionó con la EP con defectos mitocondriales sistémicos, por lo que diversos grupos de experimentación comenzaron a trabajar con la administración sistémica de toxinas mitocondriales. Posteriormente, en el año de 1997, Ferrante indicó que la administración de rotenona (10-18 mg/Kg/día) produjo lesiones cerebrales inespecíficas y toxicidad periférica (Greenamyre, 2010).

En contraste, Bertabet en el año 2000 valoró experimentalmente la inhibición del complejo I, a un nivel similar a la que se reportaba en pacientes con la EP (2-3 mg/Kg/día). Dicha dosis produjo degeneración nigroestriatal altamente selectiva y aún más sorprendente fue que las ratas tratadas con rotenona desarrollaron inclusiones citoplasmáticas α -sinucleína positivas, similares a los cuerpos de Lewy en neuronas dopaminérgicas de la Sustancia Nigra (SN) (Inden *et al.*, 2011; Greenamyre, 2010). Aunque en un inicio el uso de la rotenona en modelos experimentales se enfocó principalmente en probar la teoría de la relación entre la enfermedad y la disfunción mitocondrial; más tarde se utilizó en modelos *in vivo* para representar la patología y probar nuevos fármacos propuestos para tratar la EP. Esto como consecuencia del cuadro clínico tan similar al de esta enfermedad, que se presentaba posterior a la administración de dicho plaguicida en los sujetos de experimentación. Se ha reportado que la administración sistémica de rotenona puede

presentar además otras afecciones características de la EP; como la patología de la retina, pérdida de testosterona y algunos trastornos de sueño (Greenamyre, 2010).

Posterior a los estudios en ratas, el modelo se ha podido reproducir exitosamente en ratones, insectos y nemátodos como *Drosophila* y *C. elegans* (Greenamyre, 2010; Pan-Montojo *et al.*, 2010; Zhaohui L *et al.*, 2013). Existen otros mecanismos subyacentes que se han reportado para rotenona, como la despolimerización de los microtúbulos y la acumulación de especies reactivas de dopamina y especies reactivas de oxígeno (ROS) en cultivos de mesencéfalo (Xiong N *et al.*, 2013). (Figura 2). Además de la autofagia que se presenta como una importante respuesta celular ante el estrés oxidativo que se desencadena (Xiong N *et al.*, 2013). Entre los inconvenientes de rotenona como agente causal de parkinsonismo se encuentra su alta fotoreactividad por lo que tiende a degradarse al contacto con fotones pero su principal desventaja es la baja hidrosolubilidad que presenta, lo que dificulta la elección del vehículo apropiado así como de la adecuada vía de administración que ocasione el efecto deseado y un índice de mortalidad bajo en los especímenes tratados (Le W *et al.*, 2014). Actualmente existen variantes en este modelo de parkinsonismo. Se trabaja tanto en modelos *in vivo* como en modelos *in vitro*.

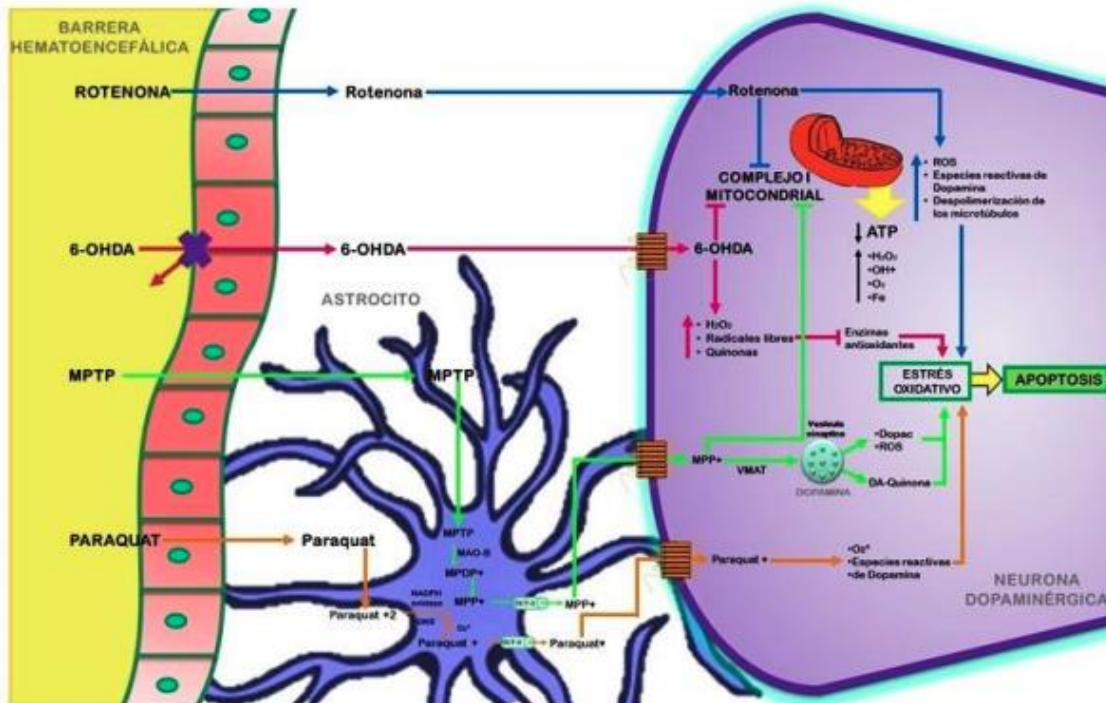


Figura 2. Mecanismo fisiopatológico de los principales agentes neurotóxicos empleados en modelos de parkinsonismo, entre ellos se encuentra la rotenona, 6-OHDA, el MPTP y el paraquat. A diferencia del MPTP, la rotenona o el paraquat, la 6-OHDA no atraviesa la barrera

hematoencefálica ni se acumula en el parénquima cerebral, por lo tanto debe inyectarse intracerebralmente directamente en el estriado (Simola *et al.*, 2007).

La vía de administración en modelos in vivo puede ser subcutánea, oral e incluso intracerebral con dosis que van desde 0.2 mg/kg hasta 100 mg/kg, aspecto que varía según la vía de administración o tipo de tratamiento, llámese crónico u agudo (Cabeza-Arvelaiz *et al.*, 2012). Este modelo se reproduce generalmente en ratas Sprague-Dawley, ratones de la cepa C57B1/6J y C57B1/6 o insectos del género *Drosophila* (Gómez-Chavarrín *et al.*, 2013; Nistico R *et al.*, 2011). Es importante mencionar que generalmente este insecticida se disuelve en compuestos polares con la ayuda de compuestos surfactantes como la carboximetilcelulosa (CMC), o el aceite de ricino debido a la alta lipofiliidad que presenta. La solubilización con dimetilsulfóxido (DMSO) puede minimizar el uso de surfactante o inclusive impedirlo, todo depende de la cantidad de pesticida que se desee solubilizar (Inden *et al.*, 2011; Xiong N *et al.*, 2013).

b) Paraquat

El paraquat (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) es un herbicida cuaternario de amonio no selectivo de amplio espectro que actúa por contacto, es altamente tóxico si es ingerido (Nistico R *et al.*, 2011; Colle *et al.*, 2018) y que atraviesa la barrera hematoencefálica. Su relación etiológica con la EP es relativamente nueva; ya que aunque desde los años 80's se tenían indicios sobre intoxicaciones agudas y muertes ocasionadas por paraquat, se desconocía su relación con esta enfermedad; hasta que se comparó la similitud estructural que compartía con MPP⁺ (Figura 3) y se dedujo que posiblemente compartían la misma farmacodinamia (Nistico R *et al.*, 2011).

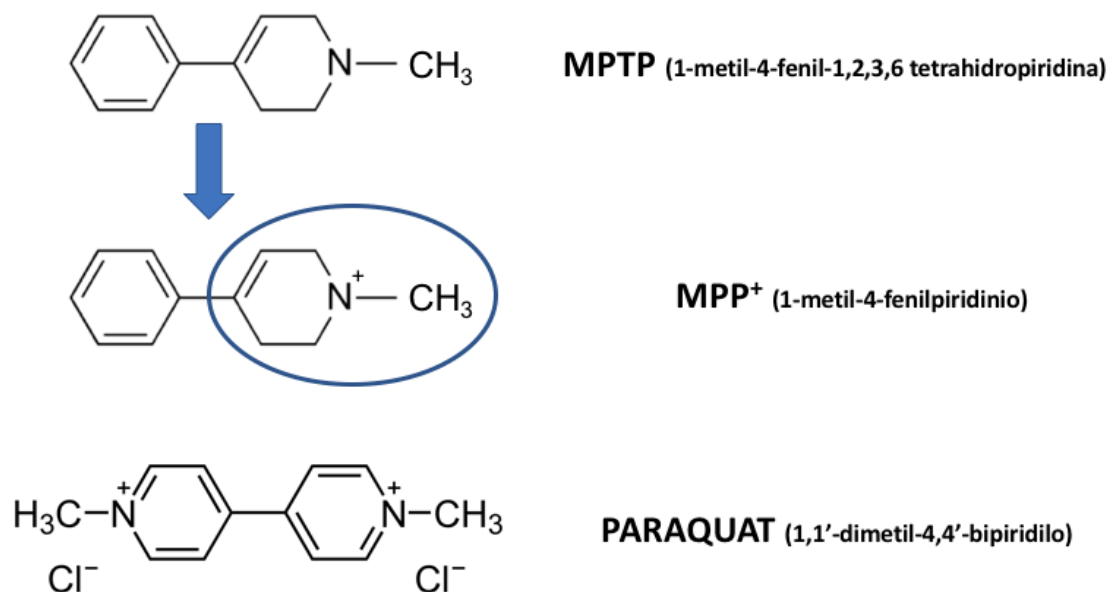


Figura 3. Comparación estructural del herbicida paraquat con MPP⁺, metabolito de la toxina MPTP. Una de las hipótesis propuestas para explicar la muerte neuronal inducida por MPTP sugiere que el daño neuronal se origina por la producción intraneuronal de radicales superóxido y otros radicales citotóxicos que se originan durante la oxidación intracelular del MPP⁺ (Braidy *et al.*, 2014). Esta hipótesis se realizó inicialmente sobre la base de la homología que existe entre el MPP⁺ y el paraquat.

La primera publicación que mencionó la posible relación de paraquat con la EP, fue realizada por Barbaeu en 1984, en un artículo de revisión por las estrategias de investigación del Parkinson; en él relacionaba la patogénesis del parkinsonismo con el manganeso, el MPTP y algunos pesticidas (Berry *et al.*, 2010). Estudios recientes han demostrado experimentalmente que el paraquat produce cambios subcelulares ligados a la EP, aumento en la producción de ROS, agregaciones de α -sinucleína o cuerpos de Lewy y lesiones neuroselectivas de la SN; lo que ocasiona el cuadro clínico característico de la EP (Rappolda *et al.*, 2011; Berry *et al.*, 2010). El paraquat tiene baja afinidad con el complejo I mitocondrial dentro de las mitocondrias, por lo que no inhibe el complejo I. Por lo tanto, la inhibición del complejo I no juega un papel crítico en la neurotoxicidad del paraquat. El paraquat secuestra la ruta de la pentosa fosfato para aumentar los equivalentes reductores de NADPH y estimula el ciclo redox del paraquat (Powers *et al.*, 2017). Como compuesto ciclo redox, el paraquat induce estrés oxidativo al afectar el reciclaje redox de glutatión y tioredoxina (Ren *et al.*, 2009; Niso-Santo *et al.*, 2010) que inhibe la función de los sistemas antioxidantes intracelulares. El paraquat es altamente selectivo para las neuronas dopaminérgicas de la SNc y conduce a una pérdida del 50%

después de múltiples inyecciones (Muthukumaran et al., 2014). El paraquat solo puede matar las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas en presencia de microglía (Peng et al., 2009). Una sola inyección de paraquat es suficiente para activar la microglía y predisponer a las neuronas dopaminérgicas a degenerar con las inyecciones posteriores. Las investigaciones y modelados con paraquat incluyen estudios *in vitro* con células de rata así como modelos *in vivo* con insectos del género *Drosophila*, ratones de la cepa C57B1/6 e inclusive estudios epidemiológicos relacionados a la salud ocupacional en humanos (Peng et al., 2007; Zhou et al., 2011; Inamdar et al., 2012). Las concentraciones manejadas en estudios *in vitro* van desde 30 μ M hasta 10mM para inducir Parkinson, en estudios *in vivo* se manejan dosis de 0.4 mg/Kg hasta 60 mg/Kg, esto varía según de la vía de administración que se maneje (se reportan por vía oral e intraperitoneal) (Peng et al., 2007). La DL50 en humanos es aproximadamente de 3-5 mg/Kg y de 290 a 360 mg/Kg en ratones (Zhou et al., 2011).

1.1.3.2 Modelos farmacológicos

Los modelos farmacológicos se caracterizan por alterar o modificar las vías metabólicas claves e importantes en el desarrollo y la homeostasis neuronal, esto permite el modelado de parkinsonismo en diversas especies de experimentación, principalmente roedores (Sosti, 2013).

a) α -Metil-*p*-tirosina

El α -Metil-*p*-tirosina es un inhibidor de la enzima tirosina hidroxilasa. Este fármaco no endógeno participa en la ruta de la biosíntesis de catecolaminas, cuya actividad enzimática es regulada a través de la fosforilación de residuos de diferentes sitios de serina. Esta droga es muy similar al efecto que ejerce la reserpina, debido a que la disminución en los niveles de dopamina es transitoria sin provocar neurodegeneración de las células dopaminérgicas de la vía nigroestriatal (Zeng et al., 2018).

Existen muchos trabajos experimentales en los que la α -metil-*p*-tirosina se utiliza en combinación con reserpina para potenciar el efecto de agotamiento de la dopamina (Matthews et al., 2013).

b) Anfetamina

El uso de metanfetamina se ha postulado como un factor de riesgo para el desarrollo de la EP y parkinsonismo (Lappin *et al.*, 2018). Las anfetaminas son ampliamente usadas como psicoestimulantes. Además de sus propiedades adictivas, los derivados de la anfetamina tales como *p*-cloroanfetamina (PCA), metanfetamina, 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) y fenfluramina también son altamente neurotóxicos. La anfetamina en su forma pura posee el aspecto de un polvo blanco, cristalino, inodoro, de sabor amargo y con características muy solubles. Además posee la peculiaridad de atravesar la barrera hematoencefálica (Matthews *et al.*, 2013). Entre los efectos de la metanfetamina se encuentra sobre todo un estado creciente de agotamiento psicológico, físico y cognitivo dado por el bloqueo constante de las señales somáticas como el sueño, el hambre, que advierten sobre el deterioro funcional progresivo. En estos casos, una vez que la droga desaparece totalmente del organismo, pueden presentarse además estados de gran agitación psicomotriz asociados con conductas violentas y delirios de persecución muy semejantes a los que aparecen en los cuadros de esquizofrenia paranoide (Price, Filoiger, 1974; Abeliovich *et al.*, 2000; Lappin *et al.*, 2018).

En el contexto de los modelos utilizados para inducir parkinsonismo, la metanfetamina se usa con más frecuencia que otros derivados de la anfetamina (Przedborski, Tieu, 2006; Frankl *et al.*, 2018). En este sentido, se evidenció que los pacientes con trastornos debido al uso de metanfetaminas poseían un 76% de probabilidades de desarrollar la EP, en comparación con aquellas personas que no usaban esta droga con frecuencia. Aunque en el estudio puntualizan que este riesgo solo ocurre en las personas que consumen sobredosis de metanfetaminas, no es así en los pacientes que la consumen con fines médicos como parte de un tratamiento debidamente estructurado (Przedborski, Tieu, 2006). Existen dos mecanismos propuestos para tratar de explicar los efectos de las metanfetaminas como modelo de inducción de parkinsonismo. Un mecanismo propuesto está relacionado con el aumento dramático en los niveles de dopamina en el citosol, lo que resulta un estrés oxidativo por el exceso de la producción de especies reactivas de este neurotransmisor (Guillot *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2002).

c) Reserpina

Trabajos realizados por Carlsson y *cols.*, a finales de la década de los cincuenta, demostraron que la administración sistémica de reserpina causaba una disminución en los niveles de catecolaminas, como dopamina y noradrenalina, al bloquear el almacenamiento vesicular (Carlsson, 1959; Carlsson *et al.*, 1957; Tieuk, 2011). Esto induce la aparición de síntomas heterogéneos, dentro de los cuales destacan los síntomas motores que son similares a los que presentan en la EP, como temblor, rigidez, acinesia y alteraciones posturales y de la marcha, así mismo, se observa un efecto sedante en animales poco tiempo después de la administración de reserpina, acompañado por signos de ptosis palpebral, hipocinesia, rigidez, catatonía e inmovilidad (Lins *et al.*, 2018). Estudios realizados por Heeringa y Abercrombie en 1995, demostraron que dos horas después de la administración de reserpina se observa una disminución en los niveles de dopamina del 85% en la SNpc y de los niveles estriatales de dopamina pueden alcanzar hasta un 95% de disminución (Heeringa, Abercrombie, 1995). También se ha demostrado que la reserpina provoca un aumento en los niveles de aminoácidos excitatorios en los ganglios basales (Kamari *et al.*, 2000). Robledo en 1991, demostró un aumento del 50% de los niveles extracelulares del glutamato después de la administración de reserpina en el núcleo subtalámico y en los ganglios basales (Robledo, Feger, 1991). Este modelo ha servido para evaluar la efectividad de distintos tratamientos y el efecto que produce la pérdida del aporte de dopamina en el cuerpo estriado. También se ha utilizado para investigar los efectos terapéuticos de la levodopa y otros agonistas dopaminérgicos, por lo que este modelo fundamenta el estudio de la patogenia de EP (Gossel *et al.*, 2012).

1.1.3.3 Modelos basados en el uso de toxinas

a) 6-hidroxidopamina

En 1968, Ungerstedt demostró que la inyección estereotáxica intracerebral de la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) producía degeneración de la vía nigroestriatal (Ungerstedt *et al.*, 1968). Dado que la 6-OHDA no atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE), es más selectiva para las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, ha sido el fármaco más utilizado para inducir la neurodegeneración del sistema nigroestriatal (Hernández-Batlazar *et al.*,

2017). Este modelo se basa en la inyección intracerebral de 6-OHDA para posteriormente inducir la disfunción mitocondrial de las neuronas dopaminérgicas (Ilkiw, *et al.*, 2018). La 6-OHDA es un análogo de la dopamina altamente oxidable que puede ser capturado a través del transportador de dopamina, lo cual da especificidad neurotóxica para afectar a las neuronas catecolaminérgicas, tales como las neuronas dopaminérgicas de la SNp (Blandini *et al.*, 2012).

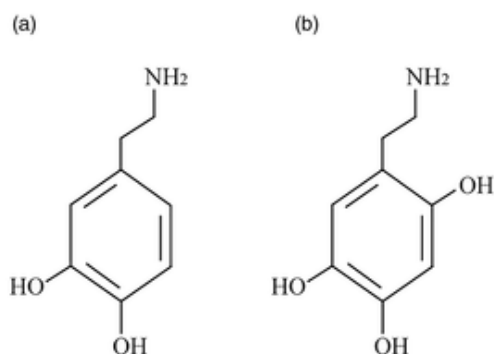


Figura 4. Estructura química de la dopamina (a) y 6-OHDA (b). La 6-OHDA es un agente neurotóxico sintético selectivo para dañar neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas. Se introduce a las neuronas mediante transportadores de recaptura (debido a la similitud con la dopamina).

La máxima reducción de las concentraciones de dopamina se produce entre el tercer y el cuarto día tras la inyección (Faull, Laverty, 1969; Sánchez-Iglesias *et al.*, 2007). Cuando se inyecta en el estriado, la 6-OHDA produce una degeneración retrógrada del sistema nigroestriatal más prolongada, que se mantiene entre una y tres semanas tras la lesión y las neuronas degeneradas presentan una morfología variada con características de apoptosis (Stanic *et al.*, 2003). Desde el punto de vista conductual, los animales con lesión unilateral de la SN, inducida por inyección directa de 6-OHDA en el haz nigroestriado o en la SN, más la administración sistémica de amfetamina o apomorfina, presentan un efecto rotatorio asimétrico; esta rotación puede ser ipsilateral, cuando se administran sustancias que incrementan la liberación de dopamina (amfetamina) o contralateral cuando se administran agonistas dopaminérgicos (apomorfina). Esta conducta rotatoria es debida al desequilibrio que existe entre el contenido de dopamina en el estriado homolateral y contralateral a la lesión dopaminérgica (Alarcón-Aguilar *et al.*, 2010). La lesión unilateral de la SN también induce cambios neuroquímicos y electrofisiológicos en el sistema nigroestriado que intentan compensar el déficit de

dopamina inducido por la pérdida de neuronas dopaminérgicas. Se ha descrito una inducción y activación de tirosina hidroxilasa (enzima limitante de la síntesis de catecolaminas) en las neuronas dopaminérgicas todavía funcionales, aumento de la cantidad de dopamina liberada en el estriado por las terminales dopaminérgicas existentes y un aumento en el número de receptores dopaminérgicos estriatales postsinápticos (*up regulation*). Este aumento aparece únicamente cuando la pérdida de neuronas dopaminérgicas es superior al 90% y tiene lugar al cabo de 4 semanas de haberse producido la denervación dopaminérgica. La tirosina hidroxilasa (TH) es la enzima limitante de la síntesis de dopamina, por lo cual es uno de los marcadores de fenotipo dopaminérgico (Kirik et al., 1998). La noción sobre que la inyección de 6-OHDA causa muerte de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc está basada en la disminución en el número de neuronas TH (Stanic et al., 2003).

En general, la mayoría de los trabajos publicados demuestran que el fenómeno de hipersensibilidad por denervación o "*up regulation*" afecta preferentemente a los receptores dopaminérgicos estriatales D₂. Sin embargo, aunque algunos cambios neuroquímicos son ya evidentes con lesiones dopaminérgicas parciales la actividad de las neuronas dopaminérgicas de la SN únicamente incrementa cuando la depleción de DA estriatal es superior al 96%. En estos casos la frecuencia de descarga de las neuronas dopaminérgicas de la SN se incrementan, pero no es suficiente para compensar el déficit de DA (Price y Fibiger, 2014). Por lo tanto, se puede concluir que el modelo de 6-OHDA reproduce varios de los procesos celulares identificados en la EP, ya que es un modelo clave para explorar las bases moleculares de la citotoxicidad, así como para el estudio de los procesos celulares activados por estrés oxidativo (neuroinflamación y muerte neuronal) y para entender los mecanismos de terapias para la EP (Hernández-Baltazar et al., 2017).

b) MPTP

Para generar modelos de ratón subcrónicos o crónicos parecidos a la EP, se ha usado ampliamente la administración intraperitoneal de la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Petroske et al., 2001; Zhu et al., 2011; Paul et al., 2017). MPTP induce la neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas, lo que resulta en alteraciones motoras que son similares a la de los pacientes con EP (Santos et al., 2017;

Chen *et al.*, 2018). El descubrimiento del MPTP se produjo en 1982 en California, cuando se observó que el MPTP inducía un parkinsonismo de forma aguda, acompañada de alucinaciones, somnolencia y espasmos en las extremidades en cuatro heroinómanos inyectados por vía intravenosa con un análogo sintético de la heroína, la 1-metil-4-fenilpropionoxipiperidina (MPPP), contaminado con un subproducto, el MPTP (Davis *et al.*, 1979; Langston *et al.*, 1983). Tras la administración crónica presentaban alteraciones motoras como temblor de reposo en extremidades, rigidez, lentitud en los movimientos y micrografía (Langston *et al.*, 1984; Schmidt y Ferger, 2001).

El MPTP es una molécula lipofílica con gran capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Una vez en el cerebro es captada por las células gliales y por acción de la enzima monoamino oxidasa B (MAO-B) (Kim *et al.*, 2005) se transforma en el metabolito activo 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺), el cual es captado por las células dopaminérgicas a través del TAD (Cohen, 2000) porque también es un análogo estructural de la dopamina (Figura 5). Por lo tanto, la inhibición de MAO-B puede bloquear la neurotoxicidad inducida por MPTP (Adeyemo *et al.*, 1993; Chan *et al.*, 2018). Una vez en el citoplasma de las células dopaminérgicas puede almacenarse en las vesículas mediante la acción del transportador vesicular de monoaminas (VMAT), o en las mitocondrias donde inhibe el complejo I de la cadena mitocondrial transportadora de electrones, lo que provoca una disminución en la producción de ATP y un aumento en la producción de radicales libres que, secundariamente, produce la muerte de las células dopaminérgicas de la SN a través de mecanismo inflamatorios como respuesta al estrés oxidativo que se genera (Ramsay *et al.*, 1987; Guo *et al.*, 2017). El MPTP se ha utilizado para inducir una degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la SN, por lo que se utiliza para modelar la EP en una variedad de especies, incluyendo perros, ratones, y primates (Burns *et al.*, 1983; Burns *et al.*, 1985; Johannessen *et al.*, 1989; Zeng *et al.*, 2014) por denervación de la vía nigroestriatal, por lo que la administración de MPTP se considera como un modelo clásico de la EP. Sin embargo, una limitación inicial de este modelo es que al principio no se observan los característicos cuerpos de Lewy, que son inclusiones de proteínas características de la enfermedad, aunque recientemente se ha visto que la infusión continua de dosis más bajas de MPTP durante un largo periodo de tiempo sí logra reproducir las marcas histopatológicas de la EP (Alarcón-Aguilar *et al.*, 2010).

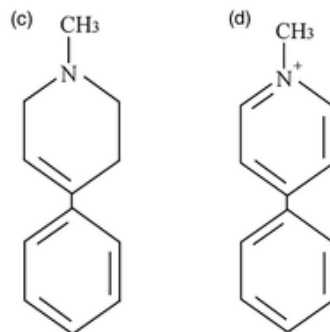


Figura 5. Estructura química del MPTP (c) y MPP⁺ (d). El MPTP y MPP⁺ producen una gran variedad de cambios neuroquímicos debido a su acción neurotóxica, que se caracteriza por una reducción en la concentración de dopamina y de sus metabolitos, como el ácido homovanílico.

c) 1-Metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺).

1-Metil-4-enilpiridinio (MPP⁺) es el metabolito activo del MPTP que causa el parkinsonismo, causando muerte celular específica en neuronas dopaminérgicas y es el causante de los efectos neurotóxicos de la EP (Raju *et al.*, 2018), por lo que es utilizado en el modelo de rata, administrándolo vía intracerebral en la región del cuerpo estriado (Joers y Emborg, 2014). Una vez administrado en esta región, el ión es selectivamente transportado por el sistema de captación de alta afinidad de dopamina. Ya dentro de la neurona se acumula en la mitocondria donde alcanza niveles milimolares, alterando la fosforilación oxidativa por una inhibición selectiva de la NADH CoQ reductasa del complejo I, lo que propicia una disminución de la concentración de ATP. Otros estudios neuroquímicos han propuesto que también este metabolito inhibe la actividad del citocromo oxidasa del complejo IV mitocondrial potenciando la generación de radicales libres (Natale *et al.*, 2010), propiciando así la toxicidad mitocondrial que dará lugar a la muerte neuronal por la activación de mecanismos como peroxidación lipídica y excitotoxicidad por una sobreactivación de receptores voltaje dependientes NMDA (Ikonomidoun y Turski, 1996; Jun-Fan *et al.*, 2018). La desregulación de dichos receptores permite la entrada excesiva de Ca²⁺ al interior de las células, lo que activa a la óxido nítrico sintasa (NOS), que consecuentemente aumenta la concentración de óxido nítrico (NO). Este segundo mensajero reacciona con el radical anión superóxido generando peroxinitritos que promueven la peroxidación de lípidos (Rubio *et al.*, 2009), así como la nitración de la TH. Cabe mencionar que el daño oxidativo a los lípidos poliinsaturados de la membrana es uno de los tipos más importantes de daño celular inducido por radicales

libres. El resultado final de la peroxidación lipídica es una alteración en la composición lipídica de la membrana celular que alteran la permeabilidad celular, como el aumento de rigidez de la membrana, que puede conducir a la muerte celular (Gutteridge *et al.*, 1999). La degeneración de las neuronas dopaminérgicas también se acompaña de la denegeración de las proyecciones dopaminérgicas de las SN y del área tegmental ventral en el cuerpo estriado (Bellucci *et al.*, 2017; Kalia, 2018).

1.1.3.4 Modelos genéticos de inducción de Parkinson

Al igual que otros trastornos neurodegenerativos, la etiología de la EP puede estar relacionada con varios factores, incluida la susceptibilidad genética. Los modelos de inducción de Parkinson que afectan el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas se caracterizan por la pérdida gradual de estas. (Hwang *et al.*, 2005; Meredith *et al.*, 2008). Existen tres tipos de modelos genéticos para la inducción de Parkinson. El primero se basa en la delección de los genes que se encargan del desarrollo y mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas. El otro tipo, resulta de inducir o silenciar la expresión de genes relacionados con las formas familiares de la EP. El último tipo resulta de la sobreexpresión de proteínas mutadas principalmente en la SN (Zarranz *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2002; Taira *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2014;).

Dentro de los modelos genéticos relacionados con genes implicados en la EP de tipo familiar se encuentran la parkina, la α -sinucleína, y DJ-1, en las que se han descrito múltiples polimorfismos que contribuyen a la aparición de síntomas característicos de la EP (Haubenberger, 2001).

a) Parkina

La parkina, es una ubiquitina E3 ligasa, que marca sus sustratos para su degradación proteosomal además de desempeñar un papel neuroprotector en la limpieza de las mitocondrias disfuncionales a través de la mitofagia y proteger a las neuronas de la toxicidad de α -sinucleína y de la excitotoxicidad inducida por quinasas (Hwang *et al.*, 2017). Las primeras mutaciones de este gen se describieron en familias japonesas con un parkinsonismo autosómico recesivo. Estudios posteriores demostraron que la mutación de este gen es la causa más frecuente de parkinsonismo de inicio temprano. La mayoría de

las mutaciones provocan una pérdida funcional de la enzima ligasa, esto afecta la ubiquitinación y degradación de las proteínas. La pérdida de función de parkina produce una disfunción mitocondrial, que es un proceso patogénico central en la EP. Se ha demostrado que una variedad de modificaciones postraduccionales de parkina afectan su activación de ubiquitina E3 ligasa, incluida la fosforilación, la ubiquitilación y la S-nitrosilación (Ko *et al.*, 2010; Ozawa *et al.*, 2013).

Se ha reportado que en ratones deficientes de parkina presentan una densidad neuronal dopaminérgica normal tanto al nacimiento como en la etapa adulta. Sin embargo, estos ratones no presentan sistemáticamente déficits en su función neurológica, emocional, de aprendizaje o de memoria que puedan asemejarse al parkinsonismo. Además presentan un aumento en la concentración de dopamina en el estriado y se ha demostrado en estos ratones, una disfunción mitocondrial y una mayor sensibilidad al estrés oxidativo, por lo que este modelo ha servido para entender la interacción entre parkina, estrés oxidativo y la función mitocondrial (Hwang *et al.*, 2014). No se han encontrado alteraciones motoras (más allá de las que corresponden a la variabilidad individual) y, en el terreno neuroquímico, no hay depleción dopaminérgica, ni pérdida neuronal en la SNpc. Por tanto, los ratones deficientes en parkina solo serían un modelo útil para preguntas muy concretas (Zhu *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 2014).

La función de parkina puede estar regulada por múltiples factores. Esto garantiza un estudio adicional para comprender mejor los mecanismos moleculares subyacentes de la mitofagia, la relación entre la maquinaria de eliminación mitocondrial y la patogénesis de la EP (Chen *et al.*, 2018).

b) α -sinucleína

La agregación de α -sinucleína y la disfunción mitocondrial son las principales causas que contribuyen a la degeneración neuronal progresiva de la EP (Bose y Beal, 2016). La α -sinucleína es una proteína de 140 aminoácidos presente principalmente en las terminales presinápticas que se expresa en diferentes regiones cerebrales (neocorteza, hipocampo, sustancia negra, tálamo y cerebelo) (Chen *et al.*, 2018). Las mutaciones en α -sinucleína, incluido el mutante A53T, dan como resultado una forma autosómica dominante de la EP familiar. La toxicidad de la acumulación de α -sinucleína afecta la función de los orgánulos

celulares, incluyendo vesículas sinápticas, mitocondrias, ER, lisosomas y autofagosomas (Wong y Krainc, 2017). Tres mutaciones puntuales relacionadas con la EP (A30P, A53T y E46K) se han identificado hasta el momento. La duplicación o triplicación del gen pueden causar la EP, así, lo que sugiere que el nivel de expresión de la proteína es también un factor causal de la enfermedad (Zarranz *et al.*, 2004).

Aunque es una proteína fundamentalmente neuronal, también se encuentra en células gliales. En condiciones patológicas se agrega y forma fibrillas insolubles que se integran en los cuerpos de Lewy, cuya presencia se asocia a la neurodegeneración de las células dopaminérgicas lo que constituye un marcador biológico de la EP. Los cuerpos de Lewy consisten en inclusiones redondeadas eosinófilas que contienen un centro de α -sinucleína agregada, junto a otras proteínas y un área de fibras radiadas. El patrón de distribución de estas estructuras se correlaciona con la severidad de la neurodegeneración. Sin embargo, no todas las formas de EP contienen cuerpos de Lewy (Spillantini *et al.*, 1997).

Se han creado diferentes líneas de ratones knock-out para α -sinucleína que han conducido a una variedad de anomalías en el cerebro y la médula espinal, inclusive anomalías mitocondriales, gliosis, pérdida de neuronas motoras, la formación de agregados de α -sinucleína y algunas anomalías funcionales en el sistema nigroestriatal, pero no ha habido ningún informe consistente de la pérdida de neuronas dopaminérgicas de SNpc (Marques y Outeiro, 2012). Por otro lado, el uso de promotor para Thy-1, que impulsa la expresión de tipo salvaje de α -sinucleína en las neuronas corticales y subcorticales, así como en SNpc, conduce a la inclusión de α -sinucleína en el bulbo olfatorio, SNpc y locus coeruleus. También se detectó una disminución dependiente del tiempo en los niveles estriatales de DA, observándose también una reducción en la expresión de TH en el cuerpo estriado junto con aumento de la susceptibilidad a la toxicidad del MPTP, en este punto se han obtenido numerosas líneas transgénicas murinas que sobreexpresan la variante mutante humana de la α -sinucleína (mutación A30P) presentan una alta vulnerabilidad dopaminérgica a la intoxicación con MPTP (Nieto *et al.*, 2006). Sin embargo, la sobreexpresión de la variante A53T no incrementa la sensibilidad de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc al MPTP (Dong *et al.*, 2002). Los efectos deletéreos de la sobreexpresión de α -sinucleína mutante parecen depender de la

ganancia funcional de la proteína; mientras que la pérdida de α -sinucleína parece tener efectos mínimos sobre el desarrollo.

Basta con que exista una sobreexpresión de α -sinucleína normal para que se produzca la EP (Singleton *et al.*, 2003). El metabolismo aberrante de la α -sinucleína silvestre podría ser la causa de la pérdida de las células dopaminérgicas en los pacientes que tienen la forma no-familiar de la EP (Singleton *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2018). Estudios en modelos experimentales y en el tejido cerebral de pacientes con EP sugieren que la polimerización anormal de la α -sinucleína o formación de filamentos y posteriormente agregados, pueden alterar la función de las neuronas, los astrocitos y los oligodendrocitos. Además, estas inclusiones, especialmente si son de gran tamaño, potencialmente pueden alterar en forma directa el tráfico intracelular u otras funciones, lo que favorece la muerte celular por otros tipos de estrés (Giasson, Lee VM., 2003). En modelos experimentales de EP, la sobre expresión de α -sinucleína puede matar en forma selectiva a neuronas dopaminérgicas. Estudios posteriores en los que se maneja una transfección viral de α -sinucleína o de algunas de sus variantes mutantes han mostrado que las neuronas dopaminérgicas son considerablemente más vulnerables que las neuronas no dopaminérgicas en la SN (Tijero *et al.*, 2013).

La selectividad de la toxicidad para las neuronas dopaminérgicas ha recibido diversas explicaciones. Varios grupos plantean que los oligómeros y protofibrillas de α -sinucleína son un componente importante de la toxicidad de la EP. Se ha mostrado que la forma protofibrilar de la α -sinucleína podría permeabilizar las vesículas membranosas de manera transitoria, lo que altera la homeostasis intracelular (por ejemplo, del Calcio), lo que predispone a las células a sufrir apoptosis (Volles *et al.*, 2003). Además se ha visto que la toxicidad de α -sinucleína aumenta por la generación de radicales de oxígeno en presencia de dopamina (Xu J *et al.*, 2002), y que la dopamina, *in vitro*, puede formar aductos con α -sinucleína (Conway *et al.*, 2001). La inhibición farmacológica de la producción de dopamina (inhibidor de tirosina hidroxilasa), es capaz de eliminar la apoptosis inducida por α -sinucleína (Xu J *et al.*, 2002).

c) DJ-1

El estrés oxidativo es el factor de riesgo más crítico para las enfermedades neurodegenerativas como la EP, la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Huntington (EH) (Jihoon *et al.*, 2018). DJ-1 es conocido como un gen causante de la EP, y su función está asociada con el estrés oxidativo en la enfermedad (Lev *et al.*, 2007). Es una proteína ubicua, descrita inicialmente como un oncogén, localizada en el citoplasma, que se asocia con la mitocondria y el núcleo tras la oxidación. Se han descrito que las mutaciones puntuales (L166P, D149A) en este gen causan una rara EP autosómica recesiva de inicio temprano (Kim RH *et al.*, 2005). La sobreexpresión DJ-1 se asocia con un aumento de la protección contra la neurodegeneración inducida por toxinas. Estudios *in vitro* como *in vivo*, indican que la toxicidad conduce a la expresión mejorada de DJ-1, probablemente como un mecanismo de defensa para contrarrestar el aumento del estrés oxidativo (Taira *et al.*, 2004). En estudios realizados con ratones knock-out para DJ-1 no muestran anomalías neuronales ni anatómicas, pero son más sensibles a la intoxicación con MPTP, con mayor pérdida neuronal en la SNpc y mayor denervación dopaminérgica en el estriado. (Taira *et al.*, 2004).

1.2 DOPAMINA

La dopamina (DA) es un neuroregulador, neurotransmisor y también una neurohormona que desempeñan un papel importante en la regulación de no sólo las funciones motoras, sino también funciones no motoras, tales como la motivación, la cognición, la emoción y la secreción neuroendocrina (Carlsson, 2001). La DA es la catecolamina más básica, y la adrenalina junto con la noradrenalina se fabrican a partir de ella.

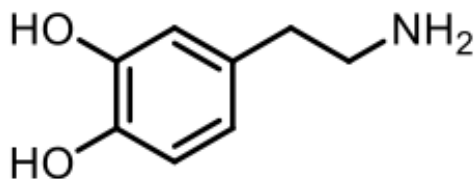


Fig. 6. Estructura química de la dopamina..

Cuando se encuentra en el cerebro, la dopamina cumple un rol de neurotransmisor; esto significa que participa en el envío de señales electroquímicas entre neuronas. Las vías cerebrales en las que está implicada la DA, principalmente la nigroestriatal y la mesolímbica, se relacionan con la conducta motivada por el esfuerzo: sus niveles aumentan cuando obtenemos recompensas. De este modo la DA es importante para procesos como el aprendizaje, el control motor (movimientos voluntarios y finos, coordinación de movimientos musculares) y las adicciones a sustancias psicoactivas. Otras de sus funciones también son la regulación de la memoria, los procesos cognitivos asociados al aprendizaje, incluso se ha visto que tiene un papel importante en la toma de decisiones. La degeneración preferencial de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc es responsable del deterioro motor asociado con la EP. La DA es una molécula altamente reactiva, que generalmente se almacena dentro de las vesículas sinápticas. Sin embargo la DA citosólica libre puede auto oxidarse, generando especies de oxígeno reactivas y conduciendo a la formación de quinonas tóxicas (Biosa *et al.*, 2018). La DA funciona al actuar sobre los receptores dopaminérgicos, que están clasificados como receptores tipo D1 (D1 y D5) y receptores D2 (D2, D3 y D4) (Kebabian y Calne, 1979; Akanksha *et al.*, 2018).

La distribución de las neuronas dopaminérgicas en el sistema nervioso central se halla limitada a básicamente cuatro vías neuronales dopaminérgicas (Akanksha *et al.*, 2018):

- a) Vía Mesolímbica
- b) Vía Mesocortical
- c) Vía Nigroestriatal
- d) Vía Tuberoinfundibular

1.3 VÍAS DOPAMINÉRGICAS

1.3.1 Vía mesolímbica

Esta vía está constituida por proyecciones del área tegmental ventral hacia el núcleo accumbens. Este sistema juega un rol clave en la motivación, emociones, recompensa y síntomas positivos de la esquizofrenia. Los antagonistas D2 reducen los síntomas positivos de la esquizofrenia.

1.3.2 Vía mesocortical

Esta vía está compuesta por neuronas dopaminérgicas que se proyectan del área tegmental ventral a la corteza prefrontal (CPF). La CPF está implicada en la fisiología de la cognición y función ejecutiva y las emociones y afectividad.

1.3.3 Vía nigroestriada

La vía nigroestriatal es una vía principal dopaminérgica que conecta la SN con el núcleo caudado y putamen del cuerpo estriado dorsal. Los cerebros afectados por la EP presentan degeneración de neuronas dopaminérgicas en la región de la SNpc así como una pérdida de DA en el cuerpo estriado dorsal. Los tratamientos disponibles para la EP solo proporcionan alivio sintomático y no ralentizan o detienen el proceso neurodegenerativo, por lo que no son curativos ni preventivos (Bargiotas y Konitsiotis, 2014).

1.3.4 Vía tuberoinfundibular

Los cuerpos celulares que contienen dopamina en los núcleos arcuato y periventricular del hipotálamo, envían axones que inervan el lóbulo intermedio de la pituitaria y la eminencia media. Estas neuronas desempeñan un importante papel en la regulación de la liberación de las hormonas pituitarias, especialmente la prolactina. (Alarcón-Aguilar *et al.*, 2010).

1.4 SÍNTESIS DE LA DOPAMINA

La síntesis de la DA tiene lugar en las terminales nerviosas dopaminérgicas donde se encuentran en alta concentración las enzimas responsables, la tirosina hidroxilasa (TH) y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos o L-DOPA descarboxilasa (Cooper *et al.*, 1997). Los trabajos de Nagatsu (1964) y Levitt (1965) demostraron que la hidroxilación del aminoácido L-tirosina es el punto de regulación de la síntesis de catecolaminas en el SNC y que en consecuencia la TH es la enzima limitante de la síntesis de la DA, la noradrenalina y la adrenalina. La TH es un péptido de 498 aminoácidos presente de manera predominante en la fracción citosólica de las terminales catecolaminérgicas (Garrido *et al.*, 2017). La enzima es una oxidasa que utiliza L-tirosina y oxígeno como sustratos y tetrahidrobiopterina (BH4) como cofactor para adicionar un grupo hidroxilo al aminoácido para formar L-DOPA (L-3,4-dihidroxiifenilalanina) como se esquematiza en la figura 7.

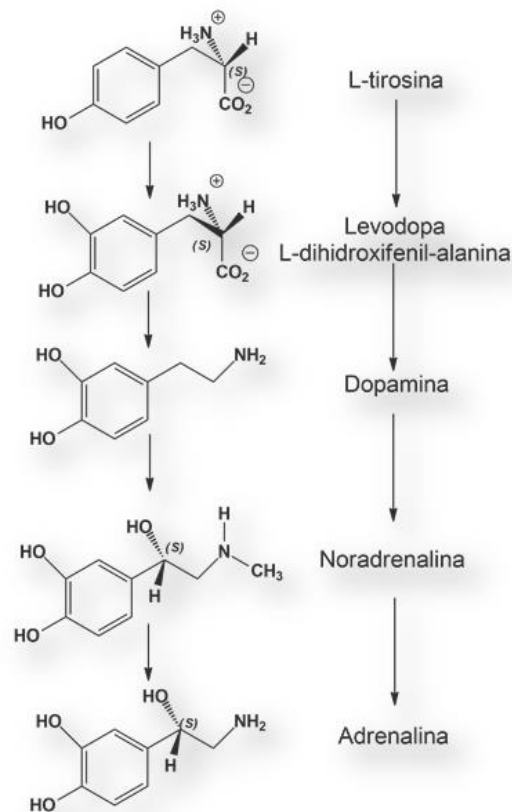


Fig. 7. Síntesis de la adrenalina. A partir de la tirosina hidroxilasa por hidroxilación de la L-tirosina forma levodopa para después formar a la dopamina.

1.5 CATABOLISMO DE LA DOPAMINA

La DA recapturada es convertida por la MAO, en particular por la MAO-A, presente en el interior de la terminal nerviosa, en ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) el cual es liberado al exterior de la terminal para ser convertido en ácido homovanílico (HVA) por la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT). La DA no capturada por la terminal dopaminérgica es metabolizada en HVA por la acción secuencial de las enzimas COMT y MAO-A (Feldman et al., 1997). En el cerebro de la rata el principal metabolito de la DA es el DOPAC, en tanto que en el cerebro puede utilizarse como indicador de la actividad dopaminérgica en la rata, mientras que la determinación de HVA en tejidos cerebrales y en líquido cefalorraquídeo se utiliza también como índice de la actividad de las neuronas dopaminérgicas. La actividad funcional de las vías dopaminérgicas puede también estimarse de manera más precisa determinando la relación de concentraciones o contenido del HVA y de la propia DA (Bahena-Trujillo, 2010).

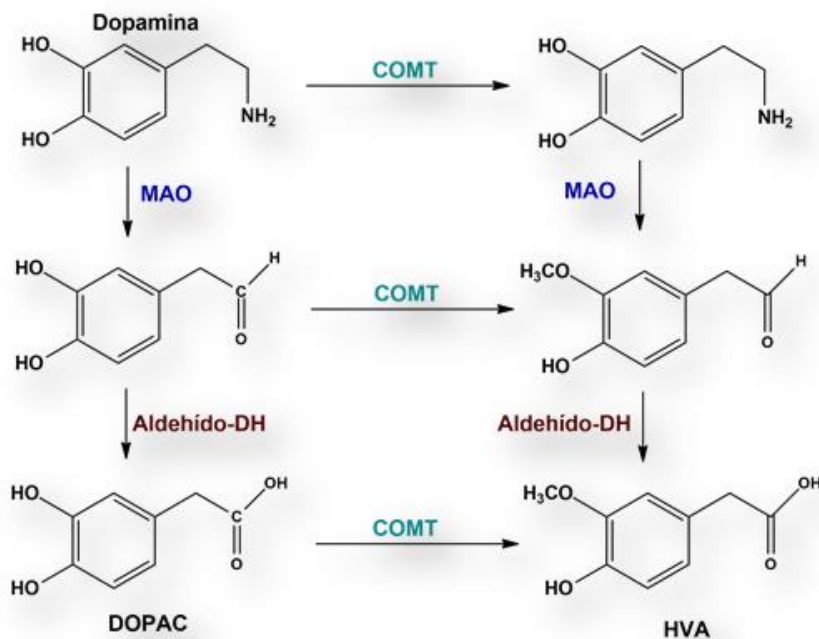


Fig. 8. Catabolismo de la dopamina. COMT: Catecol-O-metiltransferasa; MAO: Monoamino oxidasa; Aldehído-DH: Aldehído deshidrogenasa; DOPAC: Ácido 3,4-dihidroxifenilacético; HVA: Ácido homovainílico.

La EP afecta a las regiones del cerebro que producen DA. La pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNpc en pacientes con EP causa déficits en la iniciación del movimiento y la lentitud de éste (Alves da Silva *et al.*, 2018).

1.6 HIDROXITIRO SOL

El hidroxitirosol es el principal compuesto fenólico antioxidante presente en las aceitunas y el aceite de oliva virgen, muestra efectos beneficiosos sobre las enfermedades crónicas, inflamatorias y neurodegenerativas (Priore *et al.*, 2015). Es un *o*-difenol con una importante actividad biológica del cual se ha demostrado su presencia como metabolito de otro compuesto fenólico en plantas como *Buddleja cordata* (Pérez-Barrón, 2014).

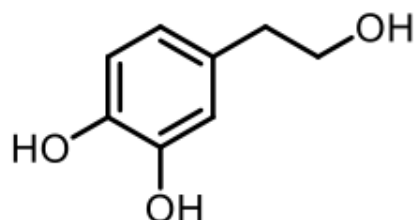


Fig. 9. Estructura química del hidroxitirosol. El hidroxitirosol está formado por un grupo catecol y unido a un grupo hidroxilo.

Este compuesto es responsable junto con otros compuestos fenólicos del sabor amargo característico del aceite de oliva así como de su elevada estabilidad debido a su estructura, que contiene un fragmento de tipo catecol, por lo tanto, el HT es un potente antioxidante, ya que puede actuar como atrapador de radicales libres. Esta actividad se debe a la presencia del grupo *o*-dihidroxifenilo, que actúa interrumpiendo la etapa de propagación de los radicales alquilperoxilo formados durante la oxidación primaria lipídica, mediante la donación de dos radicales hidrógeno para dar lugar a un derivado quinonoide (Figura 8).

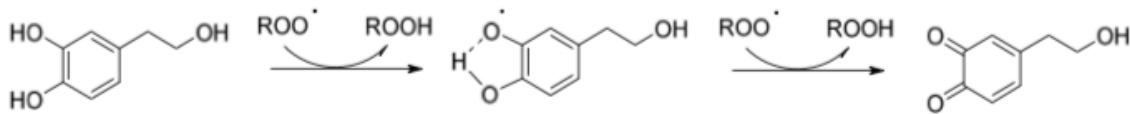


Figura 10. El hidroxitirosol es un potente antioxidante, ya que puede actuar como atrapador de radicales libres.

Geerling y colaboradores han registrado el uso de formulaciones a base de derivados fenólicos, principalmente el HT, para el tratamiento o la prevención de enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la EP, entre otras. El HT es rápidamente absorbido en animales y humanos (De la Torre, 2007; Pinto, 2011), y se ha evidenciado que tiene una alta penetrabilidad en el cerebro (D'Angel, 2011; Geelings, 2003; Gallardo, 2014).

Se ha demostrado que el hidroxitirosol puede proteger a las células del sistema nervioso central de morir tras la exposición a inductores de estrés oxidativo, además, estudios señalan que el HT presenta una variada gama de actividades biológicas como: actividad anticancerígena, cardioprotectora, antimicrobiana y antifúngica, antiinflamatoria, antiviral, antihipertensiva, hipoglucémica y antiagregante plaquetario (Visioli, 2002; Tuck y Hayball; 2002; Bianco y Ramunno, 2006; Covas, 2006; Bendini, 2007), aparte de inhibir la proliferación y promover la apoptosis en numerosas líneas celulares tumorales humanas (Fabiani, 2009). Geerlings y colaboradores han registrado el uso de formulaciones a base de derivados fenólicos, principalmente el hidroxitirosol, para el tratamiento o la prevención de enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la demencia de cuerpos de Lewy, la EP, la enfermedad de Pick, esclerosis lateral amiotrófica, neurofibromatosis, lesiones cerebrales, pérdida de memoria o demencia por infarto múltiple (Geerlings *et al.*, 2006).

1.7 DEPRESIÓN

1.7.1 Definición

La depresión un trastorno emocional que se caracteriza básicamente por alteraciones del humor, tristeza, disminución de la autoestima, inhibición, fatiga, insomnio, pensamientos negativos y que tiene como consecuencia la disminución de la actividad vital, es decir, le impide a quien la padece, desarrollar con normalidad las actividades de la vida diaria

(López, 2007), caracterizada por la alteración en las concentraciones de aminas biógenas, con manifestaciones afectivas, conductuales, cognitivas, vegetativas y motoras con serias repercusiones sobre la calidad de vida y el desempleo socialocupacional del individuo. Depresión viene del latín *depressio* que significa hundimiento; el paciente se siente hundido, con un peso sobre su existencia y devenir vital que le impide cada vez más vivir con plenitud (Alarcón *et al.*, 2005).

1.7.2 Descripción clínica

La depresión del estado de ánimo varía escasamente de un día para otro y no suele responder a cambios ambientales, aunque puede presentar variaciones circadianas características. La presentación clínica puede ser distinta en cada episodio y en cada individuo. En algunos casos, la ansiedad, el malestar y la agitación psicomotriz pueden predominar sobre la depresión. (López, 2007). El Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales de la Asociación de Psiquiatría de EUA (DMS-IV TR), considera que un paciente padece depresión si presenta un estado de ánimo tal, que le imposibilita disfrutar actividades de una manera placentera durante semanas, agregándose por lo menos cuatro de los síntomas que se mencionan a continuación y que representan un cambio del estado de ánimo (DSM-IV TR, 2004):

- a) Humor deprimido, la mayor parte del día y casi todos los días.**
- b) Pérdida del placer o interés por las tareas habituales.**
- c) Pérdida o aumento de apetito.**
- d) Insomnio o hipersomnia.**
- e) Pérdida de energía o fatiga.**
- f) Agitación o enlentecimiento psicomotor.**
- g) Sentimientos de inutilidad, autoreproche o culpa excesivas.**
- h) Disminución de la capacidad de pensar o de concentración.**
- i) Ideas recurrentes de muerte o suicidio.**

La alteración del estado de ánimo puede estar enmascarada por otros síntomas, tales como la irritabilidad, consumo excesivo de alcohol, comportamiento histriónico, exacerbación de fobias o síntomas obsesivos preexistentes o por preocupaciones hipocondriacas. Es importante conocer que los pacientes deprimidos se tornan más

vulnerables a las enfermedades, al dolor y decrece su desempeño físico, individual y social.

Clásicamente se ha definido la depresión como un trastorno del ánimo. La palabra ánimo proviene del griego *άνεμος* (*ánemos*=viento) y hace referencia al estado energético de una persona. Una persona sin ánimo siente que carece de iniciativas, se siente en ruinas, sin energía, sin emprendimiento, todo es un pesar y todo cuesta mucho más. Estas características son las que presenta una persona con depresión. Lamentablemente cada vez es más común, aparece a edades más tempranas y está afectando a un gran número de individuos. Puede destruir, a la persona que la padece, no solo la relación con sus seres queridos sino también el poder sentirse bien con uno mismo. Actualmente, las estadísticas sobre depresión son alarmantes: hay alrededor de 121 millones de personas que padecen desórdenes depresivos graves en el mundo. Un aspecto importante en el diagnóstico de la depresión es la relación de los síntomas depresivos, las enfermedades médicas y el uso de fármacos. Las relaciones entre ellos son variadas. Es posible que la enfermedad cause depresión, que la propicie en alguien susceptible o que la depresión sea secundaria a los problemas generados por la enfermedad o que ambas coexistan por azar.

Con el objetivo de estudiar y comprender las bases neurobiológicas de la depresión, se han desarrollado numerosos modelos animales. Estos modelos han sido de gran utilidad, pero se debe tener en cuenta que su principal desventaja es la imposibilidad de reproducir exactamente la sintomatología que presentan clínicamente las personas deprimidas. Estas características subjetivas, en muchos casos, no pueden ni podrán ser evaluadas en animales de experimentación, lo cual mantendrá siempre una gran distancia entre la información que nos brindan los modelos y la realidad subjetiva propia de la enfermedad. Sin embargo, desde el punto de vista del entendimiento de las bases fisiopatológicas de la enfermedad depresiva, la utilización de modelos sigue siendo de la mayor utilidad, sobre todo por la imposibilidad de emplear técnicas invasivas sobre el sistema nervioso central de los seres humanos. Por ejemplo, ciertos procesos, como los neurogenerativos, su contrapartida regenerativa y las bases moleculares, solo podrán ser estudiados por el momento a través de modelos animales. También, los modelos animales resultan de utilidad a la hora de estudiar cierto tipo de síntomas de la depresión, que pueden ser medidos objetivamente, como las alteraciones psicomotoras estudiadas

desde el comportamiento, la anhedonia (disminución del apetito sexual o consumo de sacarosa), las alteraciones del sueño o la ingesta, ciertos marcadores biológicos como disminución de latencia de la fase REM del sueño o aumento en los niveles de cortisol (Eriksen, 2009). Existen varios modelos de depresión: farmacológicos, etiológicos o basados en estrés social o ambiental, quirúrgicos y genéticos.

1.8.3 Modelos de estudio de la depresión

a) Modelos farmacológicos

Se obtienen mediante la aplicación, crónica o aguda, de distintas drogas, que producen en el animal algunas alteraciones fisiológicas y/o conductuales que imitan la patología del hombre. Por ejemplo, la reserpina (o drogas tipo reserpina, como tetrabenazina), cuya acción principal a nivel central es la de “agotar” los niveles de los neurotransmisores de serotonina y, en menor grado, los de noradrenalina. Esto provoca, entre otros trastornos, sedación e hipotermia en los animales. En ratas, la reversión de este síndrome es significativa luego del tratamiento con ciertos tipos de antidepresivos (Leith, Barret, 1980). Se ha desarrollado, también en ratas, otro modelo farmacológico interesante, el tratamiento neonatal con clomipramina (Feenstra *et al.*, 1996; Hansen, Mikkelsen, 1998; Andersen *et al.*, 2002). La clomipramina es un antidepresivo que favorece el incremento de los niveles de serotonina y en menor medida de noradrenalina. Al tratar a los animales durante las primeras semanas de vida con esta droga, a medida que alcanzan la edad adulta, presentan en forma cada vez más acentuada, varios síntomas a los de la depresión en el ser humano. Estos síntomas, como cambios en los ciclos de sueño, agitación locomotora, disminución de la actividad sexual y anhedonia, perduran en el tiempo y son revertidos por el tratamiento crónico con antidepresivos. Este paradójico efecto, la administración de un antidepresivo que induce depresión, se basa en que al aplicarlo durante la vida temprana, momento en que los circuitos cerebrales se están formando (primeros días de vida en ratas) afecta justamente la formación de dichos circuitos. Esta alteración determina que no funcionen como deberían durante la adultez. Se han estudiado los niveles de serotonina y dopamina en este modelo y se encontraron niveles menores de estos neurotransmisores en las regiones límbicas (Andersen *et al.*, 2012). Otro autores hallaron una disminución de serotonina en el hipotálamo, alteraciones

en la actividad de la colinesterasa (Mavanji, 2013) y una disminución de la expresión del transportador de serotonina.

b) Modelos de estrés.

El estrés ha recibido una gran consideración en el campo de la investigación científica debido a su elevada correlación con enfermedades crónicas, como es el caso de la depresión. Las alteraciones neurobiológicas causadas por el estrés crónico en los sistemas reguladores de glucocorticoides, catecolaminas y hormonas generan un desgaste en las múltiples funciones cerebrales, endocrinas e inmunológicas, precipitando dichas enfermedades físicas y mentales. Los síntomas depresivos se inducen por estrés crónico o agudo en el animal (Moscoso, 2014).

Existen diversas formas de inducir estrés en ratas y, dependiendo de la magnitud y duración, puede clasificarse principalmente como agudo o crónico. El estrés agudo puede ser inducido por diversos procedimientos como por ejemplo cometer a los animales a natación en agua fría, electroshocks, aislamiento social, privación de comida o agua, jaulas con la viruta mojada, jaulas inclinadas, cambio de ciclos circadianos de luz/oscuridad, etc. Una combinación de estos factores por un periodo de tiempo es considerado estrés crónico. La aplicación por periodos largos de eventos estresantes se aplican durante varias semanas y pueden ser de diferentes características, puede aplicarse un único estímulo o varios de ellos combinados (Katz *et al.*, 1981; Kennett *et al.*, 1986). El estrés crónico produce en el animal consecuencias incapacitantes que pueden durar un lapso prolongado y reflejan una pérdida de adaptación al estrés, que se manifiesta en síntomas como hipoactividad, anorexia, incremento de los niveles de corticosterona, y anhedonia, entre otros. El conjunto de estas características parecería reflejar más la realidad de los pacientes que los modelos anteriores, y a la hora de evaluar los distintos modelos no debemos olvidar la intrínseca relación que existe entre el estrés y la depresión. El modelo de depresión por estrés crónico ha sido validada al comprobar que la administración de antidepresivos es capaz de revertir los síntomas previamente descritos (Willner, 2001). Una manera alternativa de generar estrés en un animal que ha sido ampliamente utilizada es la separación y el aislamiento social, que no deja de ser en realidad una forma particular de estrés. En el caso de estrés agudo, el más conocido y utilizado es la “indefensión aprendida”, que se genera por la aplicación de shocks

eléctricos de intensidad media, de los que el animal no puede escapar. Por la aplicación repetida, el animal finalmente aprende que ninguna acción que ejecute sobre su entorno termina con el estrés. Como consecuencia de este procedimiento, se observa un déficit de aprendizaje en otras pruebas conductuales, hipolocomoción y anhedonia, así como cambios en el contenido de los neurotransmisores serotonina, noradrenalina y dopamina en ciertas áreas cerebrales. De manera similar, en el modelo de “natación forzada”, o prueba de Porsolt, el estrés agudo, que resulta incontrolable, se genera al obligar al animal a nadar sin poder salir, hasta que adopta una estrategia de inmovilidad (Porsolt RD, 1979). La respuesta de inmovilidad que se genera en esta prueba fue comparada con la disminución de la respuesta de escape en la prueba descriptiva anteriormente de indefensión aprendida. En ambos casos, debido a que los estímulos (tanto el eléctrico como la natación forzada) son inevitables se produce en el animal una pérdida de motivación. Se ha propuesto que la inmovilidad en la prueba de natación forzada sería una adaptación del animal a la situación de estrés y no una incapacidad para hacer frente a la situación (West AP, 1990), con lo cual este comportamiento sería de alguna manera un síntoma positivo de adaptación a situaciones adversas. Ambos modelos han sido muy criticados (Willner, 1991), pero en la actualidad siguen siendo los más utilizados para estudio de fármacos antidepresivos, cuya administración crónica induce una disminución del tiempo de inmovilidad que presentan los animales tratados.

c) Modelos quirúrgicos

Se obtienen a través de lesiones cerebrales; es el modelo de bulbectomía olfatoria el más utilizado (Cairncross *et al.*, 1977). La destrucción bilateral de los bulbos olfatorios de las ratas tiene como consecuencia un déficit en las pruebas de aprendizaje, anhedonia, hiperactividad e irritabilidad. A estas alteraciones de la conducta se suman alteraciones en el metabolismo serotoninérgico en ciertas áreas cerebrales como el hipocampo y la corteza frontal. Dichas alteraciones se revierten durante el tratamiento crónico con antidepresivos. Este es un modelo sensible para la detección de nuevos antidepresivos, aunque tiene la desventaja de ser experimentalmente largo y complejo.

d) Modelos genéticos

Los modelos genéticos de depresión desarrollados en ratas son seleccionados según un criterio farmacológico, es decir, una respuesta y cambios conductuales luego del tratamiento con ciertas drogas antidepresivas. De este modo, la línea genética llamada FSL (Flinder Sensitive Line) posee, como característica preponderante, una hipersensibilidad colinérgica que subyace en varios síntomas observados en la patología depresiva. Por ejemplo, se ha descrito que estos animales presentan hipolocomoción, pérdida de peso, aumento en el porcentaje de sueño REM, deficiencia en el aprendizaje, avance de fase en el ritmo de temperatura corporal y aumento en la inmovilidad en las pruebas de natación forzada (Overstreet *et al.*, 2005). Las ratas Fawn Hooded es otra cepa que ha sido descrita como modelo de depresión por presentar alteraciones en sus sistemas serotoninérgico y noradrenérgico y desórdenes neuropsiquiátricos similares a los de la depresión (Kantor *et al.*, 2000). La línea más utilizada es la cepa de ratas Wistar Kyoto (WKY), que exhibe comportamientos de tipo depresivo en numerosos tests conductuales y anormalidades a nivel de las hormonas, similares a los encontrados en seres humanos asociados con depresión (Braw *et al.*, 2016). Las ratas WKY son animales muy utilizados como modelo de depresión ya que presentan una alta predisposición a sufrir muchas de las consecuencias que aparecen frente a situaciones de estrés. Surgieron inicialmente a partir de las Wistar como controles frente a ratas hipertensas (Okamoto *et al.*, 1963) y fueron propuestas como modelo de depresión debido a su comportamiento y respuesta fisiológica frente al estrés. Demostraron ser sensibles a indefensión aprendida (Paré, 1994; Paré, 1993), presentar mayor inmovilidad en la prueba de natación forzada (FST, Forced Swim Test), tendencia al freezing cuando son expuestas a situaciones estresantes, menor comportamiento exploratorio en campo abierto (open field) y miedo a alimentarse en un ambiente novedoso. Un comportamiento similar a la ansiedad, con mayor secreción de hormona adrenocorticotrófica en respuesta a situaciones de estrés, también se ha observado en estos animales. El análisis del comportamiento animal y de la simulación de situaciones psicopatológicas requiere pruebas lo más rigurosas, objetivas y reproducibles posible. Podemos mencionar entre estas pruebas, aquella que evalúa el consumo de sacarosa (Brennan *et al.*, 2001), que se utiliza para detectar síntomas de anhedonia; el laberinto elevado (Pellow *et al.*, 1985), que es una prueba que mide los niveles de ansiedad en ratas; el laberinto acuático, que se

utiliza para estudiar la performance de memoria y aprendizaje, entre otros (Sun MK, Alkon DL, 2004; McNamara RK, Skelton RW, 2003).

La prueba conductual más utilizada para el estudio del comportamiento similar a la depresión en ratas ha sido la prueba de natación forzada o prueba de Porsolt. Porsolt propuso un test de comportamiento basado en la observación de las ratas cuando son forzadas a nadar en un espacio del que no pueden escapar y se quedan inmóviles (solo realizan los movimientos mínimos para mantener su cabeza fuera del agua) (Porsolt RD *et al.*, 1977). Se identificó al comportamiento de inmovilidad como un reflejo del estado de desesperación. Frente a la imposibilidad de escape, el animal se rinde y se resigna a las condiciones experimentales. Porsolt hipotetizó que la inmovilidad observada reflejaba un estado de ánimo decaído o desesperanza en la rata y predijo que la inmovilidad podría ser reducida con tratamientos utilizados para aliviar la depresión en los seres humanos (Porsolt RD *et al.*, 1978). Demostró que la inmovilidad era reducida mediante el uso de una gran variedad de agentes terapéuticos eficaces en pacientes depresivos.

El diagnóstico de depresión se realiza siguiendo los criterios del DSM-V (American Psychiatric Association, 2013), los cuales incluyen algunos síntomas físicos tales como cambios psicomotores, perturbaciones en el apetito y el peso corporal, falta de energía, entre otros. Estos criterios resultan problemáticos cuando se emplean con adultos mayores debido a que ciertas enfermedades médicas también pueden enmascarse en síntomas similares a los de la depresión o viceversa, y por ellos no es fácil establecer la fuente causal de los síntomas ni un diagnóstico único (Burke y Wengel, 2003). De igual manera, se ha observado que ciertas enfermedades médicas tales como la EP, infarto, accidente cardiovascular, trastornos endocrinos, diabetes, enfermedad pulmonar crónica, enfermedades infecciosas, etc. (Unsar y Sut, 2010; Unützer, 2012), así como algunos medicamentos como las benzodiazepinas, los antihipertensivos, los anticancerígenos, entre otros, pueden causar depresión en momentos posteriores, o incrementar la severidad de síntomas depresivos ya presentes (Unützer, 2012). La relación entre la enfermedad física y la depresión no necesariamente es una relación directa, ya que la depresión puede desencadenarse a causa del malestar y la discapacidad provocada directamente por alguna enfermedad en particular o, incluso, por el deterioro físico y sensorial asociado al envejecimiento (Fiske, Wetherell y Gatz, 2009; Unützer, 2012).

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, no existe un tratamiento farmacológico que revierta la EP en humanos, los tratamientos existentes son ineficientes con el tiempo y mucho menos revierten la enfermedad. Por esta razón, el tratamiento farmacológico de esta enfermedad con antioxidantes como el hidroxitirosol podría ser una alternativa terapéutica. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el hidroxitirosol (HT) y sus derivados, acetato de hidroxitirosol (Ace-HT) y nitrohidroxitirosol (NO₂-HT) son potentes antioxidantes y ejercen varias actividades biológicas. Dados los resultados en nuestro laboratorio con el extracto metanólico de *Buddleja cordata* donde en un estudio los animales fueron administrados con una única dosis de 1.5 mg/Kg de HT, Ace-HT y NO₂-HT por vía intravenosa. Después, las ratas recibieron una microinyección estereotáxica intraestriatal de 10 µg MPP⁺ disueltos en 8 µl de solución salina estéril. Seis días después, los animales fueron administrados con 1 mg/Kg de apomorfina y se contaron las rotaciones ipsilaterales durante 1 hora. Al siguiente día todas las ratas fueron sacrificadas por decapitación y el estriado lesionado fue disectado para la cuantificación de catecolaminas. El pretratamiento con HT, Ace-HT y NO₂-HT disminuyó significativamente ($p < 0.05$) el número de rotaciones ipsilaterales en un ~70% inducidas por el daño generado por MPP⁺. Esta protección fue corroborada con la preservación de los niveles de dopamina estriatal ~80% ($p < 0.05$). Estos resultados demuestran claramente el efecto neuroprotector del hidroxitirosol y sus derivados en el modelo de MPP⁺ de la enfermedad de Parkinson en rata debido a la participación de los compuestos fenólicos en diferentes mecanismos involucrados en la degeneración neuronal implicada en la enfermedad de Parkinson. En las personas con Parkinson los síntomas depresivos pueden ser confundidos con la sintomatología normal de la enfermedad, por ejemplo, la pobre expresión facial, la lentitud de movimientos, las alteraciones del sueño y la pérdida de apetito y peso son síntomas comunes en ambas condiciones. Un diagnóstico diferencial es necesario. Entre los síntomas que pueden ayudar a diferenciarlos son: estado de ánimo bajo generalizado con variaciones durante el día por al menos dos semanas, pensamientos negativos sobre el mundo, sobre sí mismo y sobre su futuro que no tienen correspondencia con su nivel de discapacidad actual, ideas suicidas en el caso de depresiones severas, sentimientos de

culpa, inutilidad o impotencia, disminución del interés o satisfacción al realizar actividades que antes disfrutaba, problemas de atención y concentración, cambios en los patrones de sueño (insomnio o dormir demasiado), cambios en el apetito, poca energía, inquietud, ansiedad. Se considera que en las personas con Parkinson la ansiedad, el pesimismo y la inquietud pueden ser más acentuados durante una depresión que en la población en general.

HIPÓTESIS

La administración de hidroxitirosol por vía intravenosa (i.v.) en ratas tratadas con MPP⁺ inducirá una recuperación funcional caracterizada por la disminución de los giros ipsilaterales, disminución de la inmovilidad e incremento de la conducta de escalamiento en el modelo de nado forzado, por un incremento de los niveles de dopamina y de HVA en comparación con los animales administrados con la neurotoxina y sin tratamiento farmacológico.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el efecto del hidroxitirosol sobre la recuperación funcional en el modelo de nado forzado y su correlación neuroquímica con dopamina y HVA.

Objetivos particulares

- 1) Evaluar la actividad motriz de ratas tratadas con MPP⁺ e hidroxitirosol mediante la técnica de cuadros cruzados.
- 2) Evaluar las conductas de escalamiento, nado e inmovilidad en la prueba de nado forzado en ratas previamente tratadas con MPP⁺ intraestriatal e hidroxitirosol por vía intravenosa.
- 3) Cuantificar el número de giros ipsilaterales inducidos por apomorfina en ratas previamente tratadas con MPP⁺ e hidroxitirosol.
- 4) Cuantificar los niveles de dopamina y HVA en cuerpo estriado.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 Animales, grupos, tratamientos

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar Kyoto (250-280 g; n=9/grupo) que se dividieron en 5 grupos: 1) grupo Sham (S), 2) grupo Control (C), 3) grupo Hidroxitirosol (H) 4) grupo MPP⁺ (M), y 5) grupo MPP⁺/Hidroxitirosol (MH). El día 1, todos los grupos recibieron una inyección intraestriatal, el grupo S solo recibió un daño mecánico, el grupo C recibió una inyección intraestriatal de solución salina (8 µL) y por vía intravenosa (i.v.) también solución salina (1.5 mg/Kg), el grupo H solución salina (8 µL) intraestriatal y por vía i.v. hidroxitirosol (1.5 mg/Kg), el grupo M una inyección estriatal de MPP⁺ (15 µg/µL), y finalmente, el grupo MH una inyección intraestriatal de solución salina (8 µL) y por vía i.v. hidroxitirosol (1.5 mg/Kg). Al quinto día después de la lesión, cada uno de los animales se sometieron a la pre-prueba de nado forzado, para después ser evaluados al sexto día en esta misma prueba. El sexto día se evaluó la conducta de giros y posteriormente se realizó la disección de la región cerebral cuerpo estriado para el análisis de dopamina y HTV por HPLC.

2.2 Prueba de actividad motriz

Se realizó mediante la observación del animal, la cual se encontraba en una caja de acrílico con medidas (43x53x20 cm) la cual estaba dividida en 9 cuadrantes, limpia y desodorizada con metanol. La prueba consistió en observar al animal durante 5 minutos y contabilizar las veces que cambiaba de un cuadrante a otro.

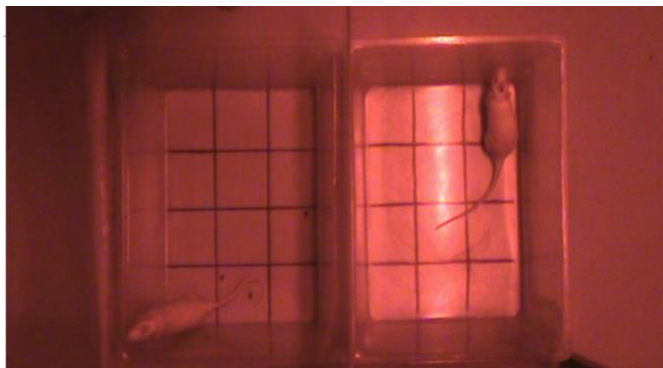


Figura 11. Prueba de actividad motriz. La rata es puesta en una caja de acrílico dividida en 9 cuadrantes mientras es observada durante 5 minutos.

2.3 Modelo de la EP por MPP⁺

El modelo de EP por MPP⁺ se realizó mediante una inyección estereotáxica, que se aplicó el primer día. Los animales fueron anestesiados con Xilazina y Ketamina (50/50) y 15 minutos después se les infundió la solución correspondiente a su grupo en las coordenadas 0.5 mm anterior al bregma, -3 mm lateral al bregma y -4.5 mm ventral a la dura en el estriado derecho (Paxinos y Watson, 1998).



Figura 12. Administración intraestriatal de MPP⁺ por cirugía estereotáxica.

2.4 Modelo de nado forzado

El modelo de nado forzado consistió en poner a cada uno de los animales en un cilindro cristalino transparente con agua a temperatura de 21° - 23 ° C, las ratas no tenían que tocar el fondo del cilindro. El experimento se desarrolló en 2 etapas; la primera etapa se realizó al día 5 después de haber realizado la cirugía estereotáxica, se colocó a la rata dentro del cilindro con agua durante 15 minutos, posteriormente se retiró del agua y se secó con un trapo y puesta a luz cálida; la segunda etapa se realizó al 6° día y en éste, la rata solo se mantuvo durante 5 minutos, los cuales fueron videograbados para su posterior análisis de cada una de las conductas que realizó (escalamiento, nado e inmovilidad).



Figura 13. Modelo de nado forzado. El animal es puesto en un cilindro con agua, procurando que sus patas no toquen el fondo, la prueba es videograbada durante 5 minutos durante los cuales se podrán observar algunas de las conductas como escalamiento, nado o inmovilidad.

2.5 Evaluación del daño neuronal por prueba conductual

La prueba conductual de giros se aplicó a todos los grupos (n=9). El sexto día después de la administración de MPP⁺ o vehículo intraestriatal, a los animales se les administró una dosis s.c. de apomorfina (1 mg/Kg) disuelta en solución antioxidante de ácido ascórbico, que fue preparada el mismo día, se mantuvo protegida de la luz y en frío. Se administró la dosis correspondiente de apomorfina tras lo cual la rata se colocó dentro de una caja de acrílico limpia y desodorizada con metanol, con una cama delgada de aserrín. Pasados los primeros 5 minutos se comenzó el conteo del número de giros completos que realizó la rata durante una hora, este número fue registrado para cada rata y promediado por grupos.



Figura 14. Evaluación del daño neuronal 6 días previos a la cirugía estereotáxica. Después de haber recibido una dosis de apomorfina (1mg/Kg), las ratas tratadas con MPP⁺ o MPP⁺ con hidroxitirosol empiezan a reaccionar, el cual es observado mediante giros ipsilaterales.

2.6 Catecolaminas por HPLC

Para medir los niveles de dopamina en el estriado, las muestras se sonicaron en 10 volúmenes de ácido perclórico en solución de sodio metabisulfito (1 M, 0.1% m/v), acto seguido se centrifugaron a 10,000xg por minuto y el sobrenadante se analizó por HPLC (LC 250 Perkin Elmer) con detección electroquímica (BAS 4-B), se utilizó una columna analítica con un tamaño de partícula de 3 mm para catecolaminas. La fase móvil se preparó con un búffer fosfato (pH 3.2) compuesto por octil sulfato de sodio (Grace, Alltech) al 0.2 mM, EDTA al 0.1 y 15% de metanol (v/v). Se construyeron curvas de calibración para la dopamina y las concentraciones en las muestras se obtuvieron por interpolación de la curva estándar. Los datos se expresaron como nmol de DA por gramo de tejido húmedo (Montes *et al.*, 2001).

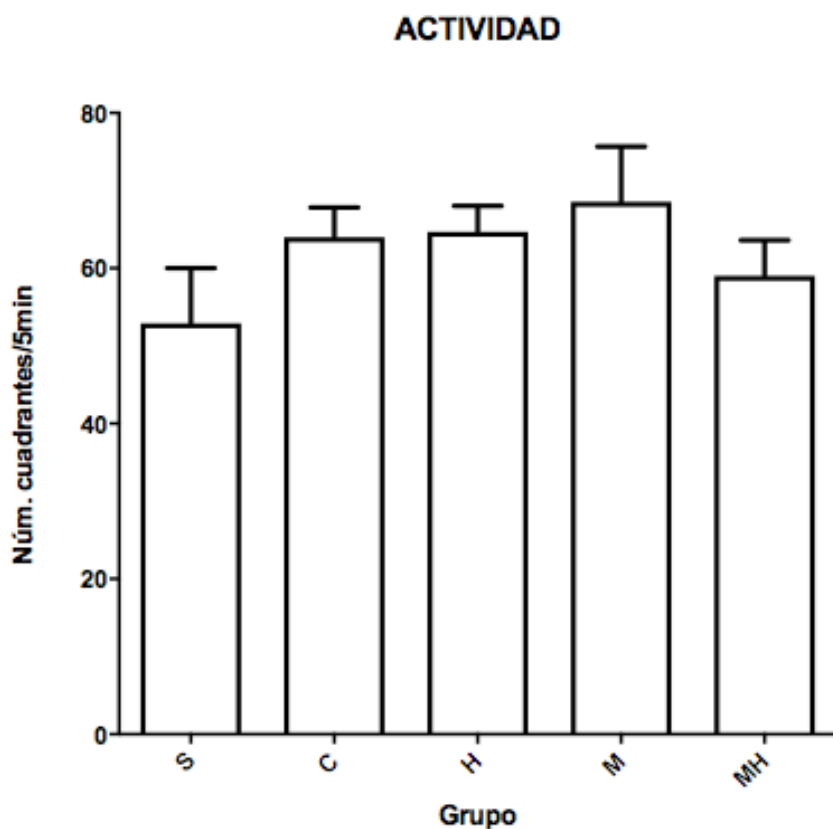
2.7 Estadística

Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar (ES) de 9 ratas. Las comparaciones estadísticas entre grupos se hicieron aplicando un ensayo de ANOVA de una vía seguido de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando p fue igual o menor de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Prueba de actividad motriz

La prueba de actividad motriz es utilizada frecuentemente para cuantificar variables de desplazamiento, exploración y estado emocional de la rata, bajo diversas condiciones experimentales (Bronikowski *et al.*, 2001; J.O. Adjene, E.B. Ezenwanne, 2008).

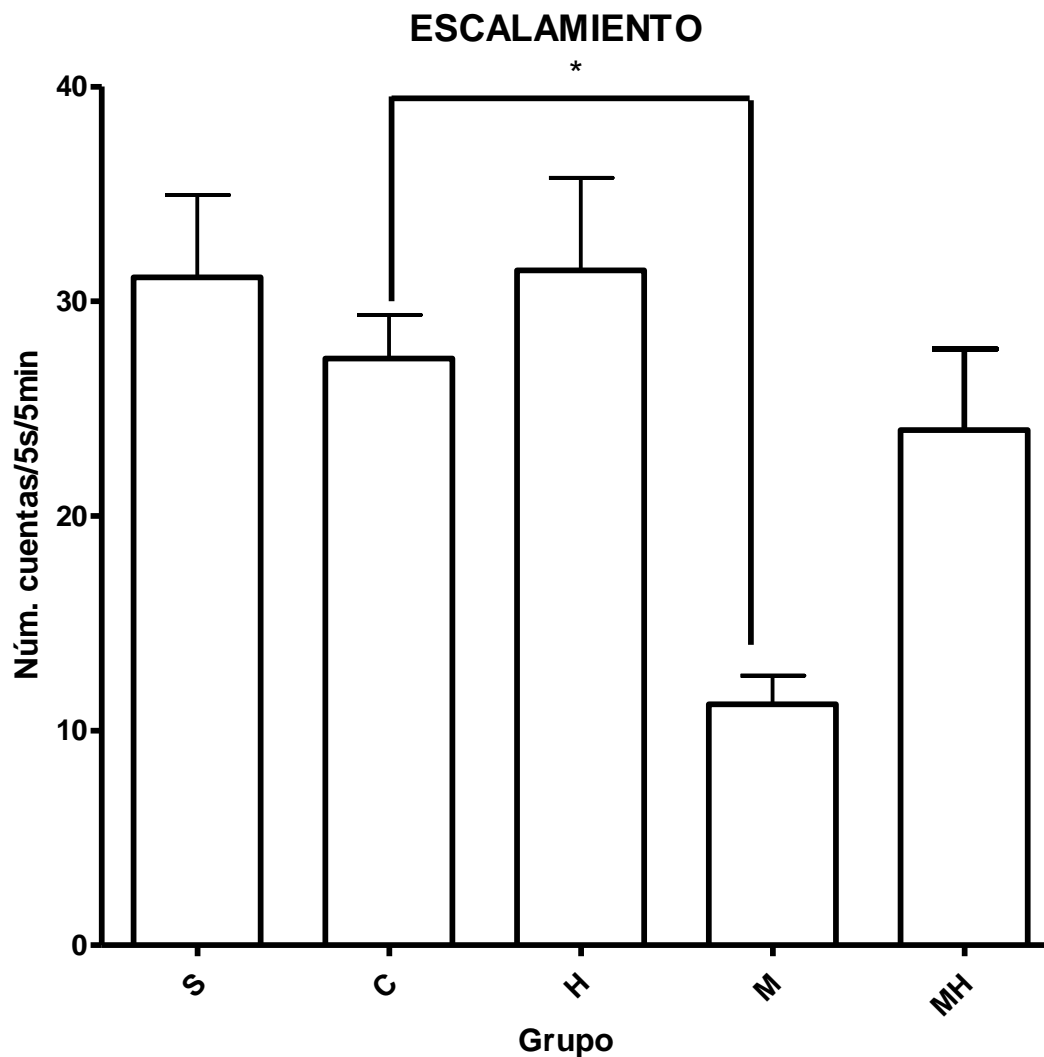


Gráfica 1. Número de cuadrantes cruzados en la prueba de actividad locomotora. La manipulación quirúrgica no produjo cambios significativos en esta variable respecto al grupo Sham. Cada barra representa el promedio del número de cuadrantes cruzados por 5 minutos del grupo experimental. Grupos: S: Sham; C: Control; H: Hidroxitirosol; M: MPP⁺; MH: MPP⁺/Hidroxitirosol.

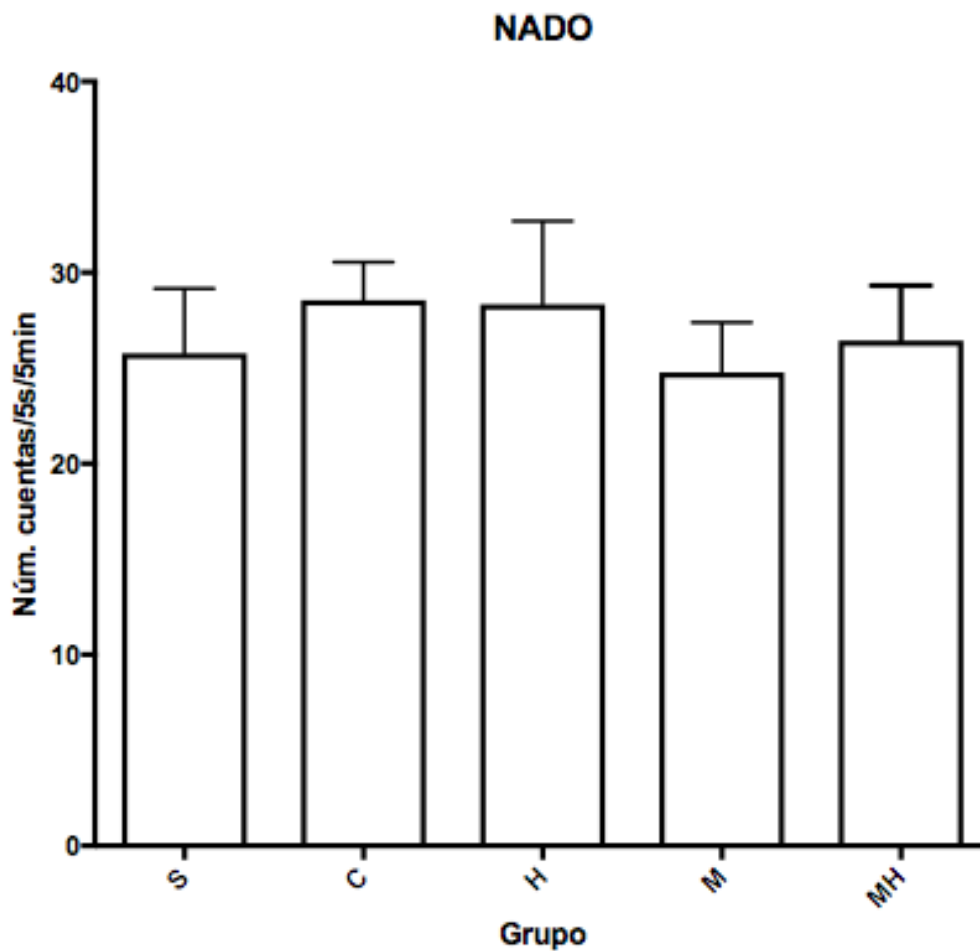
La cirugía esterotáxica con la microinyección de MPP⁺ en el cuerpo estriado y la administración de hidroxitirosol no produjeron efectos sobre la actividad y la coordinación locomotora. En el presente estudio el uso de esta prueba permitió verificar que la cirugía

esterotáxica con la microinyección de MPP⁺ y la administración de hidroxitirosol por vía intravenosa no producen hipoactividad o hiperactividad motora (aumento o disminución del número de cuadros cruzados), ni cambios en la exploración (tiempo empleado en la conducta vertical), ni en la motivación (tiempo dedicado al acicalamiento), por lo que se descarta algún daño neurológico producido por la manipulación quirúrgica o la microinyección. Por lo tanto, los datos sugieren a nivel locomotriz que la cirugía estereotáxica y la microinyección de MPP⁺ y la administración de hidroxitirosol no provocan algún daño cerebral que pudiera repercutir la actividad locomotora de la rata ya el promedio de cuadros cruzados de todos los grupos fue de 60 de cada animal en un tiempo de 5 minutos.

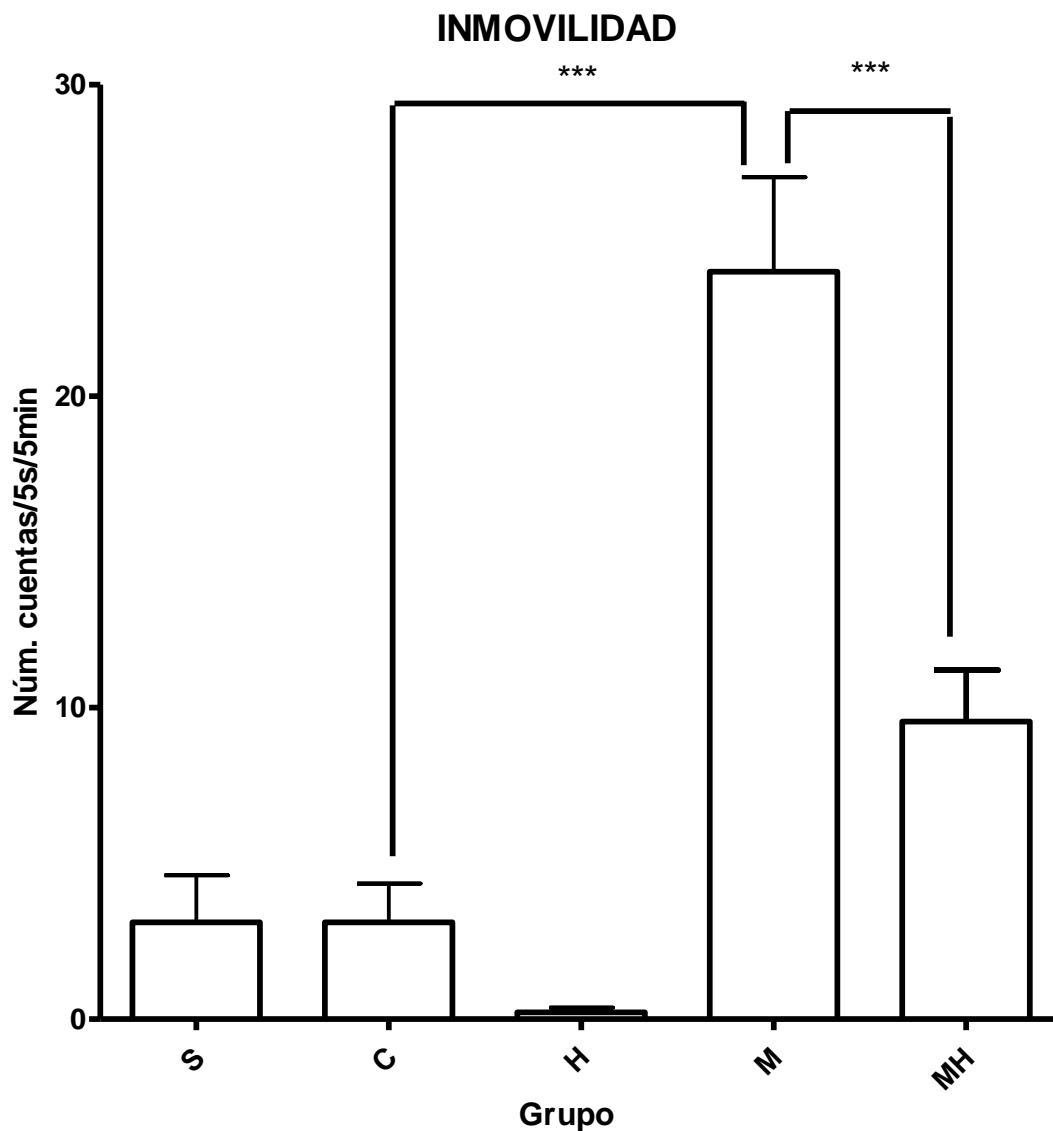
3.2 Prueba de nado forzado



Gráfica 2. Conducta de escalamiento en la prueba de nado forzado. Se observa una disminución en el grupo M (MPP⁺) con respecto a los grupos S (Sham) y Control (C), además de una diferencia significativa entre el grupo C y M donde *p<0.05. El grupo MH (MPP⁺/Hidroxitirosol) se observa con un aumento en la actividad de escalamiento respecto al grupo M. Cada barra representa el promedio de la conducta de escalamiento que fue medido durante 5 minutos.



Gráfica 3. Conducta de nado en la prueba de nado forzado. No se observan diferencias significativas entre los grupos tratados. Grupos: S: Sham; C: Control; H: Hidroxitirosol; M: MPP⁺; MH: MPP⁺/Hidroxitirosol. Cada barra representa el promedio de la conducta de nado que fue medido durante 5 minutos.



Gráfica 4. Conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado. Se observa un aumento en el tiempo de inmovilidad en la conducta del grupo M (MPP⁺) con respecto a los grupos S (Sham) y C (Control) *** $p < 0.0005$. Por otro lado, se observa en el grupo MH (MPP⁺/Hidroxitirosol) una reducción significativa *** < 0.0005 en el tiempo de inmovilidad con respecto al grupo M. Cada barra representa el promedio de la conducta de inmovilidad que fue medido durante 5 minutos.

El presente estudio demuestra que la administración de hidroxitirosol por vía intravenosa produce un efecto antidepresivo en ratas, de modo que se modificó el número en conducta de inmovilidad y escalamiento. Los efectos observados en los grupos tratados son atribuibles a la administración de hidroxitirosol.

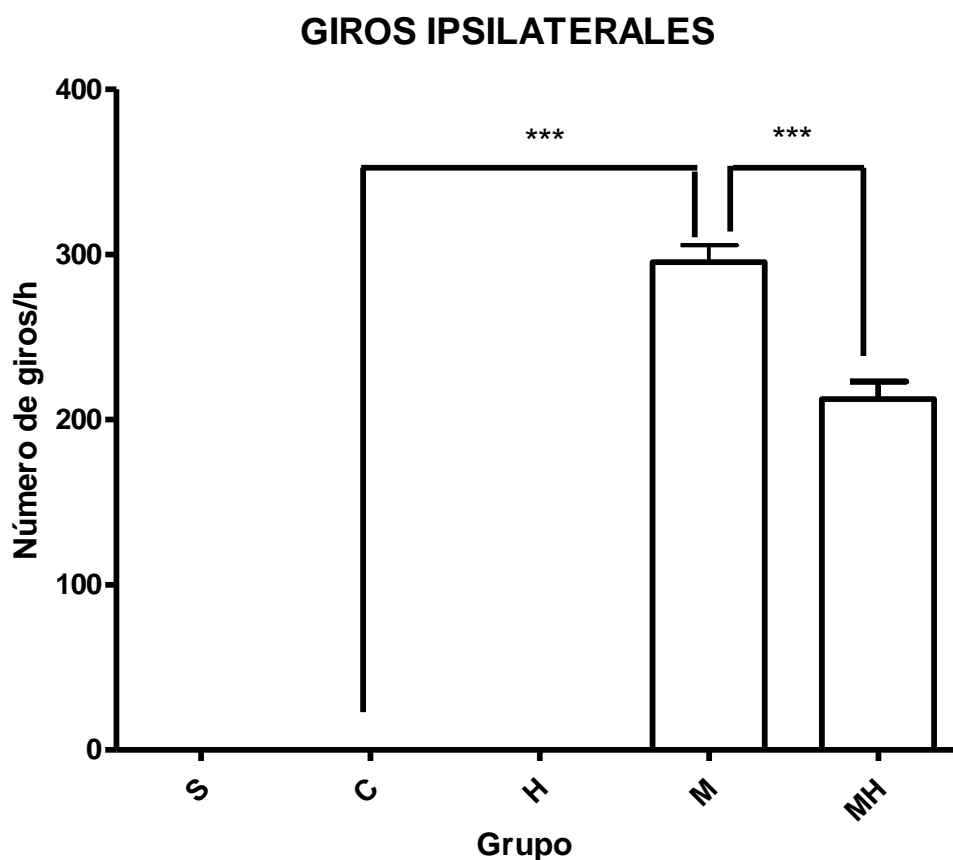
Se puede observar disminución de la conducta de escalamiento en el grupo M con respecto al grupo control, además de una recuperación en la conducta de inmovilidad del grupo M/MH respecto al grupo M. El procedimiento básico de dos sesiones para la rata se diseñó para inducir un alto y estable nivel de inmovilidad durante diferentes pruebas en el segundo día. Sin embargo, es posible exponer repetidamente a los animales a situación de prueba y aún así obtener una clara reducción de la inmovilidad. Con los tratamientos farmacológicos crónicos, es preferible intercalar el periodo de administración entre las dos sesiones y comparar los efectos observados con los de un único tratamiento administrado inmediatamente antes de la segunda sesión, precedido por un número similar de administraciones de vehículos (Lahmame, 1995).

3.3 Prueba conductual de giros

En los estudios que implican el uso de modelos de neurotoxinas como MPP⁺ para evaluar efectos neuroprotectores de fármacos, se recomienda realizar inicialmente un ensayo conductual. La prueba rotatoria es la prueba conductual más empleada en el modelo de MPP⁺ de la Enfermedad de Parkinson. Ya que se evalúa la integridad del sistema dopaminérgico nigroestriatal y la hipersensibilización postsináptica. Esto se fundamenta en la lesión de la sustancia nigra unilateral causada por la administración de MPP⁺ que genera asimetría entre la inervación dopaminérgica de los dos hemisferios cerebrales, causando un aumento en la densidad de los receptores dopaminérgicos postsinápticos en el hemisferio lesionado, específicamente los D₂ (Siegel *et al.*, 2006) por compensación de la falta del neurotransmisor. Para comprobar que se ha lesionado esta vía dopaminérgica por la toxina MPP⁺, se realizó la prueba de conducta rotatoria empleando apomorfina, esperando que la respuesta de giros inducida por este agonista de los receptores DA sea mayor en el hemisferio ipsilateral a la lesión; generando un movimiento rotatorio, ya que se ha demostrado que el número de giros inducidos por apomorfina es proporcional al grado de lesión en la vía nigro estriatal (Schawarcz *et al.*, 2009).

Al evaluar el comportamiento motor inducido por apomorfina en las ratas se encontró que en los grupos S, C y H el número de giros fue cero. Esto se relaciona con la ausencia de daño en estos grupos controles. En el grupo M se observó un aumento estadísticamente

significativo en la respuesta durante 60 min (290 ± 23 giros; $p < 0.0005$), respecto al grupo C. En cuanto al grupo M/MH que recibió el tratamiento con hidroxitirosol y la lesión intraestriatal con MPP+ se contabilizaron (207 ± 18 giros, resultando este número de giros significativamente ($p < 0.0005$) menor con respecto al grupo lesionado con MPP+ que no recibió el hidroxitirosol (gráfica 5).



Gráfica 5. Prueba conductual de giros. En esta gráfica podemos observar el efecto rotatorio inducido por la administración de apomorfina (1mg/Kg) s.c. seis días después de la cirugía estereotáxica en la que se administró MPP+ (animales lesionados M y MH) o vehículo (grupos S,C y H). Cada barra representa el número de giros promedio de cada grupo (n=9 por grupo) durante 1 h. Se observa una diferencia entre el grupo C y M (** $p < 0.05$) y entre el grupo M y MH (** $p < 0.05$).

Estos resultados son comparables a lo obtenido por Hung y colaboradores (2008), que evaluaron el mismo modelo de la EP empleado en este trabajo, evidenciando la asimetría motora mediante la administración de apomorfina (5mg/Kg) i.p. tras 6 días de la lesión

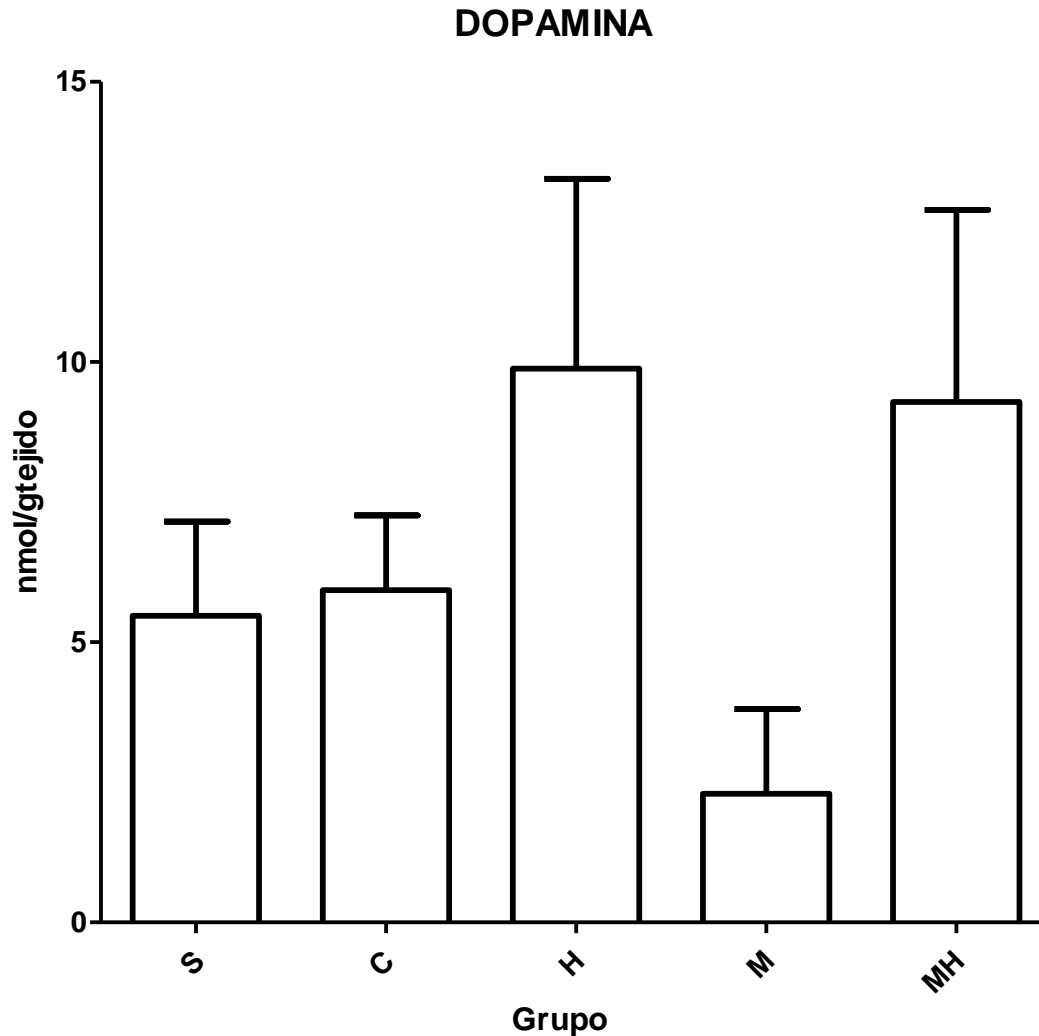
intraestriatal con MPP⁺. Cabe mencionar que los giros que se obtuvieron en el presente trabajo fueron ipsilaterales a la lesión como los reportados por Hung y colaboradores (2008). La dirección de los giros está relacionada con el tiempo transcurrido entre la lesión y la realización de la prueba conductual; ya que la respuesta compensatoria no es evidente seis días después de la lesión, sino tiempo más tarde. Esto en referencia a los reportes existentes donde se ha observado que la densidad de los receptores D₂ en el caudado putamen del hemisferio lesionado en un modelo de EP aumenta en un 42% en comparación con el hemisferio intacto hasta la cuarta semana tras la lesión con MPP⁺ (Altar *et al.*, 2006). Finalmente, observamos que en el grupo que recibió la administración de hidroxitirosol (MH), redujo este número de giros significativamente con respecto al grupo lesionado con MPP⁺ que no recibió hidroxitirosol (grupo M). Pérez-Barrón y colaboradores, evaluaron la misma prueba conductual de giros que al cabo de 6 días después de la lesión con MPP⁺, este grupo produjo un marcado efecto sobre el comportamiento de giro (188 ± 33 rotaciones) después de la administración de apomorfina en comparación con grupos que no recibieron la inyección intraestriatal con MPP⁺. En cambio, el pretratamiento del extracto metanólico de *B. Cordata* (como se mencionó anteriormente, entre los principales componentes de esta planta se encuentra el hidroxitirosol) previno significativamente ($p < 0.05$) el efecto conductual que la apomorfina indujo en los animales infundidos con MPP⁺; el número de giros ipsilaterales se redujo en un 75% en comparación con el grupo con la inyección intraestriatal de MPP⁺ (Pérez-Barrón *et al.*, 2014). Estos resultados confirman el efecto farmacológico y neuroprotector del hidroxitirosol sobre el sistema nervioso central.

La prueba conductual de giros inducida por apomorfina aplicada al modelo de la EP evalúa la integridad del sistema nigroestriatal y la sensibilización postsináptica. Se ha demostrado que el número de giros inducidos por apomorfina es proporcional al grado de lesión de esta vía dopaminérgica (Schwarcz *et al.*, 1979). Los giros son causados por la lesión unilateral con MPP⁺ la cual genera asimetría en la inervación dopaminérgica entre los dos hemisferios cerebrales causando un aumento en la densidad de los receptores dopaminérgicos postsinápticos en el hemisferio lesionado (Siegel *et al.*, 2006). En relación a este ensayo, el tratamiento con hidroxitirosol fue capaz de reducir el número de giros en ratas lesionadas con MPP⁺ mostrando efecto neuroprotector de esta hormona. Un efecto similar se ha reportado con otros compuestos antioxidantes (Aguirre-Vidal *et al.*, 2015). Hung y colaboradores (2008), evidenciaron la asimetría motora mediante la

administración de apomorfina 7 días después de la lesión intraestriatal con MPP⁺ reportando giros ipsilaterales con una frecuencia de rotación de 3.8 ± 1.3 giros/min en el grupo lesionado. Típicamente se han reportado que los giros son contralaterales. En este estudio discrepamos con el sentido de los giros, atribuimos este efecto al tiempo en el que se realizó el ensayo (6 días después de la lesión con MPP⁺). Ya que existe un cambio en la densidad de los receptores debida al daño inducido por la neurotoxina pero el proceso compensatorio que provoca el aumento de la densidad de los receptores aún no es evidente, esta interpretación se sustenta en lo reportado por Altar y colaboradores (1986), quienes determinaron que la densidad de los receptores D₂ en el caudado putamen del hemisferio lesionado en un modelo de la EP aumenta 42% en comparación con el hemisferio intacto hasta la cuarta semana después de la lesión con la neurotoxina MPP⁺.

3.4 Niveles de dopamina y HVA

A pesar del efecto neuroprotector evidente en la conducta de giros, fue importante realizar otras pruebas de mayor especificidad que permitieron correlacionar estos resultados. Por lo que se dedicó a cuantificar los niveles de dopamina, debido a la importancia de este neurotransmisor en la toxicidad de MPP⁺ y el desarrollo de la EP, ya que la administración de dicha toxina induce una disminución de al menos 70% de los niveles de DA (Wu *et al.*, 2005). Por lo que fue importante reforzar este estudio conductual con la cuantificación de los niveles de dicha catecolamina.

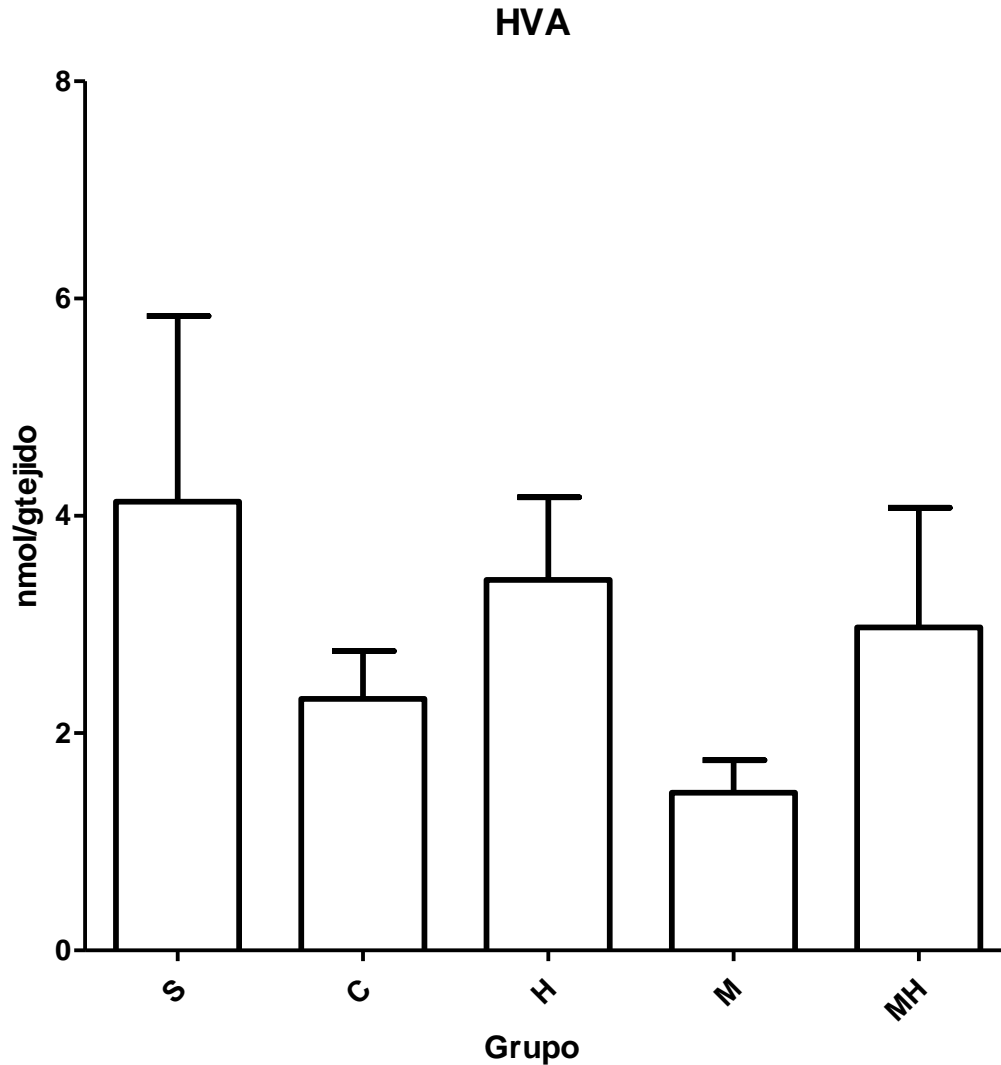


Gráfica 6. Efecto del hidroxitirosol sobre los niveles de DA en el cuerpo estriado en la rata. Cada una de las barras representa la media o el promedio de los niveles de DA determinados en los estriados derechos de cada uno de los grupos de tratamiento, por HPLC con detector electroquímico. Los resultados revelan un cambio significativo entre el grupo M y el grupo MH. Donde S, grupo Sham; C, grupo control; H, grupo hidroxitirosol; M, grupo MPP⁺; MH, grupo MPP⁺/Hidroxitirosol. A pesar de no observarse una significancia estadística, se observa una tendencia entre el grupo M y MH.

La concentración basal de DA en el estriado de ratas Wistar Kyoto macho corresponden a la concentración detectada en el grupo C. No se observaron diferencias estadísticas entre el grupo C y el grupo M (10 ± 3 vs 2 ± 2 mmol/mg de tejido). La administración con hidroxitirosol previno de manera significativa la caída de los niveles de la monoamina, frente a la lesión con MPP⁺ (grupo M/MH) (gráfica 6). Estos resultados pueden compararse con el estudio realizado por Pérez-Barrón y colaboradores (2014) donde mencionan que el extracto metanólico de *B. cordata* protege el contenido de dopamina en

el estriado. Este efecto protector se demostró mediante el mismo análisis de los niveles de dopamina usando cromatografía líquida. Los animales que fueron administrados sólo con MPP⁺, mostraron una reducción significativa (79%) de los niveles de dopamina en cuerpo estriado, mientras que la administración del extracto metanólico de *B. cordata* a ratas infundidas con MPP⁺ fue del ≈50% neuroprotectora (Pérez-Barrón *et al.*, 2014).

En la EP se disminuyen los niveles de DA, esta característica bioquímica se reproduce en el modelo de MPP⁺. En este trabajo se observó una disminución significativa de esta catecolamina respecto al grupo control como se esperaba de acuerdo a la literatura. Al indagar el efecto del tratamiento de hidroxitirosol sobre los niveles de este neurotransmisor se encontró que el hidroxitirosol es capaz de preservar los niveles de DA frente al daño inducido por MPP⁺, lo que concuerda con otros estudios donde se ha reportado que la administración de hidroxitirosol el día de la lesión generada con MPP⁺ en ratas previene la pérdida de los niveles de DA (Pérez-Barrón, 2014).



Gráfica 7. Efecto del hidroxitirosol sobre los niveles del HVA en el cuerpo estriado en la rata. Cada una de las barras representa la media o el promedio de los niveles de HVA determinados en los estriados derechos de cada uno de los grupos de tratamiento, por HPLC con detector electroquímico. Los resultados revelan una tendencia entre el grupo M y el grupo MH. Donde S, grupo Sham; C, grupo control; H, grupo hidroxitirosol; M, grupo MPP⁺; MH, grupo MPP⁺/Hidroxitirosol.

Los resultados obtenidos presentaron un decremento estadísticamente significativo en las concentraciones de DA y HVA a causa de la microinyección intraestrial de 15µg/µL de MPP⁺. Es decir, que la administración tóxica disminuye en un 70% el nivel de DA y un 50% en HVA. Este decremento en la concentración de DA es comparable al generado por la administración de MPTP en el que se ha reportado una disminución de aproximadamente 45% respecto al control (Wang *et al.*, 2006). El nivel de dopamina en el

grupo MH no es significativamente distinto a los niveles de DA del grupo control, por lo cual podemos concluir que el hidroxitirosol es capaz de mantener los niveles de DA frente al daño del MPP⁺.

Este estudio es comparado con el de Pérez-Barrón (2014) donde se demostró un efecto protector del extracto metanólico de *B. Cordata*, mediante el análisis de los niveles de estas catecolaminas usando cromatografía líquida de alta resolución y detección electroquímica.

Sugerimos que la preservación de los niveles de DA, HVA y la reducción de los giros causado por el tratamiento con hidroxitirosol en este trabajo sugieren estar directamente relacionadas con el incremento de la sobrevivencia de neuronas dopaminérgicas detectadas en la SNpc de cerebro de rata. Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con hidroxitirosol a la dosis utilizada, confiere protección completa en términos de contenido de DA.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los animales que fueron manipulados con los diferentes tratamientos, no presentaron ninguna alteración en la conducta motriz espontánea.
2. El hidroxitirosol administrado por vía intravenosa presenta un efecto neuroprotector en el sistema nervioso central frente a la toxicidad del MPP+ ya que:
 - 2.1 En la prueba de nado forzado, las ratas disminuyen la conducta de escalamiento por efecto del daño producido por el MPP+ intraestriatal. El tratamiento simultáneo con hidroxitirosol es capaz de revertir dicha disminución.
 - 2.2 En la prueba de nado forzado disminuyó significativamente ($p < 0.05$) la conducta de inmovilidad en un 65%.
 - 2.3 El hidroxitirosol previene la disminución de los niveles de DA y HVA causada por el efecto neurotóxico del MPP+ en comparación con los niveles de ratas tratadas sólo con la neurotoxina.
 - 2.4 El hidroxitirosol disminuye los giros ipsilaterales de las ratas tratadas (grupo MH), comparadas con el grupo que fue lesionado con MPP+ (M) inducidos por apomorfina.

PERSPECTIVAS

La inflamación es otro proceso de suma importancia en los desórdenes neurodegenerativos como en el caso de la EP. Algunos estudios han demostrado que el hidroxitirosol puede ejercer acción sobre la microglía, evitando su activación. Lo que se refleja en el control de la inflamación. En este sentido, debe considerarse investigar el efecto del tratamiento con hidroxitirosol sobre el estado inflamatorio inducido en este modelo.

Además, trabajar con algún otro derivado del hidroxitirosol debido a la permeabilidad del compuesto, esto relacionado a los grupos funcionales que éstos tengan.

Se podría cuantificar los niveles de otras catecolaminas en la misma región del cerebro con el mismo modelo de inducción de Parkinson.

BIBLIOGRAFÍA

- A.M. Bronikowski PA, Carter JG, Swallow IA, Girard JS, Rhodes T, Garland. (2001). Open-field behavior of house mice selectively bred for high voluntary wheel-running. *Behav Genet*, 31, pp. 309-316.
- Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi- Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, et al. (2010). Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron.*; 25:239- 52.
- Akanksha Mishra, S. S. (2018). Physiological and Functional Basis of Dopamine Receptors and Their Role in Neurogenesis: Possible Implication for Parkinson's disease. *J Exp Neurosci*, 18-29.
- Alarcón-Aguilar A, Abel SA, Königsberg- Fainstein M. (2010). Modelos neurotóxicos de la enfermedad de parkinson y disfunción mitocondrial. *Rev.*; 29(3): 91-99.
- Alvarez-Fischer D, Henze C, Strenzke C, Westrich J, Ferger B, Höglinger GU, Oertel WH, Hartmann A. (2008). Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and a-synuclein-deleted mice. *Exp Neurol* 210:182-193.
- Anisman, H y R. M. Zacharco. (1982). "Depression: the predisposing influence of stress", *Behav. Brain Sci.*, 5, 89-137.
- Aron L, Klein P, Pham TT, Kramer ER, Wurst W, Klein R. (2010). Pro-survival role for Parkinson's associated gene DJ-1 revealed in trophically impaired dopaminergic neurons. *Plos Biol* 8:1000349.
- Baez M., Kursar J., Helton L., Wainscott D., Nelson D. (1995). Molecular biology of serotonin receptors. *Obses. Res.* 3:441S-447S.
- Bahena-Trujillo R, F. G.-M. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Biomed*, 11:39-60.
- Baldessarini R.J. (2003). Fármacos y tratamiento para trastornos psiquiátricos, depresión y trastornos de ansiedad. En Goodman and Gilman. *Bases Farmacológicas de la terapéutica*. Mc Graw Hill. 1:455- 459.
- Bartfai T., Lu X., Badie-Mahdavi H., Barr AM., Mazarati A., Hua X., Yaksh T., Haberhauer G., Conde S., Trembleau L., Somogyi L., Kröck L., Rebek J. (2004). Galmic, a nonpeptide galanin receptor agonist, affects behaviors in seizure, pain and forced-swim tests. *PNAS* 101(28): 10470-10475.
- Benazzouz A, Breit S, Koudsie A, Pollak P, Krack P, Benabid AL. (2002). Intraoperative microrecordings of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *Movement Disord.*;17:S145-S149.

- Berman R., Belanoff J., Charney D., Schatzberg A. (1999). Principles of the pharmacotherapy of depression. En: Charney D, Nestler E, Bunney B (eds). Neurobiology of mental illness. Oxford University Press. 419-431.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia- Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. (2000).
- Bezard E, Dovero S, Bioulac B, Gross C. Effects of different schedules of MPTP administration on dopaminergic neurodegeneration in mice. *ExpNeurol*; 148:288-92.
- Bezard E, Dovero S, Bioulac B, Gross CE. (2003). Kinetics of nigral degeneration in a chronic model of MPTP-treated mice. *Neurosci Lett.*; 234:47-50.
- Biosa A, A. I. (2018). Dopamine oxidation products as mitochondrial endotoxins, a potential molecular mechanism for preferential neurodegeneration in Parkinson Disease. *ACS Chem Neurosci*, 10.1021.
- Blesa J, Juri C, Collantes M, Peñuelas I, Prieto E, Iglesias E, Martí-Climent J, Arbizu J, Zubieta JL, Rodríguez-Oroz MC, García-García D, Richter JA, Cavada C, Obeso JA. (2010). Progression of dopaminergic depletion in a model of MPTP-induced Parkinsonism in non- human primates. An F-DOPA and C- DTBZ PET study. *Neurobiol Dis*.
- Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S. (2012). Classic and New Animal Models of Parkinson's Disease. *J Biomed Biotechnol.*; 2012:845618.
- Borsini F., Meli A. (1998) Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity. *Psychopharma*. 94: 147-160.
- Bourin M., Mocaër E., Porsolt R. (2004). Antidepressant-like activity of S20098 (agomelatine) in the forced swimming test in rodents: involvement of melatonin and serotonin receptors. *J. Psychiatry Neurosci*. 29(2): 126-133.
- Boushey H.A. (2002). Fármacos utilizados en el asma. En: Katzung Bertram G. *Farmacología Básica y Clínica*. 8o ed. Manual Moderno. 386-388.
- Bové J, Perier C. (2012). Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 211:51-76.
- Breisch ST, Zelman FP, Hoebel BG. (1976). Hyperphagia and obesity following serotonin depletion by intraventricular p-chlorophenylalanine. *Science*. 192:382–385.
- Cabeza-Arvelaiz Y, Schiestl RH. Transcriptome. (1976). Analysis of a Rotenone Model of Parkinsonism Reveals Complex I-Tied and -Untied Toxicity Mechanisms Common to Neurodegenerative Diseases. *Plos One*. 2012; 7(9): e44700.
- Calabriso N, G. A.-C. (2018). Hydroxytyrosol Ameliorates Endothelial Function under Inflammatory Conditions by Preventing Mitochondrial Dysfunction. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 47-61.

- Cao C, L. D. (2018). Levodopa Reduces the Phase lag Index of Parkinson's Disease Patients: A Magnetoencephalographic Study. *Clin EEG Neurosci.*, 1: 1691-1693.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T. (1987). 3, 4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *NATURE.*; 180: 1200.
- CG, G. (2011). The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies. *CSH Perspectives in Medicine*, 201 1;1.
- Chan HH, T. M. (2018). A novel selective MAO-B inhibitor with neuroprotective and anti-Parkinsonian properties. *Eur J Pharmacol*, 5;818:254-262.
- Charney DS., Heninger GR., Sternberg DE. (1984). Serotonin function and mechanism of action of antidepressant treatment. Effects of amitriptyline and desipramine. *Arch Gen Psychiatry.* 41(4):359- 65.
- Chio JS, Park C, Jeong JW. (2009). AMP-activated protein kinase is activated in Parkinson's disease models mediated by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Biochem Biophys Res Commun* 391:147-151.
- Choi WS, D. Palmiter R, Xia Z. (2011). Loss of mitochondrial complex I activity potentiates dopamine neuron death induced by microtubule dysfunction in a Parkinson's disease model. *J Cell Biol.*; 192: 873–882.
- Cohen G, Werner P. (1994). Free radicals, oxidative stress, and neurodegeneration. En Calne DB (ed). *Neurodegenerative diseases*. Saunders, Philadelphia; p. 139-162.
- Cohen G. (1990). Monoamine oxidase and oxidative stress at dopaminergic synapses. *J Neur Trs.* ;32:229-38.
- Colle D, F. M. (2018). Paraquat and Maneb Exposure Alters Rat Neural Stem Cell Proliferation by Inducing Oxidative Stress: New Insights on Pesticide-Induced Neurodevelopmental Toxicity. *Neurotox Res.*, 1240-1248.
- Conway KA, Rochet JC, Bieganski RM, Lansbury PT Jr. (2001). Kinetic Stabilization of the α -Synuclein Protofibril by a Dopamine- α -Synuclein Adduct. *Science.*; 294: 1346-1349.
- Costa G, P. A. (2018). Rhes Counteracts Dopamine Neuron Degeneration and Neuroinflammation Depending on Gender and Age. *Front Aging Neurosci.*, 10: 163.
- D. Hernandez-Baltazar, L. Z.-F.-O. (2017). The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurology*, 533-539.
- Dauer W, Przedborski S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39: 889-909.

- Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, et al. (1979). Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiat Res.* ;1:249-54.
- Dhillon AS, Tarbutton GL, Levin JL, Plot-kin GM, Lowry LK, Nalbhone JT, Shepherd S. (2008). Pesticide/environmental exposures and Parkinson's disease in East Texas. *J Agromedicine* 13:37-48.
- Dong Z, Fergert B, Feldon J, Bueler H. (2002). Overexpression of Parkinson's disease-associated alpha-synuclein by Recombinant adeno-associated virus in mice does not increase the vulnerability of dopaminergic neurons to MPTP. *J Neurobiol.*; 53:1-10.
- Dukes AA, Korwek KM, Hastings TG. (2005). The effect of endogenous dopamine in rotenone-induced toxicity in PC12 cells. *Antioxid Redox Signal* 7:630-638.
- Eriksen JL, Wszolek Z, Petrucelli L. (2009). Molecular Pathogenesis of Parkinson Disease. *Arch Neurol* 62:353-357.
- Faull RL, Laverty R. (2015). Changes in dopamine levels in the corpus striatum following lesions in the substantia nigra. *Exp Neurol.* 1969;23:332-40.
- Felman R., Meyer J., Quenzer L. (1996). Principles of Neuropsychopharmacology. Sinauer. Oxford University Oxford University Press. 909.
- Flórez, J. (1997). Farmacología humana. 3a ed. Masson, S.A., Madrid. 235-238.
- Fredholm BB. (1980). Theophylline actions on adenosine receptors. *Eur J. Respir Suppl.* 109:29-36.
- Garlow S., Musselman D., Nemeroff C. (1999). The neurochemistry of mood disorders: clinical studies. En: Charney D., Nestler E., Bunney B., (eds). *Neurobiology of mental illness.* Oxford University Oxford University Press. 348-364.
- Gasser PJ, Orchinik M, Raju I, Lowry CA. (2009). Distribution of organic cation transporter 3, a corticosterone-sensitive monoamine transporter, in the rat brain. *J Comp Neurol.* 512:529-555.
- Geyer M., Markou A. (1995). Animal model of psychiatric disorders. En *Psychopharmacology: The fourth generation of progress.* Floyd B., Kupfer D., (eds). Raven Press. 787-797.
- Giasson BI, Lee VM. (2003). Are Ubiquitination Pathways Central To Parkinson's Disease? *Cell.*; 114:1-8.
- Gibbons R., Davis J. (1986). Consistent evidence for biological subtype of depression characterized by low CSF monoamine levels. *Act Psychiatr S* 74: 8-12.
- Goldman H.H. (1989). *Psiquiatria General. Manual moderno.* México. pp. 349-366.

- Gómez-Chavarín M, Díaz-Pérez R, Morales-Espinosa R, Fernández-Ruiz J, Roldán-Roldán G, Torner C. (2013). Efecto de la exposición al pesticida rotenona sobre el desarrollo del sistema dopaminérgico nigroestriatal en ratas. *Salud Ment*; 36: 1-8.
- Goodman y Gilman. (2003). *Bases Farmacológicas de la terapéutica*. Mc Graw Hill. 1:455-459. 11o ed. México.
- Gossel M, Schmidt WJ, Loscher W, Zajackowski W, Danysz W. (1995). Effect of coadministration of glutamate receptor antagonists and dopaminergic agonists on locomotion in monoamine-depleted rats. *J Neural Transm-Park.*; 10: 27-39.
- Greenamyre JT, Cannon JR, Drolet R, and Pier-Giorgio M. (2010). Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci.*; 31(4): 141– 142.
- Guillot TS, Shepherd KR, Richardson JR, Wang MZ, Li Y, Emson PC, Miller GW. (2008). Reduced vesicular storage of dopamine exacerbates methamphetamine-induced neurodegeneration and astrogliosis. *J Neurochem.*; 106:2205–2217.
- Guo B, H. S. (2017). Substantial protection against MPTP-associated Parkinson's neurotoxicity in vitro and in vivo by anti-cancer agent SU4312 via activation of MEF2D and inhibition of MAO-B. *Neurpharmacology*, 126:12-24.
- Halbreich U., Kahn L. (2001). Role of estrogen in the etiology and treatment of mood disorders. *CNS Drugs* 15: 797-817.
- Hattori K, Naguro I, Runchel C, Ichijo H. (2009). The roles of ASK family proteins in stress responses and diseases. *Cell Commun Signaling* 7:9.
- Haubenberger D, Reinthaler E, Mueller JC, Pirker W, Katzenschlager R, Froehlich R, Bruecke T, Daniel G, Auff E, Zimprich A. (2001). Association of transcription factor polymorphisms PITX3 and EN1 with Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.*;32(2):302-7
- Heeringa MJ, Abercrombie ED. (1995). Biochemistry of somatodendritic dopamine release in substantia nigra: an in vivo comparison with striatal dopamine release. *J Neurochem.*; 65:192–200.
- Heinze G. (2002). La depresión un fenómeno visual. *Med Int Mex.* 16(6):308-326.
- Hertzmann C, Wiens M, Bowering D, Snow B, Calne D. (1990). Parkinson's disease: a case control study of occupational and environmental risk factors. *Am J Ind Med* 17:349–355.
- Hull EM, Lorrain DS, Du J, Matuszewich L, et al. (1999). Hormone-neurotransmitter interactions in the control of sexual behavior. *Behav Brain Res* ;105:105–116.
- Hunot S, Vila M, Teismann P, Davis RJ, Hirsch EC, Przedborski S, et al. (2004). JNK mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *P Natl Acad Sci-Biol*;101:665-70.

- Hurtado F, C. M. (2016). Parkinson Disease: Etiology, Treatments and Preventive Factors. *Universitas Pshychologica*, 15(5).
- Hwang DY, Fleming SM, Ardayfio P, Moran-Gates T, Kim H, Tarazi FI, Chesselet MF, Kim KS. (2005). 3, 4- dihydroxyphenylalanine reverses the motor deficits in Pitx3-deficient aphakia mice: behavioral characterization of a novel genetic model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* ;25(8):2132-7.
- Hwang M, Lee JM, Kim Y, Geum D. (2014). Functional Role of Parkin against Oxidative Stress in Neural Cells. *Endocrinol Metab.*;29(1):62-69.
- Ibo, M. I. (2007). Evolution of anxiety and depression detected during hospitalization in an Internal Medicine service. *SciELO*, 24-27.
- Igual M.M. (1993). El mundo de la serotonina y sus receptores. Aspectos fisiopatológicos clínicos y terapéuticos. *Med clin.* 101: 4: 144-151.
- Ilkiw JL, K. L. (2018). Dopaminergic Lesion in the Olfactory Bulb Restores Olfaction and Induces Depressive-Like Behaviors in a 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol.*, 1134-1135.
- Inamdar AA, Chaudhuri A, O'Donnell J. (2012). The Protective Effect of Minocycline in a Paraquat-Induced Parkinson's Disease Model in *Drosophila* is Modified in Altered Genetic Backgrounds. *Parkinson's Disease*. 938528.
- Inden M, Kitamura Y, Abe M, Tamaki A, Takata K, Taniguchi T. (2011). Parkinsonian Rotenone Mouse Model: Reevaluation of Long-Term Administration of Rotenone in C57Bl/6 Mice. *Biol Pharm Bull.* 34 (1): 92-96.
- J.O. Adjene,E.B. Ezenwanne. (2008). The effects of chloroquine on the open field locomotion in adult Wistar rats. *Afr Scientist*, 9. 25-30.
- Jackson-Lewis V, Jakowec M, Burke RE, Przedborski S. (1995). Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine. *Neurodegeneration.*;4:257-69.
- Jacobs BL, Azmitia EC. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews*;72:165–229.
- Jacobs BL, Fornal CA. (1993). 5-HT and motor control: a hypothesis. *Trends Neurosci*;16:346–352.
- Javoy F, Sotelo C, Herbet A, Agid Y. (1976). Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.*;102:201-15.
- Jeon B, Jackson-Lewis SV, Burke RE. (1995). 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration.*;4:131-137.

- Jialong Chen, Yixian Ren, Chen Gui, Menglan Zhao, Xian Wu, Kanmin Mao, Wenjun Li & Fei Zou. (2018). Phosphorylation of Parkin at serine 131 by p38 MAPK promotes mitochondrial dysfunction and neuronal death in mutant A53T α -synuclein model of Parkinson's disease. *Cell Death & Disease*. Nature 700: 9.
- Jonsson G. Chemical lesioning techniques: monoamine neurotoxins. (1983). *Handbook of chemical neuroanatomy Methods in chemical neuroanatomy*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. p. 463-507.
- Jun-Fang Chen, Man Wang, Ying-Han Zhuang, and Thomas Behnisch. (2018). Intracerebroventricularly-administered 1-methyl-4-phenylpyridinium ion and brain-derived neurotrophic factor affect catecholaminergic nerve terminals and neurogenesis in the hippocampus, striatum and substantia nigra. *Neuronal Regeneration Research* 13(4): 717-726.
- Kannari K, Tanaka H, Maeda T, Tomiyama M, Suda T, Matsunaga M. (2000). Reserpine pretreatment prevents increases in extracellular striatal dopamine following L-DOPA administration in rats with nigrostriatal denervation. *J Neurochem*; 74 (1): 263-269.
- Katzung Bertram G. (2000). *Farmacología Básica y Clínica*. 8o ed. Manual Moderno. Mexico. pp. 561- 574.
- Kim RH, Smith PD, Aleyasin H, Hayley S, Mount MP, Pownall S. (2005). Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *P Natl Acad Sci Usa*.;102:5215-20.
- Kirk D, Rosenblad C, Burger C, Lundberg C, Johansen Te, Mucyczka N. (2002). Parkinson-Like Neurodegeneration Induced By Targeted Over Expression Of A-Synuclein In The Nigrostriatal System. *J Neurosci*.; 22: 2780-2791.
- Kobinger W. (1984). New concepts on alpha-adrenoceptors in pharmacology. *J Pharmacol*. 15 Suppl. 1:5-22.
- Krakowski AJ. (1963). Treatment of severe depression with desipramine, a metabolite of imipramina. *Am J Psychiatry*. 120:494-6.
- Kudryavtseva, N. N., I. V. Bakshtanovska y L. A. Koryakina. (1991). "Social model of depression in mice of C57BL/6] strain", *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 38, 315-320.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*;219:979-80.
- Langston JW, Forno LS, Rebert CS, Irwin I. (1984). Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4- phenyl-1, 2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Res*.;292:390-4.
- Langston JW, Irwin I, DeLanney LE. (1987). The biotransformation of MPTP and disposition of MPP⁺: the effects of aging. *Life Sci*.; 40:749-754.

- Lawrence M., Tierney Jr., Stephen J., McPhee., and Maxine A., Papadakis. (2006). *Diagnóstico clínico y Tratamiento*. 42o ed. Mc Graw Hill. pp. 230.
- Le W, Sayana P, Jankovic J. (2014). Animal models of Parkinson's disease: a gateway to therapeutics *Neurotherapeutics*; 11(1): 92-110
- Lim SY, Fox SH, Lang AE. (2009). Overview of the extranigral aspects of Parkinson disease. *Arch Neurol* 66:167-172.
- Lins LCRF1, S. M.-J. (2018). Carvacrol prevents impairments in motor and neurochemical parameters in a model of progressive parkinsonism induced by reserpine. *Brain Res Bull.*, 139:9-15.
- López J., Valdés M. (2002). *DSM-IV-TR. Manual Diagnóstico y Estadístico de los Transtornos Mentales*. ed. Masson. México. pp. 387-475
- Luthman J, Fredriksson A, Lewander T, Jonsson G, Archer T. (1989). Effects of amphetamine and methylphenidate on hyperactivity produced by neonatal 6-hydroxydopamine treatment. *Psychopharmacology.*;99: 550–557.
- M. Rappolda P, Cuia M, S. Chessera A, Tibbetta J, C. Grimaa J, Duanc L. (2011). Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3. *P Natl Acad Sci Usa*; 108 (51): 20766–20771.
- Ma J, G. S. (2018). Neuroprotective Effects of Proanthocyanidins, Natural Flavonoids Derived From Plants, on Rotenone-Induced Oxidative Stress and Apoptotic Cell Death in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Front Neurosci.*, 12:369.
- Maes M., Jacobs M-P., Suy E., Minner B., Leclercq C., Christiaens F., Rau J. (1990). Suppressant effects of desamethasone on availability of plasma L-tryptophan and tyrosine in healthy controls and depressed patients. *Act Psychiatr* 81: 19- 23.
- Mandavilli BS, Ali SF, Van-Houten B. (2000). DNA damage in brain mitochondria caused by aging and MPTP treatment. *Brain Res.*;885:45-52.
- Marti MJ, James CJ, Kelly WJ, Burke RE. (1997). Early developmental destruction of terminals in the striatal target induces apoptosis in dopamine neurons of the substantia nigra. *J Neurosci* ;17:2030-9.
- Maser T, R. M. (2017). Tolcapone induces oxidative stress leading to apoptosis and inhibition of tumor growth in Neuroblastoma. *Cancer Med.*, 6(6):1341-1352.
- Matthews M, Bondi C, Torres G, Moghaddam B. (2013). Reduced presynaptic dopamine activity in adolescent dorsal striatum. *Neuropsychopharmacology*. 38(7):1344-51.
- McCall RB, Aghajanian GK. 1979. Serotonergic facilitation of facial motoneuron excitation. *Brain Research*.169:11–27.
- Meana, J.J., Barturen, F. (1995). *Psicoestimulantes: cocaína, anfetaminas y xantinas*. Instituto Deusto de Drogodependencias. *Neuros* 72: 129-139.

- Meredith GE, Sonsalla PK, Chesselet MF. (2008). Animal models of Parkinson's disease progression. *Acta Neuropathol.*;115(4):385-98.
- Miller H., Delgado P., Salomón R., Berman R., Cristal J., Heninger G., Charney D. (1996). Clinical and biochemical effects of catecholamine depletion on antidepressant-induced remission of depression. *Arch Gen Psychiat.* 53: 117-128.
- Monti B, Gatta V, Piretti F, Raffaelli SS, Virgili M, Contestabile A. (2010). Valproic acid is neuroprotective in the rotenone rat model of Parkinson's disease: involvement of alpha-synuclein. *Neurotox Res* 17:130-141.
- Moscoso, M. (2014). El estudio científico del estrés crónico en neurociencias y psicooncología. *Neurosci*, 53-70.
- Mulcahy P, Walsh S, Paucard A, Rea K, Dowd E. (2011). Characterization Of A Novel Model Of Parkinson's Disease By Intra- Striatal Infusion Of The Pesticide Rotenone. *Neuroscience.*; 181: 234– 242.
- Muñoz DG, De Yebenes JG. (2004). The New Mutation, E46K, Of Alpha-Synuclein Causes Parkinson And Lewy Body Dementia. *Ann Neurol.* 2004; 55(2):164- 73.
- Nehling A., Daval JL., Debry G. (1992). Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and effects psychostimulant. *Brain Res rev.* 17(2): 139-147
- Nicklas WJ, Saporito M, Basma A, Geller HM, Heikkila RE. (1992). Mitochondrial mechanisms of neurotoxicity *Ann N Y Acad Sci* 648:28-36.
- Nieto M, Gil-Bea FJ, Dalfo E, Cuadrado M, Cabodevilla F, Sanchez B. (2006). Increased Sensitivity To MPTP In Human Alpha-Synuclein A30P Transgenic Mice. *Neurobiol Aging*; 27:848-56.
- Nisticoo R, Mehdaawy B, Piccirilli S, Mercuri N. (2011). Paraquat and Rotenone-Induced Models of Parkinson's Disease. *Int J of Immunopathol and Pharmacol.* 24 (2): 313-22.
- Nutt DJ. (2002). The neuropharmacology of serotonin and noradrenaline in depression. *Int Clin Psychopharmacol.* 17 Suppl 1:S1-12
- O'Keeffe G, Barker RA, Caldwell MA. (2009). Dopaminergic modulation of neurogenesis in the subventricular zone of the adult brain. *Cell Cycle.* 15:2888-2894.
- Okugawa, G., Nishisawa, S.; Mzengeza, S.; Diksic, M. (1999). Long-term treatment with antidepressants increases glucocorticoid receptor binding and gene expression in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neuroendocrinol.* 11: 887-895.
- Ortiz G, Pacheco-Moisés P, Macías-Islas M, Jiménez-Gil F, Miranda-Díaz A, Flores-Alvarado L. (2011). Toxicidad de plaguicidas y su asociación con la enfermedad de Parkinson. *Arch Neurocién (Mex).*;16 (1): 33-39.

- Pan T, Rawal P, Wu Y, Xie W, Jankovic J, Le W. (2009). Rapamycin protects against rotenone-induced apoptosis through autophagy induction. *Neuroscience* 164:541-551.
- Pan-Montojo F, Anichtchik O, Dening Y, Knels L, Pursche S. (2010). Progression of Parkinson's Disease Pathology Is Reproduced by Intra-gastric Administration of Rotenone in Mice.; *Plos One*. 5(1): e8762.
- Parry R, B. O. (2018). The whole perimeter is difficult": Parkinson's disease and the conscious experience of walking in everyday environments. *Disabil Rehabil*, 19:1-8.
- Peng J, Peng L, Stevenson FF, Doctrow SR, Andersen JK. (2007). Iron and Paraquat as Synergistic Environmental Risk Factors in Sporadic Parkinson's Disease Accelerate Age-Related Neurodegeneration. *J Neurosci.*; 27(26): 6914-6922.
- Pérez-Barrón G, García-Jiménez S, Monroy-Noyola A. (2014). Neuroprotective effect of *Buddleja cordata* methanolic extract in the 1-methyl-4phenylpyridinium Parkinson's disease rat model.
- Porsolt R., Anton G., Blavet N., Jalfre M. (1978). Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J of Pharmacol* 47: 379- 391.
- Porsolt R., Bertin A., Blavet N., Deniel M., Jalfre M. (1979). Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. *Eur J. Pharmacol.* 57: 201-210.
- Porsolt R., Le Pichon M., Jalfre M. (1977). Depression: new model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266: 730- 732.
- Porsolt R., Lenégre A. (1992). Behavioral models of depression. En: Elliot J, Heal D, Maisden C (eds). *Experimental approaches to anxiety and depression*. N. Y. pp. 73-85.
- Porsolt RD, A. Lenégre y R. A. McArthur. (1991). "Pharmacological models of depression", en B. Oliver, J. Mos, J. L. Slangen (eds). *Animal models in Psychopharmacology, Advances in Pharmacological Science*, Basel, Alemani, Birkhäuser., 137-159.
- Porter CC, Totaro JA, Burcin A. (1965). The relationship between radioactivity and norepinephrine concentrations in the brains and hearts of mice following administration of labelled methyl-dopa or 6-hydroxydopamine. *J Pharmacol Exp Ther*; 150: 17-22.
- Pothakos K, Kurz MJ, Lau YS. (2009). Restorative effect of endurance exercise on behavioral deficits in the chronic mouse model of Parkinson's disease with severe neurodegeneration. *BMC Neurosci* 10:16.
- Potter W.Z., Hollister L.E. (2002). Antidepressivos. En Katzung Bertram G. *Farmacología Básica y Clínica*. 8o ed. Manual Moderno. México. pp. 561-574.

- Potter W.Z., Manji H.K., Rudorfer M.V. (1998). Tricyclics and tetracyclics. En: *The American psychiatric press of psychopharmacology*. 2o ed. Washington. pp. 199-218.
- Price MT, Fibiger HC. (1974). Apomorphine and amphetamine stereotypy after 6-hydroxydopamine lesions of the substantia nigra. *Eur J Pharmacol*. 29:249-52.
- Prosser RA, Miller JD, Heller HC. (1990). A serotonin agonist phase-shifts the circadian clock in the suprachiasmatic nuclei in vitro. *Brain Res*. 534:336–339.
- Przedborski S, 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, Levivier M, Jiang H, Ferreira M, Jackson-Lewis V, Donaldson D. (1995). Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience*;67:631-47.
- Przedborski S, Tieu K. (2006). Toxic animal models. In *Neurodegenerative diseases* (ed. Beal MF, et al.), pp. 196–221. Cambridge University Press, Cambridge.
- Przedborski S, 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 N Y Acad Sci* 991:189-198.
- Raju A, Jaisankar P, Borah A, Mohanakumar KP. (2018). 1-Methyl-4-Phenylpyridinium-Induced Death of Differentiated SH-SY5Y Neurons Is Potentiated by Cholesterol. *Ann Neurosci*. 24(4):243-251.
- Raleigh MJ, McGuire MT, Brammer GL, Pollack DB. (1991). Serotonergic mechanisms promote dominance acquisition in adult male vervet monkeys. *Brain Res*. 559:181–190.
- Ramsay RR, Kowal AT, Johnson MK, Salach JI, Singer TP. (1987). The inhibition site of MPP+, the neurotoxic bioactivation product of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine is near the Q-binding site of NADH dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*.;259:645-9.
- Rodríguez-Landa, J.F. y C.M. Contreras. (2000). Los fármacos antidepresivos y la conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado: participación de los sistemas de neurotransmission. *Arch. Neurocién. (Mex.)*, 5, 74-83.
- San L. (1993). Dependencia de anfetaminas. En: Casas, M. Gutierrez, M; San, L. *Adicción a psicofármacos*. Citran. Barcelona. pp. 261- 281.
- Sanchez-Garcia P., Garcia AG., Martinez-Sierra R., Velasco-Martin A. (1997). Inhibition of norepinephrine uptake by phenoxybenzamine and desmethylimipramine in the isolated guinea-pig atrium. *J Pharmacol Exp Ther*. 201(1):192-8.
- Sauer H, Oertel WH. (1994). Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined

- retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience*. 59:401-15.
- Schapira AH, G. M. (1998). Mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Neurol*, S89-98.
- Schapira AH, Olanow AW. (2004). Neuro- protection in Parkinson disease: mysteries, myths, and misconceptions. *JAMA* 291:358- 364.
- Schildknecht S, Pörtl D, Nagel DM, Matt F, Scholz D, Lotharius J, Schmieg N, Salvo-Vargas A, Leist M. (2009). Requirement of a dopaminergic neuronal phenotype for toxicity of low concentrations of 1-methyl-4-phenyl- pyridinium to human cells. *Toxicol Appl Phar- macol* 241:23-35.
- Schildkraut J. (1973). Norepinephrine metabolites as biochemical criteria for classifying depressive disorders and predicting response to treatment. Preliminary findings. *Am J Psychiat* 130: 6955- 6999.
- Schmidt N, F. B. (2001). Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, 108(11):1263-82.
- Schmidt N, Ferger B. (2001). Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *J Neural Transm.*;108:1263-82.
- Sedelis M, Hofele K, Auburger GW, Morgan S, Huston JP, Schwarting RK. (2000). MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. *Behav Genet.*;30: 171- 182.
- Shapira B., Cohen J., Newman M., Lerer B. (1993). Prolactin response to fenfluramine and placebo challenge following maintenance pharmacotherapy withdrawal in remitted depressed patients. *Biol. Psychiat*. 33: 531-535.
- Simola N, Morelli M, Carta AR. (2007). The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox Res.*; 1:151-167.
- Singer TP, Castagnoli N, Ramsay RR, Trevor AJ. (1987). Biochemical events in the development of parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine. *J Neurochem.* ;49(1):1-8.
- Singh N, Agrawal M, Doré S. (2013). Neuroprotective Properties and Mechanisms of Resveratrol in *in Vitro* and *in Vivo* Experimental Cerebral Stroke Models. *ACS ChemNeurosci*. 4(8): 1151–1162.
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J. (2003). Alpha-Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease. *Science.*; 302(5646):841.
- Sonsalla, P.K. (1995). The role of N-methyl-D-Aspartate receptor in dopaminergic neuropathology produced by the amphetamines. *Drug Alcohol Depend*. 37: 101-105.

- Stahl S. (1998). Basic psychopharmacology of antidepressants. Part 1: antidepressants have seven distinct mechanisms of action. *J Clin Psychiat* 59: 5-14.
- Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Arigo SM, Takahashi K, Arigo H. (2004). DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *Embo Rep.* 5:213-8.
- Tanner C, Kamel F, Webster-Ross G, Hoppin J, Goldman S, Korell M. (2011). Rotenone, Paraquat and Parkinson's Disease. *Environ Health Persp.* 119(6): 866-872.
- Tatton NA, Kish SJ. (1997). In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining. *Neuroscience.*;77:1037-48.
- Teng M, Meng-Shan T, Jin-Tai Y, Lan Tan. (2014). Resveratrol as a Therapeutic Agent for Alzheimer's Disease.
- Tieu K. (2011). A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Csh Perspect Med.*; 1(1): a009316.
- Torres E., Gainetdinov R., Caron M. (2003). Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Neuroscience* 4: 13-22.
- Toulouse A, Sullivan A. (2008). Progress in Parkinson's disease where do we stand? *Prog Neurobiol* 85:376-392.
- Trueta C, C. M. (2012). Regulación de la liberación de serotonina en distintos compartimientos neuronales. *Salud Mental SciELO*, 435-443.
- Ungerstedt. U. (1968). 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol*; 5: 107-110.
- Utrilla P. (2000). Aspectos farmacológicos de anfetamina. *Ars pharma.* 41(1); 67-7.
- Van-der-Mark M, Brouwer M, Kromhout H, Nijssen P, Huss A, and Vermeulen R. (2012). Is Pesticide Use Related to Parkinson Disease? Some Clues to Heterogeneity in Study Results. *Environ Health Persp.*; 120(3): 340-347.
- Velázquez P. Lorenzo, Moreno A., Leza J.C., Lizasoain I., Moro M.A. (1998). *Farmacología Básica y Clínica.* 17ed. Panamericana ed. Mexico. pp. 205-2013.
- Vélez AH., Rojas W., Borrero J., Restrepo J. (1991). *Fundamentos de Medicina.* 3o ed. Masson ed. Mexico. pp. 131-140.
- Vila M, Vukosavic S, Jackson-Lewis V, Neystat M, Jakowec M, Przedborski S. (2000). Alpha-synuclein up-regulation in substantia nigra dopaminergic neurons following administration of the parkinsonian toxin MPTP. *J Neurochem.*;74:721-9.
- Volles MJ, Lansbury PT Jr. (2003). Zeroing In On The Pathogenic Form Of Alpha-Synuclein And Its Mechanism Of Neurotoxicity In Parkinson's Disease. *Biochemistry.*; 42: 7871-7878.

- Wang X, Su B, Liu W, He X, Gao Y, Castellani R, Perry G, Smith M, Zhu X. (2011). DLP1-Dependent Mitochondrial Fragmentation Mediates 1-methyl-4-phenylpyridinium Toxicity in Neurons: Implications for Parkinson's Disease. *Aging Cell*. 10(5): 807–823.
- Weiger WA. (1997). Serotonergic modulation of behavior: a phylogenetic overview. *Biol Rev Camb Philos Soc*; 72:61–95.
- Weiss J. M., Simson P.G., Hoffman L.J., Ambrose L., Cooper S., Webster A. (1986). Infusion of adrenergic receptor agonists and antagonists into the locus coeruleus and ventricular system of the brain. *Neuropharma*. 25(4): 367-384.
- Weiss J. M., West K.H.C. (1998). Selective breeding of rats for high and low motor activity in a swim test: toward a new animal model of depression. *Pharma. Biochem. Behavior*. 16(1): 49-66.
- West K.H.C., Weiss J.M. (1998). Effects of antidepressant drugs on rats bred for low activity in the Swim Test. *Activity in a Swim Test: Toward a New animal model of depression. Pharma. Biochem. Behavior*. 16(1): 67-79.
- Woitalla D, D. A. (2018). A noninterventional study evaluating the effectiveness of rotigotine and levodopa combination therapy in younger versus older patients with Parkinson's disease. *Expert Opin Pharmacother.*, 19:1-9.
- Xiong N, Xiong J, Jia M, Liu L, Zhang X, Chen Z. (2013). The role of autophagy in Parkinson's disease: rotenone-based modeling. *Behavioral and Brain Functions*. 9:13.
- Xu J, Kao SY, Lee FJ, Song W, Jin LW, Yankner Ba. (2002). Dopamine-Dependent Neurotoxicity of α -Synuclein: A Mechanism for Selective Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Nat Med.*; 8:600-606.
- Yuan J, Cord BJ, McCann UD, Callahan BT, Ricaurte GA. (2002). Effect of depleting vesicular and cytoplasmic dopamine on methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity. *J Neurochem*. 80: 960–969.
- Yuan J, Darvas M, Sotak B, Hatzidimitriou G, McCann UD, Palmiter RD, Ricaurte GA. (2010). Dopamine is not essential for the development of methamphetamine-induced neurotoxicity. *J Neurochem.*; 114: 1135-1142.
- Zangrossi H Jr, Viana MB, Zanoveli J, Bueno C. (2001). Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. *Neurosci Biobehav Rev* ;25:637–645.
- Zeng X, G. W. (2018). Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. *ASN Neuro*.
- Zeng XS, G. W. (2018). Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. *ASN Neuro*.

- Zhang PL, W. Y. (2018). The efficacy of homemade tolcapone in the treatment of patients with Parkinson's disease. *Exp Ther Med.*, 15(1): 127-130.
- Zhang X, Zhou JY, Chin MH, Schepmoes AA, Petyuk VA, Weitz KK, Petritis BO, Monroe ME, Camp DG, Wood SA, Melega WP, Bigelow DJ, Smith DJ, Qian WJ, Smith RD. (2010). Region specific protein abundance changes in the brain of MPTP induced Parkinson's disease mouse model. *J Proteome Res* 9:1496-1509.
- Zhaohui L, Tianxia L, Dejun Y, Wanli WS. (2013). Curcumin protects against rotenone induced neurotoxicity in cell and drosophila models of Parkinson's disease. *Adv Behav Biol.* (1): 18-27.
- Zhou H, Huang C, Tong J, Xia XG. (2011). Early Exposure to Paraquat Sensitizes Dopaminergic Neurons to Subsequent Silencing of PINK1 Gene Expression in Mice. *Int J Biol Sci.*; 7(8):1180-1187.
- Zhu XR, Maskri L, Herold C, Bader V, Stichel CC, Güntürkün O, Lübbert H. (2007). Non-motor behavioral impairments in parkin-deficient mice. *Eur J Neurosci.*;26(7):1902-11.
- Zhu, M.Y., Toru, M.; Kurumaji, A.; Ishimaru, M. (1998). Down-regulation of the human norepinephrine transporter in intact 293-hNET cells exposed to desipramine. *J. Neurochem.* 70: 1547-1555.
- Zomkowski A., Santos A., Rodriguez A. (2005). Evidence for the involvement of the opioid system in the agmatine antidepressant-like effect in the forced swimming test. *Neurosc.* 381: 279- 283.



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Katia Dinorah Sánchez González

Título de la tesis: "EFECTO DEL HIDROXITIROSONOL SOBRE LOS NIVELES DE DOPAMINA Y RECUPERACIÓN FUNCIONAL EN EL MODELO DE NADO FORZADO DE RATAS TRATADAS CON MPP"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. German Bernal Fernández

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Firma del miembro del jurado Fecha

Firma del miembro de jurado

08/06/2018

Fecha



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM



Nombre del alumno: Katia Dinorah Sánchez González

Título de la tesis: "EFECTO DEL HIDROXITIROSOLO SOBRE LOS NIVELES DE DOPAMINA Y RECUPERACIÓN FUNCIONAL EN EL MODELO DE NADO FORZADO DE RATAS TRATADAS CON MPP"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Sergio Montes López

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Firma del miembro del jurado Fecha

Firma del miembro de jurado

8 Junio 2018

Fecha



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**



Nombre del alumno: Katia Dinorah Sánchez González

Título de la tesis: "EFECTO DEL HIDROXITIROSONOL SOBRE LOS NIVELES DE DOPAMINA Y RECUPERACIÓN FUNCIONAL EN EL MODELO DE NADO FORZADO DE RATAS TRATADAS CON MPP**"

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Firma del miembro del jurado Fecha

Firma del miembro de jurado

11/Junio/2018
Fecha



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Katia Dinorah Sánchez González

Título de la tesis: "EFECTO DEL HIDROXITIROSOLO SOBRE LOS NIVELES DE DOPAMINA Y RECUPERACIÓN FUNCIONAL EN EL MODELO DE NADO FORZADO DE RATAS TRATADAS CON MPP⁺"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Pedro Iván Pérez Neri

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Firma del miembro del jurado Fecha


Firma del miembro de jurado

11 de junio del 2018
Fecha



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM



Nombre del alumno: Katia Dinorah Sánchez González

Título de la tesis: "EFECTO DEL HIDROXITIROSOLO SOBRE LOS NIVELES DE DOPAMINA Y RECUPERACIÓN FUNCIONAL EN EL MODELO DE NADO FORZADO DE RATAS TRATADAS CON MPP"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. María de Lourdes Rodríguez Fragoso

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Firma del miembro del jurado Fecha

Firma del miembro de jurado

25 Enero 2019

Fecha