

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**Posgrado en Ciencias Químicas**

Maestría en Ciencias Químicas

Área de Bioquímica y Biología Molecular

---



**Laboratorio de Neurofarmacología**

*Efecto del tratamiento con el fragmento C-terminal de la toxina tetánica más el pramipexol sobre el estrés oxidante y las conductas motoras en ratas hemiparkinsonianas*

**T E S I S**

Que para obtener el Grado de  
Maestro en Ciencias Químicas  
en al área de Bioquímica y Biología Molecular

**P R E S E N T A**

MVZ. Felipe Patricio Martínez

**DIRECTORES**

Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León

Profesor-Investigador FCQ-BUAP

Dra. Liliana Martínez Mendieta

Profesora-Investigadora FCQ-BUAP

**H. Puebla de Zaragoza a Noviembre de 2017**



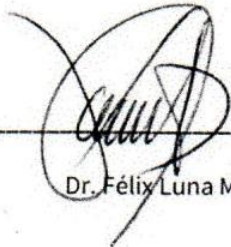
**BUAP**

**A QUIEN CORRESPONDA:**

Por este conducto la Comisión Revisora formada por el Dr. Félix Luna Morales, Dra. Tania Ávila Ruiz, Dra. Francisca Pérez Severiano y la Dra. María Isabel Martínez García, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **Efecto del tratamiento con el fragmento C-terminal de la toxina tetánica más el pramipexol sobre el estrés oxidante y las conductas motoras en ratas hemiparkinsonianas**, que presenta el alumno **Felipe Patricio Martínez** para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los diez días del mes de noviembre del año dos mil diecisiete.

**ATENTAMENTE**



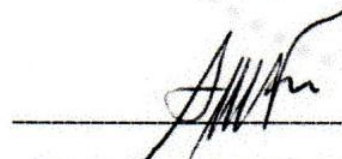
Dr. Félix Luna Morales



Dra. Tania Ávila Ruiz



Dra. Francisca Pérez Severiano

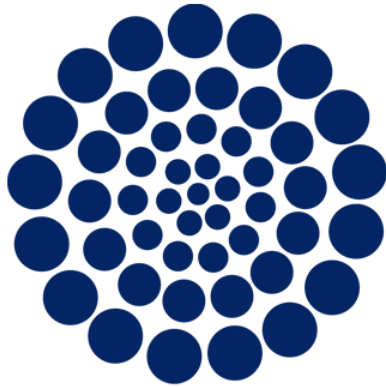


Dra. María Isabel Martínez García

**80** AÑOS  
**DE UNIVERSIDAD**

Posgrado en Ciencias Químicas  
Facultad de Ciencias Químicas  
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio FCQ 10,  
Ciudad Universitaria  
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570  
01 (222) 229 55 00 Ext. 7397  
posgrado.quimica@correo.buap.mx



**CONACYT**

*Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología*

El sustentante del presente trabajo fue financiado

con el número de becario No: **581481**

Otorgado por el Consejo nacional de Ciencia y tecnología

Durante el periodo 2015-2017



Los experimentos conductuales e inmunohistoquímicos se realizaron en el Laboratorio de Neurofarmacología bajo la  
Dirección del

Dr. I. Daniel Limón Pérez de León y la

Dra. Liliana Martínez Mendieta



Los experimentos bioquímicos se realizaron en el Laboratorio de Neuroquímica bajo la asesoría de la Dra. Francisca Pérez Severiano y el Dr. Sergio Montes López del

**Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía**

**“Manuel Velasco Suárez”**



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

El fragmento C-terminal de la toxina tetánica fue donado por el Dr. José Aguilera Ávila de la **Universitat Autònoma de Barcelona**, España

**A LA BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

La institución que me ha formado desde la Licenciatura a la  
presente Maestría

**A LA COMISIÓN REVISORA DEL PRESENTE  
TRABAJO**

Un agradecimiento especial por el aporte de los comentarios,  
correcciones y dedicación en el tiempo para revisar el presente  
trabajo

**MC. Félix Luna Morales**

**Dra. Tania Ávila Ruiz**

**Dra. Francisca Pérez Severiano**

**Dra. Isabel Martínez García**

## INDICE

<b>Abreviaturas</b>		<b>i</b>
<b>Resumen</b>		<b>iv</b>
<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1	Vías dopaminérgicas: vía nigro-estriatal	1
1.2	Neuroquímica de la vía nigro-estriatal	3
1.2.1	Estructura y sitios de modulación de la tirosina hidroxilasa	6
1.3	Circuitaría de los ganglios basales y la ejecución motora	7
1.4	La Enfermedad de Parkinson	9
1.5	Estrés oxidante	10
1.5.1	Peroxidación de lípidos	11
1.6	Enzimas antioxidantes	12
1.6.1	Superóxido dismutasa Cu/Zn	14
1.6.2	Superóxido dismutasa Mn	14
1.7	Modelos animales para el estudio de la Enfermedad de Parkinson.	15
1.7.1	Utilidad de la 6-hidroxidopamina	16
1.7.2	La 6-hidroxidopamina y el estrés oxidante	17
1.8	Agonistas dopaminérgicos	18
1.8.1	El pramipexol	19
1.8.2	El pramipexol, su efecto neuroprotector y antioxidante	21
1.9	La toxina tetánica y la estructura del dominio C-terminal de la cadena pesada	22
1.9.1	Unión molecular del fragmento C-terminal de la toxina tetánica con la membrana celular	24
1.9.2	Transporte retrogrado axonal del fragmento C-terminal de la toxina tetánica	24
1.9.3	El fragmento C-terminal de la toxina tetánica, la supervivencia celular y la neuroprotección	25
<b>II.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>28</b>
<b>III.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>29</b>
<b>IV.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
4.1	Objetivo General	29
4.2	Objetivos Particulares	29
<b>V.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>30</b>
5.1	Diagrama de trabajo	31
5.2	Sujetos de experimentación	31
5.3	Preparaciones de sustancias a administrar	31
5.3.1	Fragmento Hc-TeTx	31
5.3.2	Pramipexol	31
5.4	Cirugía estereotáxica	31
5.5	Modelos conductuales	32
5.5.1	Modelo del cilindro	32
5.5.2	Modelo de la viga	33
5.5.3	Cajas de actividad motora en campo cerrado	33
5.6	Pruebas bioquímicas	34
5.6.1	Obtención de cerebro y extracción de núcleos	34
5.6.2	Determinación de las especies reactivas de oxígeno	35
5.6.3	Determinación de la Peroxidación lipídica	36



	<b>5.6.4</b>	Determinación de la Actividad de la SOD	<b>37</b>
	<b>5.6.5</b>	Determinación de proteínas por el método del ácido bicinconínico	<b>37</b>
	<b>5.7</b>	Determinación de tirosina hidroxilasa en Estriado y SNpc por inmunohistoquímica	<b>38</b>
	<b>5.7.1</b>	Técnica para cuantificación de imágenes por densidad óptica	<b>39</b>
	<b>5.7.2</b>	Técnica para cuantificación de imágenes por número de células positivas a TH	<b>40</b>
	<b>5.8</b>	Análisis estadístico	<b>40</b>
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS</b>		<b>41</b>
	<b>6.1</b>	Localización del sitio de lesión en el estriado	<b>41</b>
	<b>6.2</b>	Efecto de la co-administración del fragmento C-terminal de la toxina tetánica más el pramipexol sobre la asimetría motora en ratas hemiparkinsonianas	<b>42</b>
	<b>6.3</b>	Efecto de la co-administración del fragmento C-terminal de la toxina tetánica más el pramipexol sobre la coordinación motora de ratas hemiparkinsonianas	<b>44</b>
	<b>6.4</b>	Efecto de la co-administración del fragmento C-terminal de la toxina tetánica más el pramipexol sobre la actividad locomotora en ratas hemiparkinsonianas	<b>47</b>
	<b>6.5</b>	Efecto de la co-administración del fragmento C-terminal de la toxina tetánica más el pramipexol sobre la inmunorreactividad para tirosina hidroxilasa en la SNpc y el estriado	<b>50</b>
	<b>6.6</b>	Efecto del fragmento C-terminal de la toxina tetánica más el pramipexol sobre las especies reactivas de oxígeno en estriado y corteza frontal ipsilateral a la lesión	<b>54</b>
	<b>6.7</b>	Efecto del fragmento C-terminal de la toxina tetánica más el pramipexol sobre las peroxidación lipídica en estriado y corteza frontal ipsilateral a la lesión	<b>54</b>
	<b>6.8</b>	Efecto de la co-administración del fragmento C-terminal de la toxina tetánica más el pramipexol sobre la actividad de la superóxido dismutasa	<b>56</b>
<b>VII.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>		<b>59</b>
<b>VIII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>		<b>64</b>
<b>IX.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>		<b>65</b>
<b>X.</b>	<b>REFERENCIAS</b>		<b>66</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Esquema de la distribución de los grupos dopaminérgicos en el cerebro de rata adulta	<b>1</b>
<b>Figura 2</b>	Organización neuroanatómica de la SNpc	<b>2</b>
<b>Figura 3</b>	Organización neuroanatómica del estriado	<b>3</b>
<b>Figura 4</b>	Síntesis y liberación de la dopamina	<b>4</b>
<b>Figura 5</b>	Vía de señalización intracelular de los receptores dopaminérgicos	<b>5</b>
<b>Figura 6</b>	Esquema del dominio catalítico de la tirosina hidroxilasa	<b>6</b>
<b>Figura 7</b>	Estructura proteica de la tirosina hidroxilasa y sitios de fosforilación	<b>7</b>
<b>Figura 8</b>	Circuitería de los ganglios basales	<b>8</b>
<b>Figura 9</b>	Peroxidación de lípidos de la membrana celular	<b>12</b>
<b>Figura 10</b>	Reacción de la dismutación del anión superóxido mediado por la SOD	<b>13</b>
<b>Figura 11</b>	Mecanismo de toxicidad de la 6-hidroxidopamina	<b>18</b>
<b>Figura 12</b>	Mecanismo de acción del pramipexol	<b>20</b>
<b>Figura 13</b>	Estructura de la toxina tetánica	<b>23</b>
<b>Figura 14</b>	Vía de señalización del fragmento Hc-TeTx	<b>26</b>
<b>Figura 15</b>	Modelo del cilindro para evaluar asimetría motora	<b>32</b>
<b>Figura 16</b>	Modelo de la viga para evaluar la coordinación motora	<b>33</b>
<b>Figura 17</b>	Evaluación de la actividad motora en cajas de actividad motora en campo cerrado	<b>34</b>
<b>Figura 18</b>	Planos anatómicos para la extracción de núcleos	<b>35</b>
<b>Figura 19</b>	Curva de calibración de ROS	<b>36</b>
<b>Figura 20</b>	Curva de calibración de proteínas	<b>38</b>
<b>Figura 21</b>	Localización del sitio de lesión en el estriado dorsal de rata	<b>41</b>
<b>Figura 22</b>	Porcentaje de uso de ambas patas	<b>43</b>
<b>Figura 23</b>	Porcentaje de uso de la pata ipsilateral a la lesión	<b>44</b>
<b>Figura 24</b>	Evaluación previa a la lesión de la latencia para cruzar la viga	<b>45</b>
<b>Figura 25</b>	Evaluación post-lesión de la latencia para cruzar la viga	<b>46</b>
<b>Figura 26</b>	Evaluación post-lesión del número de pasos realizados para atravesar la viga	<b>47</b>
<b>Figura 27</b>	Inmunorreactividad para TH en el estriado ipsilateral a la lesión	<b>50</b>
<b>Figura 28</b>	Inmunorreactividad para TH en la SNpc ipsilateral y contralateral a la lesión.	<b>52</b>
<b>Figura 29</b>	Magnificación de las fotomicrografías de inmunorreactividad a TH en la SNpc.	<b>53</b>
<b>Figura 30</b>	Cuantificación de la inmunorreactividad a la TH en la SNpc y estriado ipsilateral	<b>53</b>
<b>Figura 31</b>	Determinación del daño oxidante post-lesión y con el co-tratamiento en el estriado de rata	<b>55</b>
<b>Figura 32</b>	Determinación de la actividad de la SOD post-lesión y con el co-tratamiento en el estriado de rata	<b>57</b>



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Características bioquímicas de los receptores dopaminérgicos	<b>1</b>
<b>Tabla 2</b>	Principales oxidantes endógenos	<b>2</b>
<b>Tabla 3</b>	Características de las tres isoformas de SOD	<b>3</b>
<b>Tabla 4</b>	Evaluación de la actividad locomotora previos a la lesión	<b>48</b>
<b>Tabla 5</b>	Evaluación de los movimientos totales 14 y 29 días post-lesión	<b>50</b>
<b>Tabla 6</b>	Evaluación de los desplazamientos totales 14 y 29 días post-lesión	<b>50</b>
<b>Tabla 7</b>	Evaluación de los erguidos totales 14 y 29 días post-lesión	<b>50</b>

## ABREVIATURAS

·OH	Radical hidroxilo
HNE	4-hidroxi-2,3-nonenal
6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
AC	Adenilato ciclasa
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BH4	Tetrahidrobiopterina
BHE	Barrera hematoencefálica
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
CaMKII	Calmodulina cinasa II
CAT	Catalasa
CL	Cuerpos de Lewy
CPu	Caudado-Putamen
CxF	Corteza frontal
DA	Dopamina
DARPP-32	Fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc
DAT	Transportador de dopamina
DCAA	Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
DCF-DA	Diclorofluoresceína diacetato
DCF	Diclorofluoresceína
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
EO	Estrés oxidante
EP	Enfermedad de Parkinson
ERK	Cinasa a respuesta extracelular



---

Fe <sup>2+</sup>	Hierro
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GB	Ganglios Basales
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
GPI	Globo Pálido interno
GPe	Globo Pálido externo
GPX	Glutación peroxidasa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico
Hc-TeTx	Dominio C-terminal de la toxina tetánica
HOO·	Radical hidroperoxilo
HVA	Ácido homovanílico
L-DOPA	L-3,4-hidroxifenilalanina
MAO-B	Monoamino oxidasa B
MDA	Malondialdehído
MPP <sup>+</sup>	1-metil-4-fenilpiridinium
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NAc	Núcleo <i>accumbens</i>
NEG	Neuronas espinonas grandes
NEM	Neuronas espinosas medianas
NGA	N-acetil-galactosamina
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NST	Núcleo subtalámico
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Anión superóxido
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito



---

p75 <sup>NTR</sup>	Receptor a neurotrofinas de 75 kDa
PKA	Proteína cinasa dependiente de AMPc
PLC	Fosfolipasa C
PPX	Pramipexol
RL	Radicales libres
ROO·	Radical peroxilo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RRF	Área retrorubral
SNARE	Factor soluble de unión al receptor
SNpc	Sustancia <i>nigra pars compacta</i>
SNpr	Sustancia <i>nigra pars reticulada</i>
SOD Cu/Zn	Superóxido dismutasa cobre/zinc
SOD Fe	Superóxido dismutasa hierro
SOD Mn	Superóxido dismutasa manganeso
SOD	Superóxido dismutasa
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
TeTx	Toxina tetánica
TH	Tirosina hidroxilasa
Trk	Receptor tirosina cinasa
VMAT-2	Transportador vesicular de monoaminas tipo-2
VTA	Área tegmental ventral
XO	Xantina oxidasa
Zn <sup>2+</sup>	Zinc

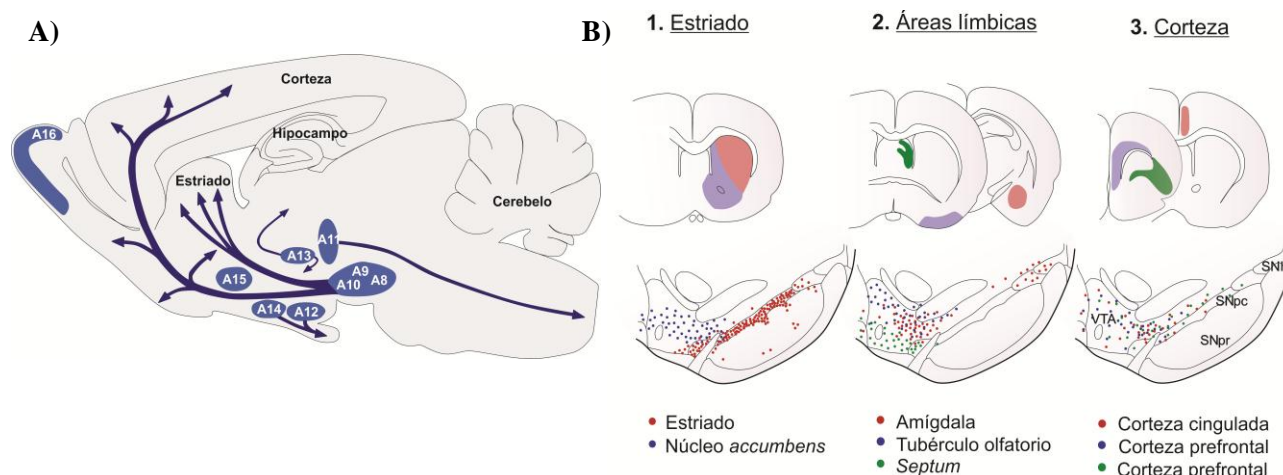
## RESUMEN

La 6-OHDA es un neurotóxico altamente oxidante utilizado para inducir muerte neuronal progresiva en roedores. Experimentalmente se ha utilizado el PPX, un agonista con alta selectividad por los receptores D3, como neuroprotector por tener actividad antioxidante en cerebros de ratas hemiparkinsonianas. Así mismo, se ha propuesto al fragmento Hc-TeTx como un péptido con acción neurotrófica por activar vías de señalización de los receptores Trk, y que administrado periféricamente puede llegar hasta el SNC. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la administración del fragmento Hc-TeTx más el PPX sobre las conductas motoras y el estrés oxidante en ratas hemiparkinsonianas. Se emplearon ratas macho Wistar a los que se les administró 6-hidroxidopamina o su vehículo (ácido ascórbico 0.02%) de forma unilateral en el estriado por cirugía estereotáxica y a las 24 horas se inició el co-tratamiento de Hc-TeTx (20 µg/kg i.m.) por 3 días y PPX (1 mg/kg c/12 horas v.o.) durante un mes. Las conductas motoras de locomoción, asimetría y coordinación se evaluaron a la mitad y al final del tratamiento. Posteriormente, el día 31 post-lesión los animales se sacrificaron para la obtención del tejido estriatal y la determinación de las ROS, LPX, actividad de la SOD-Cu/Zn y SOD-Mn. Además, se analizó la inmunorreactividad de la Tirosina hidroxilasa (TH) en el estriado y SNpc por inmunohistoquímica. Los resultados muestran que el tratamiento con el fragmento Hc-TeTx más el PPX proporcionan una mejora significativa en la asimetría y la coordinación motora posterior a la lesión dopaminérgica. Los resultados obtenidos sugieren que no se produce un efecto potenciador con el co-tratamiento del Hc-TeTx y el PPX. En contraste a lo anterior, no se encontraron modificaciones en la conducta locomotora en los diferentes grupos experimentales. Al evaluar el proceso oxidativo a través de los niveles de las ROS y la LPX en el estriado, se encontró que la 6-OHDA incrementó el daño oxidativo a los 30 días post-lesión. A pesar de los efectos que causa la 6-OHDA, en el grupo tratado con el fragmento Hc-TeTx más el PPX disminuyen los niveles de ROS, así como de LPX en el estriado ipsilateral. Al examinar los tratamientos de Hc-TeTx y PPX de forma independiente se encontró una reducción en los niveles de ROS y LPX. Mientras que de la actividad antioxidante de la SOD no se modificó posterior a la lesión dopaminérgica en ninguno de los grupos experimentales. Además, se encontró que el co-tratamiento con el fragmento Hc-TeTx más el PPX causó un beneficio importante sobre la inmunorreactividad TH estriatal, así como en las neuronas de la SNpc. A pesar de ello los tratamientos con Hc-TeTx más el PPX de forma independiente causaron mejorías similares sobre la inmunorreactividad para la TH en el estriado y la SNpc. En conclusión se propone que tanto el co-tratamiento con fragmento Hc-TeTx más el PPX, como el tratamiento con Hc-TeTx o PPX poseen actividad antioxidante. Además, el tratamiento con ambos fármacos mejora las conductas motoras como la coordinación y asimetría motora de ratas hemiparkinsonianas.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Vías dopaminérgicas: vía nigro-estriatal

Las primeras investigaciones sobre la distribución y agrupación de neuronas catecolaminérgicas en la rata fueron hechas por Dahlström y Fuxe en 1964 por medio de la técnica de histofluorescencia con vapores de formaldehído. Dahlström y Fuxe asignaron centros para crear una nueva nomenclatura, cada grupo fue asignado con la inicial “A” seguido de un número indicativo por grupo. Por lo tanto, la nomenclatura A1-A7 se asignó para los centros noradrenérgicos y A8-A12 para los centros dopaminérgicos. Esta nomenclatura se ha conservado hasta la fecha y ha sido útil en la investigación para el estudio de patologías que afectan las vías dopaminérgicas (Figura 1A).

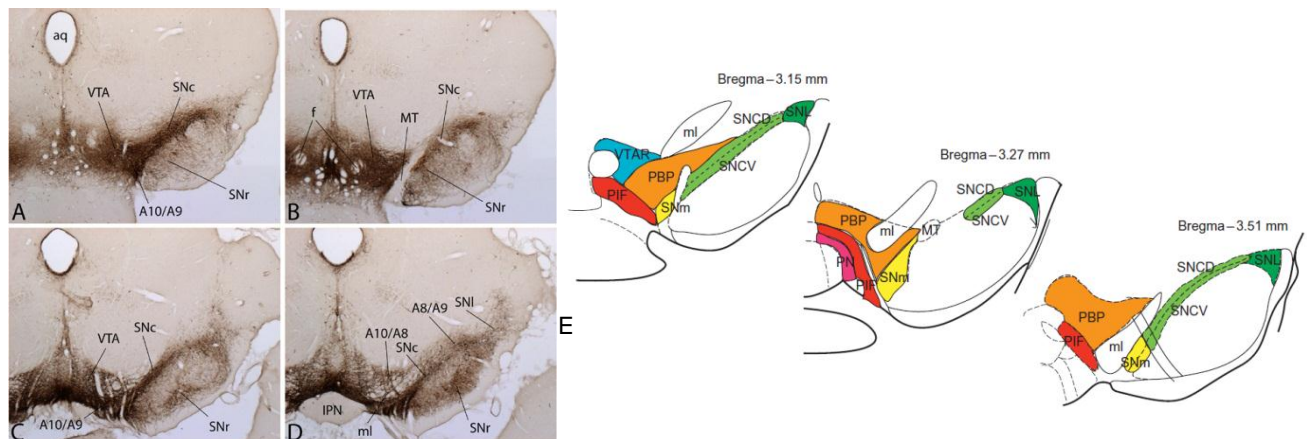


**Figura 1. Esquema de la distribución de los grupos dopaminérgicos en el cerebro de rata adulta.** A) Las neuronas dopaminérgicas están distribuidas en nueve grupos neuronales en el mesencéfalo y el bulbo olfatorio como se muestra en el presente dibujo en una vista sagital. B) Las neuronas dopaminérgicas proyectan al 1. Estriado, 2. Áreas límbicas y 3. Corteza. Las neuronas situadas a nivel ventral de la SNpc [puntos rojos en a) (dibujo inferior)] inervan en su mayor cantidad a la zona sensoriomotora del estriado dorsal [área roja en a) (dibujo superior)]. Las neuronas a nivel dorsal de la SNpc y en el VTA proyectan ampliamente a las regiones del prosencéfalo tanto límbico como cortical como se ilustra en 2 y 3 respectivamente. (Tomado y modificado por Björklund y Dunnet, 2007).

Fallón y Moore en 1978 reportaron las proyecciones neuronales del mesencéfalo ventral para los grupos del A8 (área retrorubral; RRF), A9 (Sustancia nigra pars compacta; SNpc) y A10 (Área tegmental ventral; VTA). Las proyecciones de la SNpc y del VTA no se mantienen anatómicamente separados, es decir, la inervación dopaminérgica estriatal no solo proviene de la SNpc sino también del VTA y del RRF. Las vías que proyectan las áreas A8, A9 y A10 son la vía nigro-estriatal, la vía mesolímbica y la vía mesocortical, así como las proyecciones hacia el prosencéfalo (Moore y Bloom 1978; Hung y Lee 1998) (Figura 1B).

La SNpc es un núcleo del mesencéfalo constituido por neuronas dopaminérgicas que se compone aproximadamente de 7,200 neuronas dopaminérgicas en la rata (Oorschot, 1996). Estas neuronas se extienden

lateralmente desde el VTA y dorsalmente a la Sustancia *nigra pars reticulata* (SNpr) (Hebb y Robertson, 2000). Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc se localizan lateralmente del VTA y dorsalmente de la SNpr. El análisis morfológico realizado en cortes histológicos coronales con orientación rostral-caudal identifica diferentes aspectos de los núcleos dopaminérgicos de las neuronas A8, A9 y A10. Se han descrito a las neuronas de la SNpc con dendritas orientadas horizontalmente y a las neuronas del VTA con una capa densa de células ventrales cuya arborización dendrítica se orientan verticalmente y descienden hasta la SNpr (Yetnikoff y cols, 2014) (Figura 2A-E). Las proyecciones de las neuronas de la SNpc se dirigen en un sistema de fibras conocida como el haz medial del cerebro anterior (MFB) con dirección al prosencéfalo. Conforme asciende la vía nigral, los axones arborizan en menor proporción al núcleo subtalámico (NST) y posteriormente proyecta al globo pálido (GP) hasta llegar al objetivo final, el núcleo estriado (Smith y Kieval, 2000; Yetnikoff y cols., 2014).

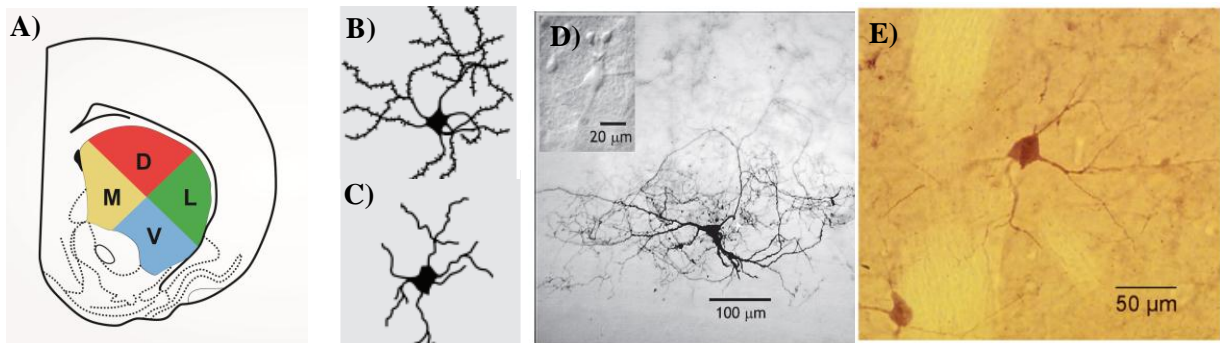


**Figura 2. Organización neuroanatómica de la SNpc.** Fotomicrografías que ilustran secciones del mesencéfalo de rata en secuencia rostro-caudal. **A)** corte coronal de la porción rostral de las áreas A10 (área tegmental ventral) y A9 (sustancia nigra pars compacta). **B)** La SNpc se reduce en tamaño en comparación de las demás áreas, se observa una división entre el ATV y la SNpc por el tracto mamilotalámico (MT). En **C)** y **D)** se observa una inervación densa en la SNpr (Tomado de Yetnikoff y cols 2014). **E)** Esquematación de la subdivisión de la SNpc se puede diferenciar la sustancia *nigra pars compacta* dorsal (SNCD), sustancia *nigra pars compacta* ventral (SNCV), sustancia pars compacta medial (SNm) así como la subdivisión del ATV (Tomado de Subramaniam y Roeper 2010).

La diferencia anatómica del cuerpo estriado, tanto en los roedores como en los primates (humanos y no humanos) es visualizada por la ausencia de la cápsula interna que divide el núcleo caudado y el putamen. Por esta razón, dicha estructura anatómica se le ha denominado también como “complejo caudado-putamen” (CPu). El cuerpo estriado está constituido por dos núcleos cerebrales: el complejo CPu (localizado dorsalmente) y el NAc (localizado ventralmente). La nomenclatura de la división morfológica en el estriado dorsal se ha utilizado como lo reporta Deumens y colaboradores en el 2002, ellos esquematizan las regiones del estriado que corresponden al complejo CPu. El estriado dorsal de la rata se divide en cuatro regiones: dorsal, ventral, lateral y medial. La región ventrolateral podría ser el equivalente al putamen debido a la

inervación de la corteza motora y sensoriomotora, así como de la innervación exclusiva de la SNpc (Kirik y cols., 1998), La región dorsomedial podría ser el equivalente al caudado debido a la innervación mixta, que innervan las células dopaminérgicas de la SNpc y del ATV y la innervación glutamatérgica de la corteza frontal (CxF). La región dorsomedial modula la locomoción, mientras que la región ventrolateral modula la iniciación de los movimientos, la orientación sensoriomotora y el comportamiento motorizado (Figura 3A).

Las neuronas que forman principalmente al cuerpo estriado son las neuronas espinosas medianas (NEM), cuya densidad neuronal es aproximadamente del 95% (Kemp y Powell, 1971; Bishop y cols., 1982; Kreitzer, 2009); sin embargo las aferencias y eferencias de las NEM son controladas dinámicamente por las interneuronas. Aproximadamente el 5% de neuronas restantes en el estriado son interneuronas; se llaman interneuronas debido a que sus proyecciones no emergen fuera del estriado y además su sinapsis la realizan en las NEM (Bishop y cols., 1982). Las interneuronas se dividen en dos subtipos debido a su morfología y neuroquímica: Neuronas espinosas grandes (NEG) de naturaleza colinérgica y NEM de naturaleza GABAérgica (Figura 3 B, C, D y E) (Bolam y cols., 1983; Kawaguchi, 1993; Kita, 1993). Ambas interneuronas son importantes en la modulación de la información que entra al estriado por las neuronas dopaminérgicas y glutamatérgicas; además se observa que la dopamina (DA) es un modulador importante de la microcircuitaría estriatal. (Chuhma y cols., 2014; Clarke y Adermark 2015).

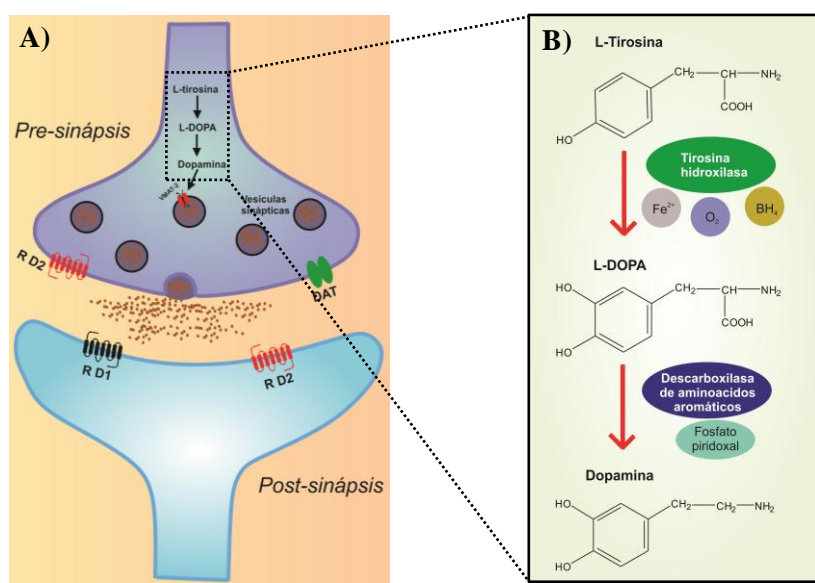


**Figura 3. Organización neuroanatómica del estriado.** A) Esquema del estriado de rata con la división anatómica del estriado dorsal (caudado-putamen). (Tomado y modificado de *Deumens y cols 2002*). Se muestra un esquema de B) neuronas espinosas medianas y C) neuronas espinosas grandes. Fotomicrografías de D) NEM GABAérgica y E) NEG colinérgica. (Tomado de *Kreitzer, 2009*).

## 1.2 Neuroquímica de la vía nigro-estriatal

La DA es sintetizada en una reacción secuencial de la catálisis de enzimas citosólicas, la síntesis comienza con la hidroxilación del aminoácido L-tirosina a L-3,4-hidroxifenilalanina (L-DOPA) a través de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), el cofactor tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) y hierro (Fe<sup>2+</sup>); posteriormente se lleva a cabo la descarboxilación de la L-DOPA a DA por medio de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (DCAA) y fosfato piridoxal (Molinoff y Axelrod, 1971, Elsworth

y Roth RH, 1997; Muñoz y cols., 2012). La membrana de las vesículas sinápticas dopaminérgicas contienen un transportador vesicular de monoaminas tipo-2 (VMAT-2) que permite la captación de DA hacia las vesículas (Guillot y Miller 2009). Se ha demostrado que la TH y la DCAA se asocian con vesículas sinápticas donde esté presente el VMAT-2 para formar un complejo proteico. Por lo tanto, la síntesis de la DA se lleva a cabo rápidamente por las enzimas TH y DCAA con el fin de evitar la presencia del neurotransmisor libre en el citosol y su rápida degradación (Segura-Aguilar y Kostrzewa, 2006) (Figura 4). Posteriormente la dopamina almacenada debe ser liberada por exocitosis por medio del flujo de  $\text{Ca}^{+2}$  y se transmite la señal nerviosa para que la DA logre interactuar con sus receptores de la familia  $\text{D}_1$  y  $\text{D}_2$  (Nagatsu e Ichinose, 1999).



**Figura 4. Síntesis y liberación de la dopamina.** A) Esquema de la interacción de la terminal nigral con la dendrita estriatal. La dopamina liberada en la terminal nerviosa interactúa con los receptores dopaminérgicos. B) Se esquematiza la ruta de síntesis de la dopamina, así como las principales enzimas, cofactores e intermediarios involucrados, los sitios de reacción se muestran con flechas rojas. (Tomado y modificado de Elsworth y Roth, 1997).

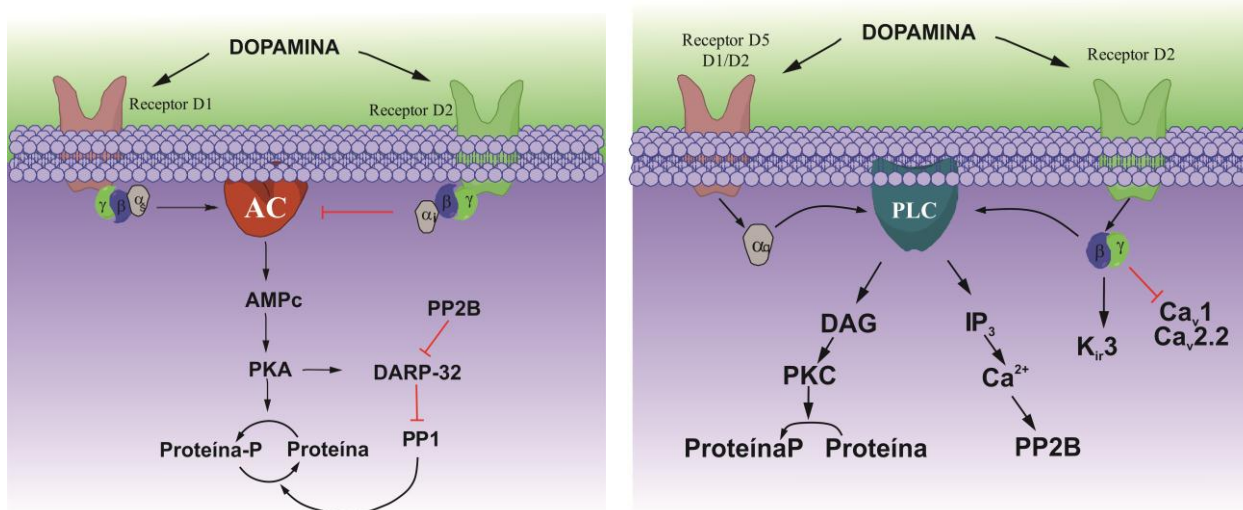
Una vez liberada la DA de las terminales presinápticas al espacio extracelular, la DA modula sus efectos mediante la interacción con los receptores dopaminérgicos, que son receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Existen cinco subtipos de receptores dopaminérgicos y se dividen en dos familias, según su estructura y efecto biológico. La familia de los receptores  $\text{D}_1$  agrupa a los receptores  $\text{D}_1$  y  $\text{D}_5$  (acoplados a proteína G estimulante [ $\text{G}_s$ ]), mientras que la familia de los receptores  $\text{D}_2$  agrupa a los receptores  $\text{D}_2$ ,  $\text{D}_3$  y  $\text{D}_4$  (acoplados a proteína G inhibitoria [ $\text{G}_i$ ]) (Jackson y Westlind-Danielsson, 1994).

Los efectos inducidos por los receptores de la familia  $\text{D}_1$  es modulada por la activación de la adenilato ciclasa (AC) y consecuentemente se induce el incremento de los niveles de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) y la activación de la proteína cinasa A (PKA). Por el contrario, la familia de los receptores  $\text{D}_2$  está

modulada negativamente por medio de la inhibición de la AC, cuyo efecto será la disminución en los niveles de AMPc, la modulación de PKA y sus efectores (Forn y cols., 1974; Greengard y cols., 1999). Cada subtipo de receptor dopaminérgico difiere en el tipo de señalización intracelular que modula. Como GPCRs, activan estas proteínas heterotriméricas, pero las vías de los segundos mensajeros y las proteínas efectoras activadas por los diferentes receptores varían considerablemente (Rangel-Barajas y cols., 2015). (Tabla 1; Figura 5).

Familia	D1		D2		
Familia, Subtipo	D <sub>1</sub>	D <sub>5</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>
Nombre del gen	<i>Drd1</i>	<i>Drd5</i>	<i>Drd2</i>	<i>Drd3</i>	<i>Drd4</i>
Número de intrones	0	0	6	5	3
Variaciones en el <i>splicing</i>	No	No	Si (D <sub>2</sub> S, D <sub>2</sub> L)	Si	Si
Afinidad para la dopamina (μM)	1.0-5.0	0.2-2.0	0.2-2.0	0.02-0.2	0.01-0.1
Proteína G acoplada	Gα <sub>s</sub> , Gα <sub>olf</sub>	Gα <sub>s</sub> , Gα <sub>q</sub>	Gα <sub>i</sub> , Gα <sub>o</sub>	Gα <sub>i</sub> , Gα <sub>o</sub>	Gα <sub>i</sub> , Gα <sub>o</sub>
Agonistas comunes por familia	SKF-38393, SKF-81297		(-)Quinpirol, Cabergolina, Pramipexol		
Antagonistas comunes por familia	SCH-23390, SKF-83566		(-)Sulpirida, Spiperona, Nemomaprida		

**Tabla 1. Características bioquímicas de los receptores dopaminérgicos.** Se muestra en la tabla la diferencia en cada receptor dopaminérgico en las dos familias que los constituyen. Así mismo se muestran ejemplos de agonistas y antagonistas que se utilizan hasta la fecha.

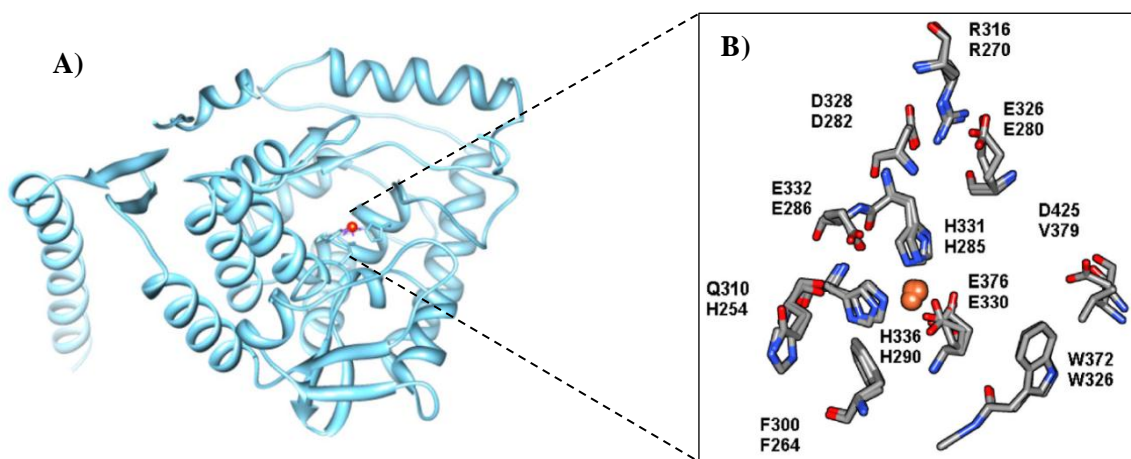


**Figura 5. Vía de señalización intracelular de los receptores dopaminérgicos.** A) Esquema de la señalización dependiente de AMPc/PKA y la modulación de la proteína DARPP-32. B) Esquema de la señalización mediada por PLC y activación de PP2B y modulación indirecta de DARPP-32 observada en el esquema A) AC, adenilato ciclasa; PKA, proteína cinasa A; DARPP-32, Fosfofotoproteína regulada por dopamina y AMPc.

La actividad de la TH debe mantenerse hasta que disminuya la demanda de DA y su actividad se inhiba. Los mecanismos postraduccionales que permiten este efecto son a través de la fosforilación por cinasas, desfosforilación por fosfatasa, inhibición por retroalimentaciones, oxidación por nitritos e inclusión en complejos proteicos. Por lo tanto cualquier modificación en la fosforilación de la TH esta podría alterar su actividad en la neurona dopaminérgica (Daubner, 2011).

### 1.2.1 Estructura y sitios de modulación de la tirosina hidroxilasa

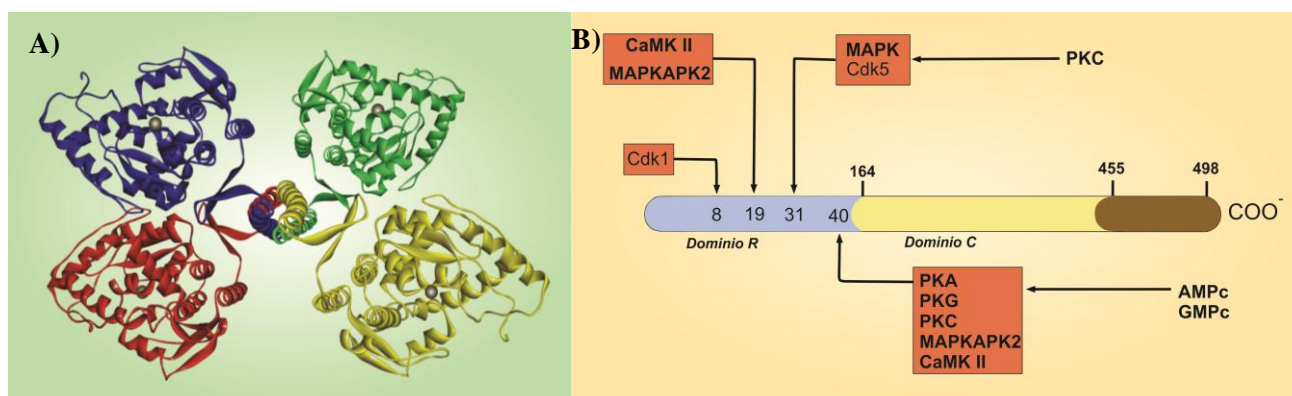
La TH es una enzima que se cataloga dentro de las oxidoreductasas, conforme a la nomenclatura de la clasificación numérica para las enzimas (enzyme commission numbers [EC]) y posee el número 1.14.16.2. La TH cataliza la hidroxilación del anillo aromático de la tirosina, utiliza el oxígeno diatómico y la biopterina reducida en una reacción con un átomo de  $\text{Fe}^{2+}$ . El  $\text{Fe}^{2+}$  se mantiene en el sitio activo de la enzima con la interacción con dos residuos de histidina y de glutamato y debe estar en estado ferroso para su catálisis (Nagatsu T y cols., 1964; Nagatsu y Nagatsu, 2016) (Figura 6). La enzima está constituida por tres dominios, un dominio regulador amino-terminal de 164 aminoácidos (dominio R), seguido por un dominio catalítico de 291 aminoácidos (dominio C) y un dominio carboxilo terminal de 43 aminoácidos (Ledley y cols., 1985). La TH forma tetrámeros y es fosforilada en los residuos de serina que se encuentran presentes en el dominio N-terminal. Una proteína que puede fosforilar a la TH es la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA). Cuando la TH es fosforilada por PKA, es menos susceptible a la inhibición por retroalimentación por DA (Daubner y cols., 1992) (Figura 7).



**Figura 6. Esquema del dominio catalítico de la tirosina hidroxilasa.** A) Estructura del dominio catalítico del metal hierro (Dominio C). B) Se presenta la interacción del metal con los residuos de histidina 336, histidina 285 y metionina 330. (Tomado de Fitzpatrick y cols, 1999).

La TH puede ser regulada por dos mecanismos: a mediano y a largo plazo, cuyos procesos intervienen la regulación de la expresión de genes, las modificaciones transcripcionales y postraduccionales, estabilidad del ARNm y *splicing* alternativo; y a largo plazo, mediante la regulación de la actividad enzimática (Kumer SC y Vrana, 1996). La TH se regula por dos mecanismos de inhibición del producto final; en las neuronas dopaminérgicas los productos finales son la L-DOPA y la DA, sin embargo es muy poco probable que la inhibición sea mediada por L-DOPA debido a que la actividad de la DCAA es continua y se cataliza a DA rápidamente, por lo tanto el incremento de la DA podría verse más determinante. El grupo catecol de la DA

interactúa en el mismo sitio de unión de la BH<sub>4</sub> y consecuentemente se efectúa una inhibición competitiva entre dopamina y BH<sub>4</sub>, cofactor importante para la síntesis de DA y la actividad de la TH. La TH de la rata tiene cuatro residuos de serina en el dominio R, Ser8, Ser19, Ser31, Ser40, son fosforiladas por proteínas cinasas en respuesta a diversos estímulos nerviosos o vías de señalización. (Fitzpatrick, 1999; Daubner, 2011).

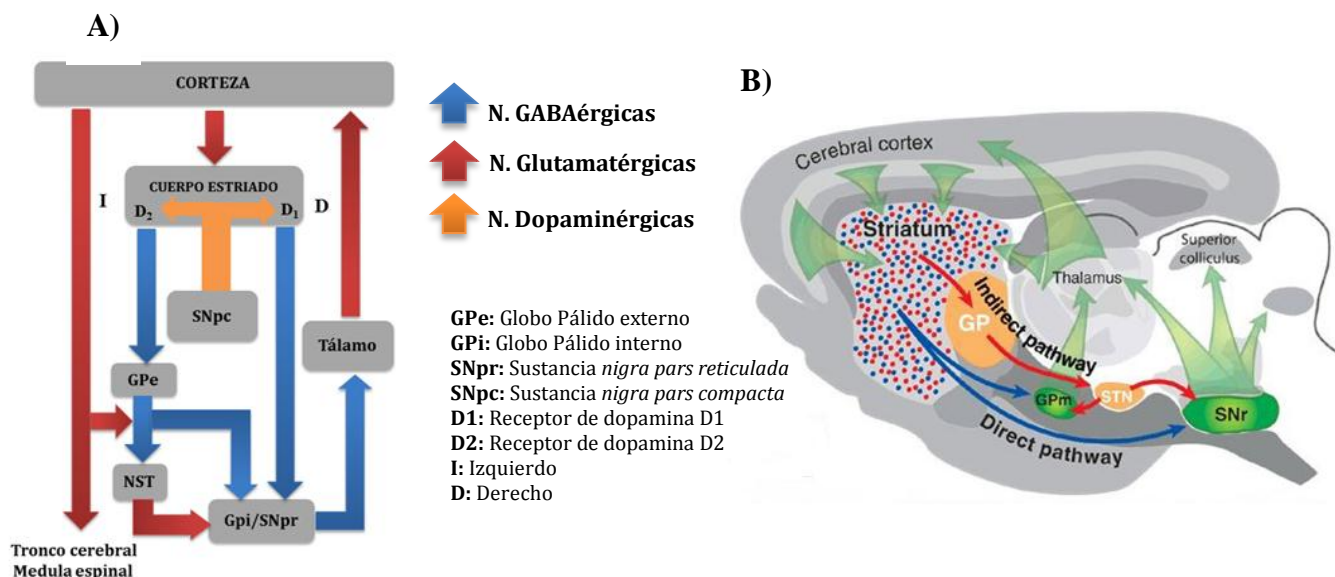


**Figura 7. Estructura proteica de la tirosina hidroxilasa y sitios de fosforilación.** A) Estructura secundaria de la tirosina hidroxilasa, se visualiza el sitio de unión con el metal hierro en cada uno de los dominios catalíticos. B) Se esquematiza la proteína completa de 498 aminoácidos; la enzima completa se divide en tres dominios, el regulador (R), el catalítico (C) y el carboxilo terminal. Sitios de fosforilación en serina 8, 19, 31 y 40 (Tomado y modificado de *Fitzpatrick y cols, 1999* y *Gnegy, 2012*).

La regulación de la dopamina (DA) debe ser finamente modulada por las neuronas intrínsecas y extrínsecas que intervienen en la vía nigro-estriatal y posteriormente su modulación a los demás núcleos cerebrales que asocian al control motor, los ganglios basales.

### 1.3 Circuitería de los ganglios basales y la ejecución motora

Los ganglios basales (GB) están constituidos por un grupo de núcleos subcorticales involucrados en diferentes procesos que incluyen las funciones motoras, asociativas, cognitivas y mnemónicas (Gerfen y Wilson, 1996; Tepper y cols., 2007). Los GB se han clasificado en i) núcleos de entrada, ii) núcleos de salida y iii) núcleos intrínsecos. Los núcleos de entrada son aquellas estructuras que reciben información procedente de diferentes fuentes, principalmente de origen cortical, talámico y nigral; el núcleo CPu y el NAc son considerados núcleos de entrada. Los núcleos de salida son aquellas estructuras que envían información de los ganglios basales al tálamo y consisten en el segmento interno del globo pálido (GPi) y la SNpr. Por último, los núcleos intrínsecos como el segmento externo del globo pálido (GPe), el núcleo subtalámico (NST) y la SNpc se localizan entre los núcleos de entrada y de salida en el relé de la información (Lanciego y cols., 2012) (Figura 8A).



**Figura 8. Circuitería de los ganglios basales.** **A)** Esquemática de la circuitería de los GB, se muestra la regulación de los GB de acuerdo a la naturaleza neuronal N. glutamatérgica (Rojo); N. GABAérgica (Azul); N. Dopaminérgica (anaranjado) **B)** Se muestra el dibujo del corte de cerebro de rata en un plano sagital y se exponen los núcleos que participan en el control de la información para la ejecución de los movimientos. (Tomado y modificado de *Gerfen, 2006*).

La eficiente ejecución de los movimientos voluntarios es el resultado del procesamiento correcto de la información sensorio-motora en el cerebro. Este proceso es llevado a cabo por una red neuronal compleja, que incluye la corteza cerebral, el tálamo motor y los núcleos de los GB. La circuitería de los GB está funcionalmente interpuesta entre la corteza y el tálamo. La principal tarea del circuito es procesar las señales que provienen desde la corteza para producir una señal de salida que regresa a la corteza, a través del tálamo, para modular la ejecución del movimiento (Blandini y cols., 2000; Lanciego y cols., 2012).

Las NEM envían proyecciones neuronales hacia el GPi y la SNpr, los dos núcleos son denominados núcleos de salida de los GB debido a que utilizan al neurotransmisor GABA para regular la comunicación excitadora del tálamo hacia la corteza motora para cerrar el circuito (Bolam y Smith, 1990; Bolam y cols., 2000). Sin embargo, una población de neuronas GABAérgicas del estriado se comunica indirectamente con los núcleos de salida que proyectan al GPe, comunicándose con el NST para controlar la actividad glutamatérgica que este proyecta hacia el GPi/SNpr (Bevan y cols., 1994; Bolam y cols., 2000).

Por consiguiente el estriado constituye dos sistemas paralelos de comunicación: vía directa (estriado-nigral) e indirecta (estriado-palidal). La actividad de las vías tanto la directa como la indirecta son moduladas por la presencia de receptores de DA (Tepper y cols., 2007). La vía directa estará modulada de manera primordial por la presencia de receptores D<sub>1</sub>, estimulando los núcleos de salida y aumenta la inhibición sobre la SNpr y el GPi permitiendo la ejecución del movimiento; la vía indirecta estará modulada por receptores D<sub>2</sub>

suprimiendo la actividad de la vía indirecta y por lo tanto bloquean la inhibición del movimiento (Lee y Tepper, 2007) (Figura 8B). Debido a que se necesita una modulación fina de la DA para la regulación de la circuitería de los GB, las patologías que involucran la desregulación o la deficiencia de este neurotransmisor conlleva a una serie de alteraciones y se hacen evidentes en las respuestas que involucran al movimiento. La alteración más común que implica alteraciones en el sistema dopaminérgico y la modulación en los GB es la que se caracteriza en la Enfermedad de Parkinson.

#### **1.4 La Enfermedad de Parkinson**

La Enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita médicamente por James Parkinson en 1817, quien por primera vez informó sobre los síntomas de la enfermedad (Parkinson, 1817). La EP se caracteriza por el movimiento involuntario, rigidez muscular, bradicinesia, inestabilidad postural y dificultad para iniciar la marcha. La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después de la Enfermedad de Alzheimer y la primera enfermedad más frecuente que involucra los trastornos del movimiento. La EP tiene una prevalencia del 0.5-1% en las personas geriátricas que se encuentran entre los 65 y 69 años de edad, aumentando hasta el 1-3% en las personas mayores de 80 años de edad (Shneider y Obeso, 2015).

La EP se puede clasificar en dos tipos, EP familiar y la EP esporádico. La EP de tipo familiar, que constituye el 5 y el 10% de los casos de pacientes con EP y la EP de tipo esporádico que constituye el 90%. La etiología de la EP aún no es clara, aunque parece ser multifactorial y probablemente podría estar asociado a factores ambientales y genéticos. Se han reportado algunos factores de riesgo como la edad avanzada (Reeve y cols., 2014), antecedentes familiares (Sanyal y cols., 2010), disminución en los niveles de estrógenos (Chung y cols., 2011), exposición a agentes tóxicos (Kieburtz y Wunderle, 2013; Kwakye y cols., 2017), factores genéticos (Kim y Alcalay, 2017) y traumatismo craneal (Gao y cols., 2015).

Las principales características neuropatológicas de la EP son la pérdida de neuronas dopaminérgicas que contienen neuromelanina en la SNpc, degeneración progresiva y lenta de la vía nigro-estriatal, así como la agregación proteica citoplásmica de los cuerpos de Lewy (CL) (Forno, 1996). La relación de la pérdida neuronal dopaminérgica con la EP fue descrita por Oleh Hornykiewicz en 1960 debido a los hallazgos que obtuvo en los estudios que realizó en los pacientes con EP. Hornykiewicz observó que la pérdida de neuronas nigrales siguen un patrón específico en un área muy susceptible, localizada en la región lateral y ventral de la SNpc y cuya pérdida de esta inervación da como resultado la disminución de DA en el estriado (Ehringer y Hornykiewicz, 1960). Se ha reportado que al inicio de los síntomas de la EP existe una disminución de un ~80% de DA estriatal y una pérdida del ~60% de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas de la SNpc (Malessa y cols., 1990). Además, al inicio de la EP existen dificultades para realizar un diagnóstico debido a que podrían solo tener un 50-70% de neuronas de la vía nigro-estriatal. Los

primeros signos clínicos solo se observan cuando la degeneración de las neuronas dopaminérgicas ya es muy avanzada; este hecho dificulta entender la patogenia de la EP, debido a que no se puede saber el tiempo de inicio de la neurodegeneración en los pacientes (Frank y cols., 2006; Rana y cols., 2012).

A nivel celular la EP está relacionada con la producción exacerbada de especies reactivas de oxígeno (ROS), alteraciones en el metabolismo de las catecolaminas, modificaciones en la función de la cadena transportadora de electrones mitocondrial y un aumento en la deposición de  $Fe^{2+}$  en la SNpc (Yoritaka y cols., 1996; Floor y Wetzel, 1998; Dias y cols., 2013). La falla que se produce en relación con el envejecimiento de los procesos celulares normales, probablemente contribuye a la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas. (Schapira y Jenner, 2011; Rodriguez y cols., 2014).

A pesar de que se han descrito las mutaciones de varios genes en la EP de tipo familiar como PARK2, PARK7, GBA o LRRK2 (Trinh y Farrer, 2013); la disfunción mitocondrial, la neuroinflamación y los factores ambientales son cada vez reconocidos como determinantes clave de la susceptibilidad neuronal dopaminérgica en la EP, y son características tanto de la EP de tipo esporádico como de la EP de tipo familiar (Ryan y cols., 2015). En ambos casos se cree que el estrés oxidante es el mecanismo subyacente común que conduce a la disfunción celular y finalmente a la muerte celular.

### **1.5 Estrés oxidante**

El estrés oxidante (EO) se produce al existir un desequilibrio entre la producción de pro-oxidantes (generados por el metabolismo celular) y los sistemas de defensa antioxidante. La pérdida de la homeostasis oxidativa se caracteriza por un aumento en las concentraciones de radicales libres (RL) y ROS intra y extracelular, por lo que su sobreproducción no puede ser disminuido por los sistemas antioxidantes; este desequilibrio causa daño y muerte celular (Halliwell, 2006; Birben y cols., 2012). Particularmente el DNA mitocondrial es particularmente susceptible a daño oxidante, debido a los altos niveles del metabolismo del oxígeno, a la ineficiente reparación del DNA y debido a la falta de histonas (Richter, 1988). Las ROS se producen a partir de  $O_2$  como resultado del metabolismo celular. Existen varios tipos de ROS endógenos, las tres principales ROS que son de importancia fisiológica y los ROS que sobresalen por su importancia fisiológica y toxica son el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Birben y cols., 2012) (Tabla 2).

Principales oxidantes endógenos		
Oxidantes	Fórmula química	Reacción
Anión superóxido	$\cdot\text{O}_2^-$	$\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \leftrightarrow \text{NADP}^+ + 2\cdot\text{O}_2^- + \text{H}^+$
		$2 \cdot\text{O}_2^- + \text{H}^+ \longrightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
Peróxido de hidrógeno	$\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{Hipoxantina} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{Xantina} + \text{H}_2\text{O}_2$
		$\text{Xantina} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{ácido urico} + \text{H}_2\text{O}_2$
Radical hidroxilo	$\text{OH}\cdot$	$\text{Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$
Ácido hipocloroso	$\text{HOCl}$	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- \longrightarrow \text{HOCl} + \text{H}_2\text{O}$
Radical peroxilo	$\text{ROO}\cdot$	$\text{R} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{ROO}\cdot$
Radical hidroxiperoxilo	$\text{HOO}\cdot$	$\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HOO}\cdot + \text{OH}^-$

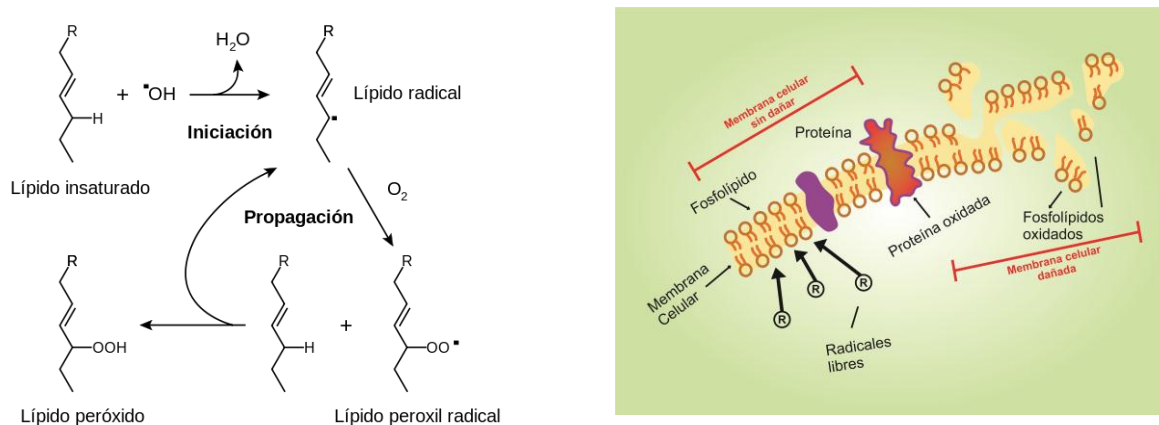
**Tabla 2. Principales oxidantes endógenos.** Se muestran las principales reacciones de los oxidantes endógenos que fisiológicamente se producen, tanto el radical superóxido como el peróxido de hidrógeno son importantes para eventos vitales en el organismo. (Tomado y modificado de Birben y cols., 2012)

La formación del  $\text{O}_2^-$  se realiza mediante la adición de un electrón al  $\text{O}_2$ ; este proceso está mediado por la NADPH oxidasa, xantina oxidasa o por la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Curtin y cols., 2002). El productor principal del  $\text{O}_2^-$  es la mitocondria, por ser el generador de ATP, aproximadamente el 1-3% de los electrones destinados para la reducción de oxígeno a agua en la cadena transportadora de electrones se escapan del sistema y producen el  $\text{O}_2^-$  (Heise y cols., 2003).  $\text{O}_2^-$  se convierte en  $\text{H}_2\text{O}_2$  por la acción de la superóxido dismutasa (SOD). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  se difunde fácilmente a través de la membrana plasmática. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  se produce también por la XO, la NADPH oxidasa y la MAO-B y en los peroxisomas por el consumo de  $\text{O}_2$  en las reacciones metabólicas (Dupuy y cols., 1991; Birben y cols., 2012). En una sucesión de reacciones denominadas “Reacción de Fenton” ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ ) y “Reacción de Haber-Weiss” ( $\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow \text{O}_2 + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ ) el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede descomponerse en  $\cdot\text{OH}$  en presencia de metales de transición como el  $\text{Fe}^{2+}$  y el  $\text{Cu}^{2+}$ , además el  $\text{O}_2^-$  por sí mismo puede reaccionar con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y generar  $\cdot\text{OH}$  (Fenton, 1984; Liochev y Fridovich, 2002). El  $\cdot\text{OH}$  es el más reactivo de las ROS y puede dañar a las proteínas, los lípidos, los carbohidratos y el DNA. Así mismo puede iniciar la peroxidación lipídica mediante la toma de un electrón de ácidos grasos poliinsaturados (Halliwell y cols., 2006).

### 1.5.1 Peroxidación de lípidos

Existen otros radicales libres derivados del oxígeno y son los radicales peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ). La forma más simple de estos radicales es el radical hidroperóxilo ( $\text{HOO}\cdot$ ) y juega un papel importante en la oxidación de los ácidos grasos (Halliwell, 2001). Los radicales libres pueden desencadenar reacciones en cadena de la peroxidación de lípidos mediante la extracción de un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de cadena lateral. El radical lipídico reacciona con el oxígeno para producir el  $\text{ROO}\cdot$ . El  $\text{ROO}\cdot$  inicia una reacción en cadena y transforma los ácidos grasos poliinsaturados en  $\text{HOO}\cdot$  lipídicos. Los hidroperóxidos lipídicos son muy inestables y se descomponen fácilmente en productos secundarios, tales como aldehídos, 4-hidroxi-2,3-

nonenal (4-HNE) y malondialdehídos (MDA) (Aruoma, 1996; Marnett, 1999). La peroxidación de lípidos altera la integridad de las membranas celulares y conduce al reordenamiento de la estructura membranal. Por tal motivo las células desencadenan diversos mecanismos que contrarrestan la sobre producción de ROS y de RL para evitar el daño en la arquitectura celular (Figura 9).



**Figura 9. Peroxidación de lípidos de la membrana celular.** A) Esquematación del proceso de la iniciación, propagación y finalización de la Peroxidación de lípidos B) Se muestra el dibujo de una membrana dañada por radicales libres, la oxidación de los fosfolípidos y de las proteínas de membrana.

## 1.6 Enzimas antioxidantes

Los seres vivos están protegidos con una gran variedad de antioxidantes que son utilizados para contrarrestar el efecto de los antioxidantes. Halliwell y Gutteridge en 1995 definieron a los antioxidantes como “cualquier sustancia que cuando están presentes en bajas concentraciones en comparación con las de un sustrato oxidable, retarda o previene significativamente la oxidación de ese sustrato” por lo que se pueden enumerar diversos antioxidantes a nivel biológico. Los principales antioxidantes enzimáticos son: la superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.11); catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) y la glutatión peroxidasa (GPX, EC 1.11.1.9); además de estas principales enzimas, se encuentran otras enzimas con defensas antioxidantes como la hemo oxigenasa-1 y proteínas redox como las tioredoxinas (TRXs, EC 1.8.4.10), peroxirredoxinas (PRXs, EC 1.11.1.15) (Birben y cols., 2012).

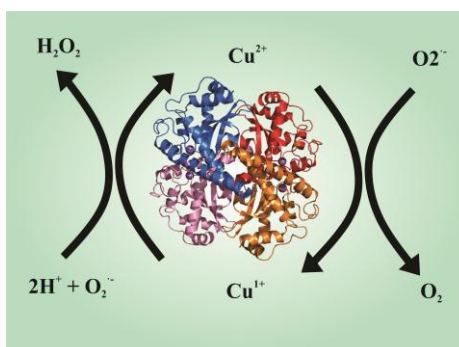
La SOD es una metaloenzima que presenta tres isoformas: i) la superóxido dismutasa cobre-zinc (SOD-Cu/Zn), superóxido dismutasa manganeso (SOD-Mn) y Superóxido dismutasa hierro (SOD-Fe). La SOD-Cu/Zn es conocida también como SOD1 y SOD3, esta isoforma se encuentra en las células eucariotas y en algunas procariotas; la SOD-Fe y la SOD-Mn es conocida como SOD2, la SOD-Fe es encontrada en eucariotas primitivas, plásmidos de plantas y en bacterias; el análisis filogenético para la SOD-Mn indica que esta isoforma se encuentra en todos los principales ámbitos de la vida, tanto en las mitocondrias de las

eucariotas como en el citoplasma de muchas bacterias. SOD-Fe y SOD-Mn han divergido significativamente entre sí, por lo que no pueden sustituirse funcionalmente entre sí en la mayoría de las especies (Zelko y cols., 2002; Perry y cols., 2010) (Tabla 3).

Isoforma	Localización	Peso kDa	Subunidades	Iones metalicos
SOD Cu/Zn	Citoplasma, núcleo, membrana mitocondrial	88	homodimero	Cu <sup>2+</sup> (activo, catalítico)
				Zn <sup>2+</sup> (Mantiene a la enzima estable)
SOD Mn	Matriz mitocondrial	32	homotetrámero	Mn <sup>2+</sup> (Activo, catalítico)
SOD EC	Membrana plasmática	135	Glicoproteína tetramérica	Cu <sup>2+</sup> (activo, catalítico)
				Zn <sup>2+</sup> (Mantiene a la enzima estable)

**Tabla 3. Características de las tres isoformas de la SOD.** Las tres características de la Superóxido dismutasa se diferencian en su peso molecular, así como en su localización, es importante notar que las subunidades que constituyen a la proteína depende su funcionalidad. (Tomado y modificado de Miao y St Clair, 2009).

La SOD cataliza la desproporción del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> a O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por tal motivo la presencia de esta enzima es crítica para proteger a la célula ante los productos tóxicos de la respiración (Figura 10). El O<sub>2</sub><sup>•-</sup> es generado por diversos procesos vitales como el metabolismo aeróbico, la fosforilación oxidativa y la “explosión respiratoria” estimulada en la respuesta inmunológica de los macrófagos y neutrófilos. La toxicidad que puede ocurrir en la célula por el incremento del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> se debe a la sobreproducción de <sup>•</sup>OH dependientes de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> así como la generación de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) por la interacción del óxido nítrico y el O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. El <sup>•</sup>OH y el ONOO<sup>-</sup> son altamente tóxicos y perjudiciales para la célula y que pueden dañar y alterar los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Kinnula y Crapo, 2003; Zelko y cols., 2002).



**Figura 10. Reacción de la dismutación del anión superóxido mediado por la SOD.** Se muestra el dibujo de la SOD ante la reacción catalítica del anión superóxido a peróxido de hidrógeno y la estabilización de su potencial REDOX ante la reacción del anión superóxido a oxígeno molecular.

### 1.6.1 Superóxido dismutasa Cu/Zn

Mann y Keilin en 1938 aislaron por primera vez la SOD-Cu/Zn de eritrocitos bovinos, por el cual esta proteína de 31,5 kDa que contenía cobre unido fue denominada hemocupreína. Después de diversos estudios y de descubrir que la enzima catalizó la dismutación de los  $O_2^{\cdot-}$  a  $O_2$  y  $H_2O_2$  fue que en 1969, McCord y Fridovich cambiaron apropiadamente el nombre a superóxido dismutasa. En 1982 se realizó la primera estructura tridimensional completa de la SOD-Cu/Zn, producto del gen *sod1* de eritrocitos de bovinos, lo que permitió a los investigadores establecer la base estructural para el mecanismo enzimático de SOD-Cu/Zn y su rápida catálisis (Tainer y cols., 1982).

Un mecanismo propuesto con estructuras de alta resolución con SOD-Cu/Zn en *Ailvinella pompejana* tuvo en cuenta las restricciones estéricas en la unión al sitio de cobre (I) y como se relacionan con la observación de cobre en dos sitios. Tras el reconocimiento electrostático y la guía del sustrato al sitio activo con residuos cargados positivamente, tales como SOD-Cu/Zn Lys136 y Arg143 (Getzoff y cols., 1983; 1992; Fisher y cols., 1997), la primera mitad de reacción comienza con el sustrato  $O_2^{\cdot-}$  unido a Cu (II). Cu (II) se reduce a Cu (I), y  $O_2^{\cdot-}$  se oxida a  $O_2$ . El enlace Cu para unir el enlace de histidina (SOD-Cu/Zn His63) se rompe, dejando His63 Nε1 protonado. En la reacción de la segunda mitad, un protón de His63 Nε1 y un electrón de Cu (I) se donan a  $O_2^{\cdot-}$ , con lo que Cu (I) se oxida a Cu (II), y  $O_2^{\cdot-}$  se reduce a  $H_2O_2$ . El cobre se une a la histidina puente se restaura (Tainer, 1983).

### 1.6.2 Superóxido dismutasa Mn

La SOD-Mn se encuentra expresada mayoritariamente en las mitocondrias de las células eucariotas, es muy necesario debido a que el 90% de las ROS celulares pueden ser generadas en este organelo. Por otro lado, el DNA mitocondrial es particularmente susceptible a daño oxidante, debido a los altos niveles del metabolismo del oxígeno, a la ineficiente reparación del DNA y debido a la falta de histonas (Richter, 1988). La falta de SOD-Mn en ratones *knockout* resulta en cardiomiopatía dilatada, acumulación de lípidos hepáticos, defectos mitocondriales y muerte neonatal precoz (Li y cols., 1995; Melov y cols., 1999). Posteriormente se realizaron estudios para disminuir la muerte de los ratones *knockout* a la SOD-Mn y observaron que la administración de miméticos de la SOD-Mn así como la terapéutica dirigida hacia la SOD-Mn son necesarios y podrían ser útiles en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Melov y cols., 2001).

La reacción catalítica de la SOD-Mn requiere ciclar entre los estados  $Mn^{2+}$  y  $Mn^{3+}$ ; el potencial del punto medio para estos dos estados. Uno de los mecanismos para la actividad catalítica de SOD-Mn es conocido como el mecanismo de reacción 5-6-5, donde el metal está en estado de coordinación cinco en estado de

reposo y estado de coordinación seis cuando el anión está unido (Ludwig y cols, 1991). Se cree que en este modelo, el  $O_2^{\cdot-}$  se une de la misma manera que los inhibidores aniónicos, tales como fluoruro, hidróxido y azida. Las estructuras cristalinas de SOD-Mn de *T. thermophilus* han revelado que el inhibidor de la azida forma un sexto ligando, creando un ion de manganeso octaédrico distorsionado (Lah y cols., 1995).

Un segundo mecanismo propuesto fue el desplazamiento asociativo, el cual se basó en la absorción dependiente de la temperatura de los complejos aniónicos de SOD-Mn. En este mecanismo, la enzima inhibidora en estado inactivo, está en coordinación seis, mientras que la forma activa permanece en coordinación cinco, con la unión del sustrato causando el desplazamiento de uno de los ligandos de manganeso (Whittaker y Whittaker 1995). Un tercer mecanismo propuesto sugiere que la reacción catalítica se produce a través de un mecanismo de esfera exterior y en su lugar utiliza un sitio alternativo de unión a aniones en el sitio activo, posiblemente en la base del canal (Fee y cols., 1981, Miller y cols., 2005). El vínculo de las SOD's con las enfermedades neurodegenerativas son más evidentes debido a las funciones primordiales que ejerce en la célula. El control en la generación de ROS a nivel citoplasmico así como a nivel mitocondrial es necesario para disminuir la activación de vías de transducción de señales que pueden ejercer las ROS, tales como inflamación, activación de la vía del óxido nítrico y la muerte celular (Barber y Shaw, 2010; Davis y Pennypacker, 2017).

Aunque aún no se conoce el mecanismo preciso que corresponde la generación de ROS relacionada con la EP, las investigaciones centran las principales fuentes de EO generadas por las neuronas dopaminérgicas, como el metabolismo de la DA, la disfunción mitocondrial y la neuroinflamación. La mayoría de los conocimientos actuales sobre los posibles mecanismos patogénicos y fisiopatológicos de la EP han sido evidenciados gracias a los diversos estudios realizados en las últimas cuatro décadas en modelos experimentales de la EP (Blandini y Armentero, 2012).

### **1.7 Modelos animales para el estudio de la Enfermedad de Parkinson.**

En la investigación de la EP se han utilizado modelos animales basados en el uso de agentes neurotóxicos para evaluar los mecanismos patológicos, de protección neuronal y evaluación de fármacos (Blesa y cols., 2012; Blandini y Armentero, 2012; Gubellini y Kachidian, 2015). Se ha intentado reproducir los cambios patológicos y algunas de las manifestaciones clínicas de la EP en roedores mediante el uso de agentes farmacológicos o tóxicos que inducen la degeneración selectiva de las neuronas nigro-estriales. Estos neurotóxicos pueden ser administrados sistémica o localmente, dependiendo del tipo de agente utilizado (Deumens y cols., 2002; Simola y cols., 2007; Blandini, 2012; Bové y Perier, 2012). Entre los neurotóxicos más empleados se encuentran el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridona (MPTP), que es metabolizado a 1-metil-4-fenilpiridinio ( $MPP^+$ ) por la monoaminoxidasa B (MAO-B) y la 6-hidroxidopamina (6-OHDA)

(Langston y cols., 1983; Ungerstedt, 1968; Grünblatt y cols., 2000; Deumens y cols., 2002). De manera particular, la 6-OHDA no atraviesa la BHE es más selectiva para las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y ha sido el fármaco más utilizado para inducir la neurodegeneración del sistema nigroestriatal (Blandini y Armentero, 2012). Un factor común que poseen la mayoría de los neurotóxicos utilizados en los modelos animales de la EP y que probablemente su participación está implicada en la etiología de la EP es el EO generado en las neuronas dopaminérgicas.

### **1.7.1 Utilidad de la 6-hidroxidopamina**

La 6-OHDA es un análogo estructural de las catecolaminas, identificado por primera vez por Senoh y Witkop en 1959. La 6-OHDA fue descrita como un fármaco que provoca la disminución en los niveles de noradrenalina en el corazón de ratón (Porter y cols., 1963). Posteriormente se descubrió que la 6-OHDA podía inducir la degeneración selectiva en las terminales nerviosas simpáticas noradrenérgicas (Tranzer y Thoenen 1973); estos hallazgos condujeron al nuevo concepto de “denervación química” en la neurobiología, que consiste en la utilización de una molécula diana neurotóxica en una población neuronal específica. Ungerstedt en 1968 utilizó por primera vez la 6-OHDA para inducir un modelo de lesión unilateral en la vía nigro-estriatal de rata. Debido a que la 6-OHDA es una molécula hidrofílica, no puede cruzar la barrera hematoencefálica, por lo que necesita ser inyectada directamente mediante procesos quirúrgicos estereotáxicos en la estructura cerebral de interés, generalmente en la SNpc, el haz medial del cerebro anterior, el estriado y en algunos casos se ha inyectado intracerebroventricular.

Para modelar las condiciones de la EP, la 6-OHDA puede ser administrada si bien en el área de la SNpc o en el MFB que contiene las fibras ascendentes nigro-estriatales al estriado. Las inyecciones de la 6-OHDA en la SNpc o en el MFB pueden producir una lesión casi completa de las neuronas dopaminérgicas que se pueden comparar a la pérdida neuronal en fase tardía de los pacientes con EP. Por el contrario, las inyecciones de 6-OHDA en el estriado producen una lesión progresiva, retrograda y menos extensa de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigro-estriatal, que puede compararse con las etapas más tempranas de la EP. Las inyecciones de la 6-OHDA se realizan unilateralmente, permitiendo una comparación práctica en el deterioro motor entre el lado contralateral frente al lado ipsilateral (Przedborski y cols., 1995; Deumens y cols., 2002)

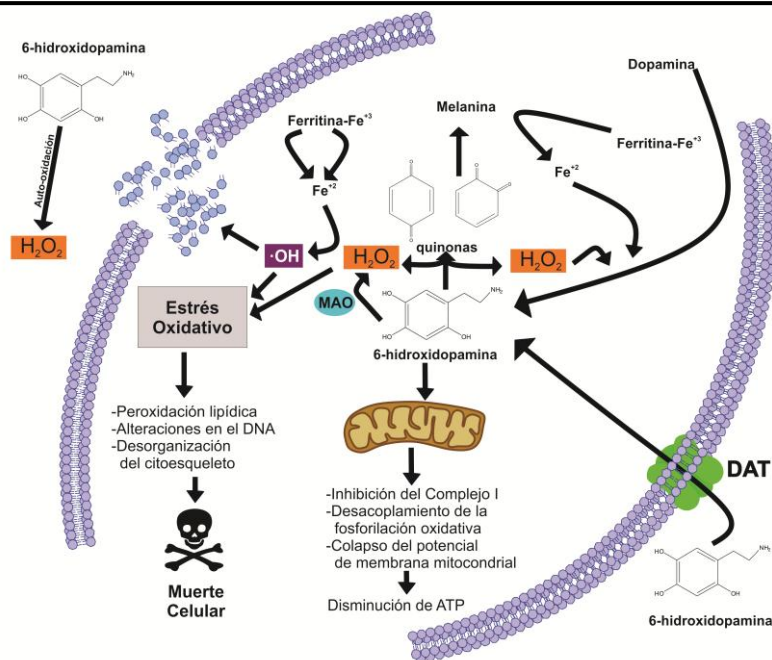
Kirik y colaboradores en 1998 establecieron los parámetros óptimos para la lesión unilateral del estriado ventrolateral con una dosis única de 20 µg o 6 µg de 6-OHDA inyectada en diferentes sitios del estriado. Concluyeron que el efecto de la inyección intraestriatal depende del sitio de lesión y de la dosis. Observaron que la dosis única administrada en un sitio del estriado causa una reducción del 80% en la inervación estriatal y una pérdida cercana al 90% de la población dopaminérgica nigral, mientras que una dosis administrada en

varios sitios del estriado genera daño en núcleos de inervación extraestriatal, como el globo pálido (Kirik y cols., 1998).

### **1.7.2 La 6-hidroxi-dopamina y el estrés oxidante**

La 6-OHDA al ser un análogo de la DA muestra gran afinidad por el transportador de dopamina (DAT) por lo que utiliza el transportador para internalizarse a la célula y acumularse en el citosol y de esta manera inducir toxicidad selectiva para estos tipos neuronales. Los mecanismos propuestos para explicar el efecto tóxico de la 6-OHDA son i) la auto-oxidación intra o extracelular, que favorece la producción de  $H_2O_2$  y de los  $O_2^{\cdot-}$  y  $\cdot OH$  (Blum y cols., 2001), ii) la formación de  $H_2O_2$  por efecto de la monoamino oxidasa (Chiba y cols., 1984), y iii) la inhibición directa del complejo I de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Jenner y cols., 1992). Estos mecanismos pueden actuar de manera independiente o de manera conjunta para generar ROS. El EO generado puede ser amplificado por un aumento de calcio libre en el citoplasma, producto de la excitotoxicidad por glutamato, o bien por la pérdida en la permeabilidad de membrana mitocondrial para conducir a la muerte celular (Singh y cols., 2010).

La producción de ROS puede surgir de la desaminación por monoamino oxidasa o auto-oxidación de 6-OHDA, y probablemente es iniciado y/o amplificado por el  $Fe^{2+}$  a través de la reacción de Fenton. La 6-OHDA así como la DA, es un sustrato para la monoamino oxidasa MAO (Breese y Traylor, 1971, Karoum y cols., 1993). Esta reacción enzimática da lugar al  $H_2O_2$ . Tras la observación de que la selegilina, un inhibidor de MAO, previene la toxicidad de 6-OHDA (Salonen y cols., 1996). Sin embargo, otros estudios sobre la toxicidad 6-OHDA indicaron que está mediada por ROS y a la generación de  $H_2O_2$  y  $\cdot OH$  a través de un proceso de auto-oxidación. De hecho, bajo condiciones fisiológicas, la 6-OHDA ejerce una auto-oxidación rápida y no enzimática (Seitz y cols., 2000, Soto-Otero et al., 2000) demostrando que genera varias especies tóxicas incluyendo quinonas,  $\cdot OH$ ,  $H_2O_2$  y el  $\cdot OH$  altamente reactivo. De acuerdo con este mecanismo, la citotoxicidad de la 6-OHDA, se correlaciona directamente con sus velocidades de auto-oxidación (Graham y cols., 1978 y Soto-Otero y cols., 2000) (Figura 11). La formación de ROS generada por la MAO y la auto-oxidación puede ser amplificada por  $Fe^{2+}$  que cataliza la reacción de Fenton. De hecho, los niveles de  $Fe^{2+}$  se incrementan en SNpc y en el estriado después de la inyección de 6-OHDA. La contribución del  $Fe^{2+}$  en la toxicidad de 6-OHDA también es sugerida por estudios que muestran que los efectos deletéreos inducidos por 6-OHDA sonevitados por agentes quelantes de  $Fe^{2+}$  y que la inyección directa de  $Fe^{2+}$  en el SNpc produce efectos neurotóxicos similares (Méndez-Álvarez y cols., 2001).



**Figura 11. Mecanismo de toxicidad de la 6-hidroxi dopamina.** Se muestra el dibujo la oxidación de la 6-OHDA en diferentes estratos de la célula. Por medio de auto-oxidación, metabolismo de la MAO y la inhibición directa de los complejos mitocondriales conduciendo a la muerte. (Tomado y modificado de *Blum y cols 2001*)  $\cdot\text{OH}$ , radical hidroxilo; MAO, monoamino oxidasa;  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peróxido de hidrógeno; DAT, transportador de dopamina.

Por otra parte, fue de sumo interés los hallazgos encontrados sobre la consideración de la 6-OHDA como una neurotoxina endógena; de hecho se demostró la presencia de la 6-OHDA tanto en ratas (Senoh y Witkop, 1959) como en cerebros humanos (Curtius y cols., 1974), así como en la orina de pacientes con EP tratados con L-DOPA (Andrew y cols., 1993). Las neuronas dopaminérgicas nigrales contienen altos niveles de DA,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y hierro libre. Una reacción enzimática entre estos elementos puede conducir muy probablemente a la formación de 6-OHDA (Slivka y Cohen, 1985, Jellinger y cols., 1995). La relevancia de utilizar la 6-OHDA para mimetizar la EP en modelos animales es por el hecho de que la generación de ROS y los efectos mitocondriales inducidos por la neurotoxina. Debido a que el Estrés oxidante juega un papel importante en el desarrollo de la neurodegeneración dopaminérgica, se han empleado diversos enfoques terapéuticos para disminuir la muerte neuronal mediante la intervención en la generación del estrés oxidante. Se conoce que los agonistas dopaminérgicos retardan la muerte neuronal dopaminérgica y debido a ello, se han estudiado de manera detallada, para saber el mecanismo por el cual disminuye la muerte neuronal.

### 1.8 Agonistas dopaminérgicos

Todos los tratamientos disponibles hasta la fecha para la EP son de naturaleza sintomática. Actualmente no hay terapia disponible que disminuya la progresión de la EP o incluso para prevenir su manifestación. El primer tratamiento sintomático que se estableció y más eficaz para el déficit dopaminérgico es la L-DOPA en combinación con un inhibidor de la descarboxilasa (Waters, 2002). La L-DOPA se ha caracterizado por ser el

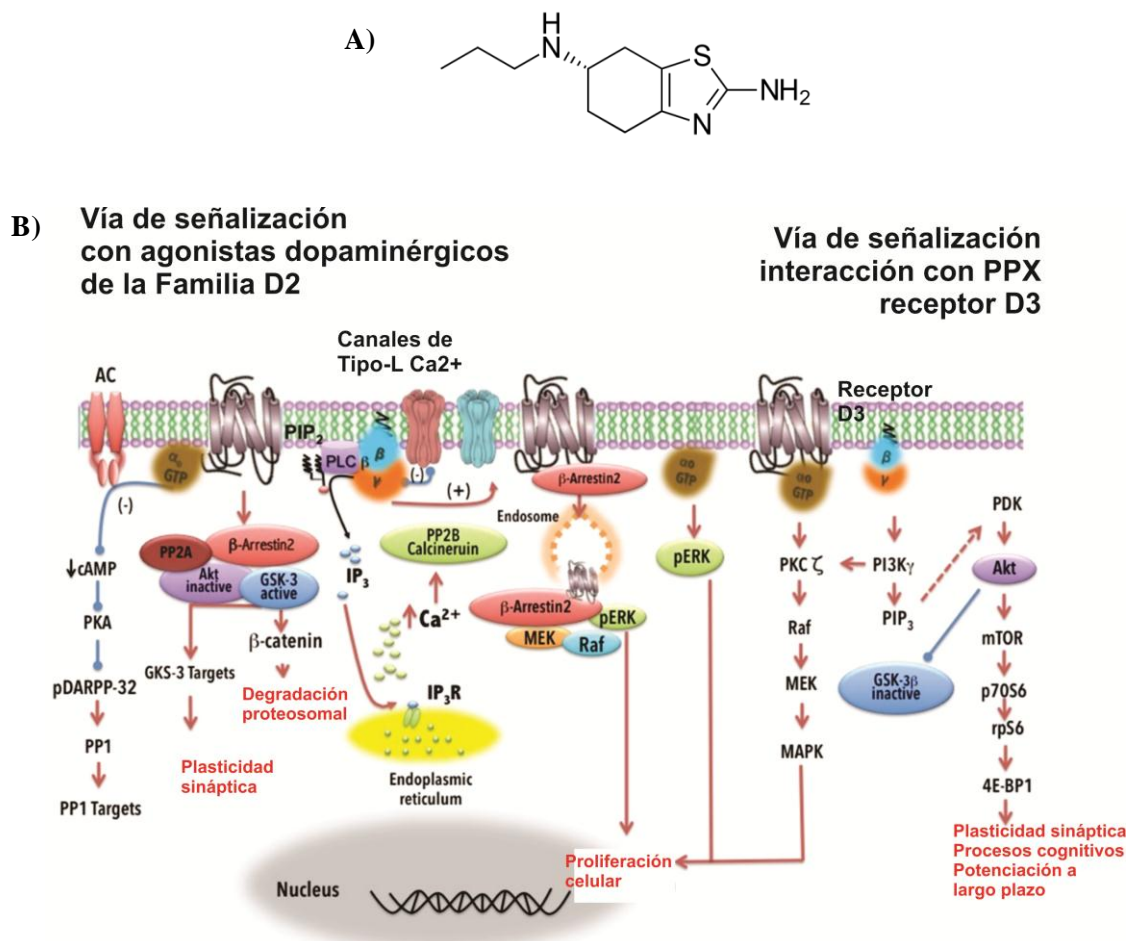
precursor de la dopamina en la cadena sintética de catecolaminas, y se puede administrar por vía oral debido a que cruza la barrera hematoencefálica, sin embargo no puede ser así con la DA. Cuando se introdujo la L-DOPA por primera vez a la clínica en la década de los 1960's, los resultados en pacientes con EP e incluso los más gravemente afectados, planteó la esperanza de que todas las enfermedades neurodegenerativas podrían ser tratados con el reemplazo de neurotransmisores. Sin embargo, las complicaciones de la terapia crónica se hicieron evidentes, superponiendo a los problemas relacionados con la enfermedad una carga adicional de fluctuaciones motoras (efecto "on-off"), discinesias y alucinaciones visuales (Waters, 2008).

A diferencia de la L-DOPA, los agonistas dopaminérgicos (AD) no requieren conversión y almacenamiento debido a que no utilizan la vía nigro-estriatal para estimular directamente a los receptores dopaminérgicos del estriado. Los agonistas dopaminérgicos son la clase de fármacos más eficaces para la EP después de la L-DOPA. En etapas tempranas de la enfermedad, proporcionan una estrategia de tratamiento eficaz, retrasando la necesidad de L-DOPA. Los agonistas dopaminérgicos más utilizados son: Bromocriptina, Pergolida, Pramipexol, Ropirinol y Cabergolina (Díaz y Waters, 2009). Los agonistas dopaminérgicos pueden ser clasificados como agonistas ergóticos y no ergóticos. Los derivados ergóticos fueron los primeros agonistas dopaminérgicos disponibles; sin embargo, se ha restringido el uso por riesgo de fibrosis valvular cardíaca y su consideración como fármacos de primera elección ha disminuido (Jenner, 2002; Hubble, 2002). Los agonistas dopaminérgicos no ergóticos tienen dos efectos principales que sobresalen de los agonistas dopaminérgicos ergóticos. El primero es proporcionar una mayor eficacia clínica en la EP debido a que estos compuestos tienen una activación selectiva a los receptores dopaminérgicos y en segundo lugar, disminuyen los efectos secundarios específicos debido a la estructura química de estos compuestos.

### 1.8.1 El pramipexol

El pramipexol (PPX) es un agonista dopaminérgico que interactúa con los receptores dopaminérgicos de la familia D<sub>2</sub> (Mierau y Schingnitz 1992); sin embargo, el PPX tiene una alta afinidad para los receptores D<sub>3</sub> y la interacción con el receptor D<sub>1</sub> es muy poca o casi nula (Mierau y cols., 1995) (Figura 12A). Las propiedades agonistas del PPX sobre los receptores dopaminérgicos fueron demostrados por Mierau y cols., en 1995, mediante la unión de [<sup>3</sup>H]pramipexol en membranas que expresaban a los receptores D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>. El PPX tenía una mayor afinidad por el receptor D<sub>3</sub> que por los receptores D<sub>2</sub> y D<sub>4</sub>. Los valores de la K<sub>i</sub> (la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor o el recíproco de la afinidad de unión del inhibidor a la enzima) de los receptores D<sub>3</sub> para PPX fueron de 6,6 a 7,8 veces más bajos que los receptores D<sub>2</sub> y D<sub>4</sub>. En comparación, la bromocriptina tenía afinidades de 2,5 a 4,9 y 12,4 a 23,9 veces inferiores para los receptores D<sub>3</sub> que para los receptores D<sub>2</sub> y D<sub>4</sub>, respectivamente (Mierau y cols., 1995).

De la misma manera que con otros agonistas dopaminérgicos, el PPX estimula los receptores D<sub>2</sub> y posee un mecanismo de retroalimentación negativa que está modulado por la estimulación de receptores D<sub>2</sub> presinápticos (autorreceptores). Este efecto conduce a una disminución en las tasas de disparo de neuronas dopaminérgicas, así como la disminución en la síntesis y la liberación de dopamina en las terminales nerviosas (Carter y Muller, 1991; Piercey y cols., 1996; Camacho-Ochoa y cols., 1995) (Figura 12B).



**Figura 12. Mecanismo de acción del pramipexol.** A) estructura del pramipexol, estructuralmente se caracteriza por ser un aminobenzotiazol. B) Se muestra un esquema sobre la activación de la vía de señalización de los receptores D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>, el efecto de la activación en la disminución de los niveles de AMPc, incremento en los niveles de calcio y por medio del receptor D<sub>3</sub> la activación de las MAPK y la activación de Akt. (Tomado y modificado de Rangel-Barajas y cols 2015) ERK, Cinasa a respuesta extracelular; AMPc, monofosfato de adenosina cíclico; Akt, proteína cinasa B.

Debido a que el receptor D<sub>2</sub> se localiza mayoritariamente en las vías nigro-estriatal, mesolímbica y mesocortical y el receptor D<sub>3</sub> las áreas mesolímbica y mesocortical y en el estriado dorsal, respectivamente; el PPX tendrá diferentes efectos al interactuar con los receptores D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> (Doole y Markham, 1998). Las primeras investigaciones que se realizaron con el PPX *in vivo* demostraron efectos sobre conductas involucradas con la activación del receptor D<sub>2</sub>. Ferrari y colaboradores en 1993, demostraron que el PPX incrementaba los bostezos, estiramiento y erección, conductas relacionadas con el receptor D<sub>2</sub> y que estos

efectos se veían disminuidos con antagonistas dopaminérgicos. Así mismo, se observó que la administración de PPX disminuía las concentraciones de dopamina extracelular y metabolitos como el ácido 3,4-dihidrofenilacético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA) en el estriado, efectos revertidos con la administración de antagonistas dopaminérgicos de los receptores D<sub>2</sub> como el sulpiride y el haloperidol (Carter y Muller, 1991).

### 1.8.2 El pramipexol, su efecto neuroprotector y antioxidante

Mierau y Schingnitz en 1992 realizaron una evaluación farmacológica y bioquímica del PPX sobre el comportamiento motor en ratas y monos. Ellos observaron que la actividad locomotora fue inhibida a dosis bajas de PPX (intraperitoneal o subcutáneo 0,01 a 0,1 mg / kg) en ratas. Por otra parte, el PPX subcutáneo a dosis de 0,1, 0,3 y 1 mg/kg indujo una conducta de giro en ratas con lesión unilateral con 6-OHDA en la MFB de ratas; así como una mejora en los signos parkinsonianos en monos Rhesus lesionados con MPTP en la vía nigro-estriatal a dosis de 0.032 a 0.1 mg/kg intramuscular. Por otra parte Maj y colaboradores en 1997 administraron el PPX a dosis de 0,3 y 1 mg / kg, en ratas e indujo un incremento en la actividad locomotora (Maj y cols., 1997). Por lo tanto, la dosificación del PPX es indispensable para la evaluación del comportamiento motor.

Investigaciones previas con respecto a las propiedades neuroprotectoras descritas por los agonistas dopaminérgicos de los receptores D<sub>2</sub> (Yamamoto, 1998) y que se incluía al PPX, mostraron con los trabajos realizados por Hall y colaboradores en 1996 y por Sethy y colaboradores en 1997 que el PPX podría tener efectos neuroprotectores ante lesiones dopaminérgicas post-isquémicas o con metanfetamina y con 3-acetilpiridina, respectivamente (Sethy y cols., 1997). Sin embargo, los efectos neuroprotectores de los agonistas dopaminérgicos D<sub>2</sub> involucraban al estrés oxidante. Se han realizado estudios de la administración del PPX ante lesiones dopaminérgicas en modelos animales con 6-OHDA y se mostró que hubo una disminución de la muerte neuronal al evaluar los niveles de DA y la inmunorreactividad de la TH, con la administración de PPX en ratas con lesiones dopaminérgicas con 6-OHDA (Vu y cols., 2000). El mecanismo propuesto para el PPX sobre la actividad neuroprotectora en animales lesionados con neurotóxicos que involucran al EO, tal como las lesiones con la 6-OHDA, se vio la efectividad de la actividad antioxidante del PPX ante la formación de  $\cdot\text{OH}$  en ratas tratadas con 6-OHDA así como en un sistema de fenton aislado en donde el PPX disminuyó la formación de  $\cdot\text{OH}$  (Ferber y cols., 2000).

Las propiedades antioxidantes del PPX *persé* a su estructura molecular se mostraron con mayor determinación al utilizar un antagonista de los receptores D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> en cultivos de células mesencefálicas ante la citotoxicidad de DA, 6-OHDA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; observaron un incremento en los niveles de la expresión de GPX, CAT y SOD ante el antagonismo de los receptores D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> (Le y cols., 2000). Sin embargo, la neuroprotección

observada con el tratamiento previo con PPX en modelos animales con EP se debe también a la activación de los receptores D<sub>3</sub>. En el trabajo realizado por Li y colaboradores en el 2010 observaron que los niveles de DA, TH y autofagosomas eran incrementados aumentaban con el tratamiento previo con PPX pero era inhibido con el antagonismo del receptor D<sub>3</sub>, así mismo se veían disminuidos los niveles de marcadores de la inflamación ante la lesión dopaminérgica y el tratamiento con el PPX (Li y cols., 2010). Estas evidencias abren nuevos paradigmas sobre el mecanismo de acción del PPX.

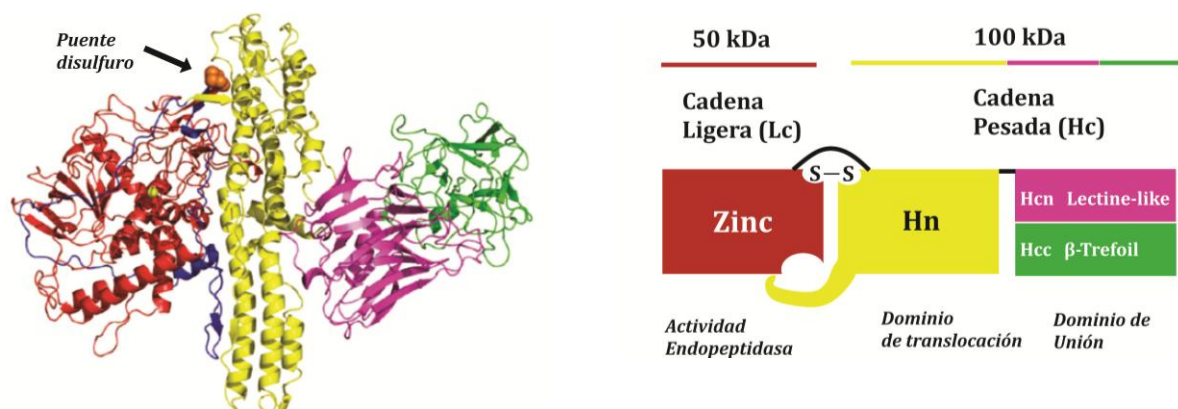
En la clínica para tratar la EP se han establecido diversas estrategias terapéuticas para la co-administración del PPX. Se ha realizado la administración del PPX con L-DOPA para retardar los efectos secundarios de la L-DOPA y han observado una disminución en las manifestaciones clínicas con este tratamiento (Brusa y cols., 2003). Sin embargo, en modelos animales se ha evidenciado que el tratamiento a largo plazo con L-DOPA y PPX disminuye la neurogénesis en ratas adultas y en particular el PPX tuvo efectos ansiolíticos y antidepresivos (Chiu y cols., 2015). Por otra parte, se han hecho investigaciones sobre los patrones de expresión génica en ratas lesionadas con 6-OHDA y el tratamiento con PPX y L-DOPA en el estriado. Se observó que en las transcripciones a nivel del ARNm relacionadas con el metabolismo oxidante y la función mitocondrial se expresaron mayormente en los tratados con L-DOPA que con PPX. Estos resultados sugieren que el rol del estrés oxidante en los efectos a largo plazo de la L-DOPA siguen siendo importantes para nuevas las estrategias terapéuticas con fármacos antiparkinsonianos (Taravini y cols., 2016).

Las investigaciones actuales en la coadministración de fármacos neuroprotectores en combinación con PPX han sido evaluadas como neuroprotectores en lapsos de 7 y 14 días previos a la lesión. Sin embargo, el efecto de los tratamientos en combinación ha sido como neuroprotector, aumentando los niveles de TH, DA, DAT, y disminución de marcadores con el EO (Sarkaki y cols., 2016). Es por ello que el enfoque de las estrategias terapéuticas debe ser complementado con estrategias tróficas que involucren la supervivencia, diferenciación y proliferación neuronal, como las neurotrofinas.

### **1.9 La toxina tetánica y la estructura del dominio C-terminal de la cadena pesada**

La toxina tetánica (TeTx) es una neurotoxina con naturaleza proteica producida por la bacteria *Clostridium tetani*, esta bacteria provoca la enfermedad del tétanos que se caracteriza por contracción muscular y espasmos recurrentes. La proteína que conforma la TeTx es clasificada como una metaloproteasa de Zn<sup>2+</sup> y está compuesta por 1315 aminoácidos. La TeTx se sintetiza como un polipéptido único y es modificado de manera post-traducciona para formar dos cadenas unidas por un puente disulfuro, la cadena pesada de 50 kDa y la cadena ligera de 100 kDa. Estructuralmente la TeTx se constituye por 3 dominios funcionales aproximadamente de 50 kDa cada uno; el dominio de unión, dominio de translocación y el dominio catalítico. El dominio catalítico se encuentra presente en la cadena ligera, mientras que la cadena

pesada se encuentra el dominio de unión y de translocación (Habermann y Dreyer, 1986; Pellizari y cols., 1999) (Figura 13).



**Figura 13. Estructura de la toxina tetánica.** A) Se muestra la estructura tridimensional esquematizado en colores los dominios proteicos. El dominio catalítico (rojo), el dominio de translocación (amarillo), el dominio de unión (verde, lila). B) Esquema de la estructura proteica de la cadena ligera (catalítico) y la cadena pesada (de unión-translocación) (Tomado y modificado de Calvo y cols 2012).

La TeTx se internaliza principalmente por las motoneuronas en la placa neuromuscular y es transportada retrógradamente hasta llegar al SNC. La actividad del dominio catalítico modulado por el metal  $Zn^{2+}$  escinde las proteínas SNARE (Factor soluble de unión al receptor), que interfieren con la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática y última instancia bloquean la liberación del neurotransmisor a nivel neuronal. Se ha estudiado el mecanismo de internalización celular y actividad catalítica de la TeTx (Johnson, 1999; Pellizari y cols., 1999) con los siguientes procesos bien caracterizados.

Una vez que la TeTx llega al citoplasma corta específicamente las proteínas neuronales que integran al tráfico vesicular y la liberación del neurotransmisor (Mochida, 2000). Particularmente, la TeTx se dirige a la proteína vesicular sináptica VAMP/sinaptobrevina. Esta proteína pertenece a la familia de proteínas que facilitan la exocitosis en las neuronas conocidas como proteínas SNARE, los otros miembros de esta familia son la syntaxina y SNAP-25. Las proteínas SNARE se forman mediante interacciones en espiral de la  $\alpha$ -hélice de sus miembros, que se requiere para la fusión de membrana. Por lo tanto la escisión proteolítica de VAMP/sinaptobrevina en la sinapsis de neuronas inhibitorias por parte de la cadena ligera, impide la liberación de neurotransmisores como el GABA y la glicina en la en la hendidura pre-sináptica dando como resultado la excitación de las motoneuronas y provocando espasmos tetánicos (Ungar y Hughson, 2003). Para conocer el mecanismo más detallado sobre los procesos que se involucran la unión y el transporte retrogrado de la toxina tetánica en las células neuronales, se realizaron estudios explorando principalmente el mecanismo de unión con el dominio C-terminal de la cadena pesada de la TeTx, o también conocido como el fragmento C-terminal de la toxina tetánica (Hc-TeTx).

### 1.9.1 Unión molecular del fragmento C-terminal de la toxina tetánica con la membrana celular

El primer paso en la internalización de la toxina tetánica está en la unión celular. Las *lipid rafts* son microdominios de la membrana plasmática enriquecida en esfingolípidos (los gangliósidos son miembros de este grupo de lípidos), el colesterol y las proteínas ancladas con glicosilfosfatidilinositol (GPI). Las balsas lipídicas se comportan como dominios especializados para la unión de la toxina tetánica y la internalización en las neuronas. En particular, los gangliósidos constituyen la parte principal de las membranas plasmáticas de mamíferos. Sus residuos de oligosacáridos y su ubicuidad en el folíolo externo de la membrana les permiten funcionar como transductores de señales (Calvo y cols., 2012). El dominio de unión al receptor, el fragmento Hc-TeTx contiene dos subdominios: un subdominio N-terminal de tipo lectina y un subdominio C-terminal beta-trefoil, unidos por una sola cadena. Cada uno de estos subdominios está compuesto por hojas beta unidas por bucles que sobresalen de la molécula. Se determinó por cristalografía de rayos X cuatro sitios de unión a carbohidratos: lactosa, galactosa, ácido siálico y N-acetil-galactosamina (NGA) (Emsley y cols., 2000). En particular, el subdominio beta-trefoil parece tener un papel más relevante que la subunidad tipo lectina que se demostró localizando los dominios de unión por medio de mutaciones del fragmento Hc-TeTx y los resultados mostraron que la unión se presentaba en la beta-trefoil (Sinha y cols., 2000).

### 1.9.2 Transporte retrogrado axonal del fragmento C-terminal de la toxina tetánica

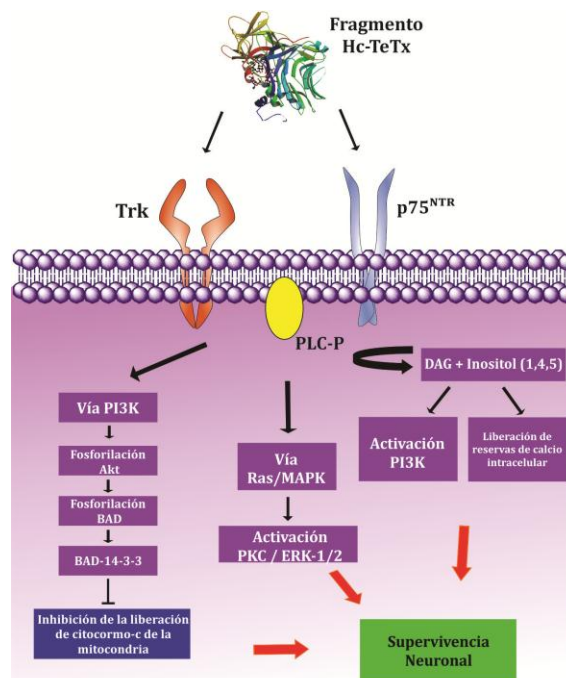
Debido a que la TeTx tiene la característica de poder ser transportada retrógradamente al sistema nervioso central desde el sistema circulatorio, la primera pregunta a responder para el fragmento Hc-TeTx fue saber si podría ser transportado por neuronas similar a la toxina nativa, evitando su toxicidad. El transporte trans-sináptico del fragmento Hc-TeTx fue estudiado en la vía visual primaria, lo que confirmó su capacidad como portador una vez que se inyectó por vía intramuscular (Evinger y cols., 1986; Fishman y cols., 1987). Además, el fragmento Hc-TeTx y el NGF comparten los mismos organelos de transporte retrógrado por medio de vesículas a lo largo de los axones, requiriendo proteínas como dineína (una proteína asociada a microtubulos) y miosina Va (una F-actina motora), lo que sugiere al receptor de neurotrofina p75<sup>NTR</sup> como el primer marcador de membrana de la vía endocítica retrógrada utilizada por el fragmento Hc-TeTx (Lalli y Schiavo, 2002). p75<sup>NTR</sup> es un receptor transmembrana para factores neurotróficos como el NGF, BDNF, neurotrofina-3 y neurotrofina-4/5. Además de la interacción con p75<sup>NTR</sup>, las neurotrofinas activan a la familia de receptores TrkA, TrkB y TrkC. Los dos receptores pueden funcionar de forma sinérgica, antagónica o independientemente entre sí en diferentes tipos de celulares (Ibáñez y Simi, 2012). La vía retrógrada del fragmento Hc-TeTx es compartida con p75<sup>NTR</sup>, TrkB y BDNF, que depende de la actividad de las GTPasas Rab5 y Rab7, lo que indica que al menos una porción del p75<sup>NTR</sup> es transportada hacia el soma sin sufrir escisión proteolítica. En particular, una disminución de la actividad de Rab7 inhibe el tráfico de transporte del

fragmento Hc-TeTx, p75<sup>NTR</sup> y TrkB (Deinhardt y cols., 2006). Diversas moléculas han sido transportadas exitosamente a las neuronas acoplándolas con el fragmento Hc-TeTx, incluyendo genes reporteros y moléculas terapéuticas. El uso del fragmento Hc-TeTx como portador de moléculas terapéuticas para el SNC fue propuesto por Bizzini y cols., en 1981. Desde entonces se han transportado diversas proteínas, incluso proteínas grandes de 150 kDa han sido transportadas por endocitosis a través del Hc-TeTx (Toivonen y cols., 2010).

Por otra parte, la posibilidad de construir quimeras con el fragmento Hc-TeTx, el transporte retrogrado del fragmento Hc-TeTx abrió un panorama amplio para la investigación para el descubrimiento de trazadores neuroanatómicos, cuyo objetivo principal fue mapear las conexiones sinápticas entre las células neuronales (Fishman y Savitt, 1989; Coen y cols., 1997). Sin embargo, el efecto del fragmento Hc-TeTx no solamente se limita en la utilización de la proteína como transportadora de moléculas hacia el SNC o como trazadores neuroanatómicos, sino que la molécula por sí misma puede participar en diferentes efectos al interactuar con diversas proteínas celulares (Francis y cols., 2004). El efecto que comparte la TeTx así como el fragmento Hc-TeTx y observadas en investigaciones *in vitro*, es la inhibición de la recaptura de serotonina (5-HT) incrementando los niveles de serotonina en el espacio sináptico.

### 1.9.3 El fragmento C-terminal de la toxina tetánica, la supervivencia celular y la neuroprotección

El efecto que resalta sobre la actividad del fragmento Hc-TeTx implica la activación de los receptores Trk que están estrechamente compartidos con los factores neurotróficos. La familia de las neurotrofinas ha demostrado regular la supervivencia, el desarrollo y los aspectos funcionales de las neuronas en el sistema nervioso central y periférico mediante la activación de uno o más de los receptores TrkA, TrkB, y TrkC, en conjunto con p75<sup>NTR</sup>. El grupo de trabajo de Aguilera, en 2001 determinaron la activación del fragmento Hc-TeTx y observaron la activación de vías intracelulares relacionadas con la fosforilación de PLC $\gamma$ -1 y la activación de isoformas de PKC y las quinasas Akt (en Ser 473 y Thr 308) y ERK-1/2 (en Thr 202/Tyr 204) por el fragmento Hc-TeTx en los sinaptosomas de cerebro de rata y en cultivos de neuronas corticales (Gil y cols., 2001, 2003). Esta activación de la vía de señal dependía del tiempo y la concentración, lo que sugiere que el fragmento Hc-TeTx podría ejercer efectos neuroprotectores sobre la activación de TrkA y TrkB receptores de manera similar a como NGF y BDNF o neurotrophin-4/5 (Toivonen y cols., 2010; Calvo y cols., 2012) (Figura 14).



**Figura 14. Vía de señalización del fragmento Hc-TeTx.** Se muestra un esquema de la vía de señalización cuando el fragmento Hc-TeTx interactúa con los receptores a neurotrofinas Trk y p75NTR por medio de la activación de la vía IP3K/Akt, MAPK y PLC. (Tomado y modificado de Calvo y cols 2012).

La señalización a través de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI-3K), seguido de la activación de Akt/GK3 $\beta$  mediada por PI-3K, es el principal regulador de la supervivencia neuronal. Adicionalmente, la protección contra la lesión y la toxicidad celular parece estar controlada por la vía MAPK/ERK. Debido a que el fragmento Hc-TeTx actúa de manera similar a las neurotrofinas es capaz de promover supervivencia celular, neuroprotección en modelos de estrés celular y en modelos de daño dopaminérgico *in vitro* (Chaib-Oukadour y cols., 2004; 2009) (Figura 13).

En modelos *in vivo* el fragmento Hc-TeTx ha mostrado ejercer su efecto neuroprotector ante lesiones cerebrales como lo muestra Mendieta y cols., en el 2009. Ellos mostraron el efecto del fragmento Hc-TeTx administrando 2 $\mu$ M intraestriatal en ratas lesionadas con MPP<sup>+</sup> y observaron que inducía una neuroprotección, mejorando las habilidades motoras finas, el restablecimiento de la asimetría motora en el modelo del cilindro, así como los niveles de dopamina y sus metabolitos (Mendieta y cols., 2009). Particularmente, las características en las propiedades del fragmento Hc-TeTx permiten la internalización al SNC por medio de la unión a los receptores a gangliosidos, fue por ello, que posteriormente se evidenció la neuroprotección ante la lesión dopaminérgica con 6-OHDA mediante la inyección intramuscular del fragmento Hc-TeTx (20 $\mu$ g/kg). Mendieta y cols., en el 2012 determinaron el efecto en la mejora de las conductas motoras y la disminución del proceso degenerativo de las neuronas nigro-estriatales en animales tratados con 6-OHDA (Mendieta y cols., 2012). Posteriormente, cuando se evidenció el efecto neuroprotector

del fragmento Hc-TeTx con la administración intramuscular 3 días previos a la lesión dopaminérgica; Sánchez-González en el 2014 demostró que la inyección intramuscular del fragmento Hc-TeTx 8 días posterior a la lesión con 6-OHDA, el fragmento proteico promueve mecanismos restauradores reflejado en una mejoría de la conducta motora y disminución de la muerte neuronal en la vía nigro-estriatal.

Es importante mencionar que el fragmento Hc-TeTx es capaz de ejercer su acción neuroprotectora frente a otros modelos de toxicidad como las metanfetaminas y efectos excitotóxicos (Herrando y cols., 2012; Radenovich y cols., 2014; Mendieta y cols., 2016). Herrando-Grabulosa y colaboradores en el 2012, determinaron el efecto del fragmento Hc-TeTx ante la lesión de cultivos organotípicos de la espina dorsal mediante la excitotoxicidad por glutamato. Observaron que la neuroprotección se lleva a cabo en una ventana terapéutica corta (las primeras 2 h de la lesión), durante este intervalo se demostró que las vías de señalización involucradas en la supervivencia neuronal ante la lesión mediada por glutamato es mediante la activación de ERK1/2 y la fosforilación de GSK-3 $\beta$  Ser9. Además se demostró que la administración del fragmento Hc-TeTx inicia la autofagia dependiente de ERK1/2 y GSK-3  $\beta$ . Por lo tanto es importante mencionar que la activación de los receptores Trk modulan la neuroprotección ante la excitotoxicidad y probablemente ante el estrés oxidante.

Radenovich y colaboradores en el 2014 mostró el efecto neuroprotector en un modelo de isquemia cerebral global en jerbos; este modelo se caracteriza en particular por generar una disfunción bioquímica al generar ROS, LPX y oxidación al DNA (Bazan y cols., 2005, Ohtaki y cols., 2007), por lo que en los estudios previos con el fragmento Hc-TeTx realizados en modelos de esclerosis lateral amiotrófica (Moreno-Igoa y cols., 2010) y en modelos de la Enfermedad de Parkinson con MPP<sup>+</sup> y 6-OHDA (Mendieta y cols., 2009, 2012; Sánchez González, 2014) mostraron neuroprotección con neurotóxicos altamente oxidantes. Los resultados de Radenovich demostraron que la administración del Fragmento Hc-TeTx 4 días previos a la lesión disminuía los niveles de  $\cdot$ ON, el O<sub>2</sub><sup>-</sup> y los niveles de la LPX, además de incrementar la actividad de la SOD en Corteza, estriado, hipocampo y cerebelo a las 2, 5, 24 y 48 hrs después de la lesión. Estos hallazgos permiten sugerir que el fragmento Hc-TeTx puede tener un efecto antioxidante en su mecanismo de acción, probablemente en la activación de los receptores a neurotrofinas Trk.

## **II. JUSTIFICACIÓN**

La neuroprotección observada experimentalmente en roedores ha sido caracterizada en los últimos años y se han encontrado efectos positivos para la supervivencia neuronal en diferentes condiciones. Sin embargo, la administración sistémica de las neurotrofinas ha sido poco utilizada debido a su vida media corta, los efectos a corto plazo e incluso por la dificultad en su administración por no cruzar la barrera hematoencefálica. Un agente facilitador, de tipo no viral, que permite el acceso hacia SNC es el fragmento Hc-TeTx. Figueredo y colaboradores en 1997 administraron el fragmento Hc-TeTx con la finalidad de transportar una proteína de alto peso molecular, y ello permitió su liberación y efectos antioxidantes en el cerebro de ratas. Posteriormente el fragmento Hc-TeTx fue descrito como un fármaco que podía activar las mismas vías de señalización de las neurotrofinas, específicamente las vías Trk. Estos efectos le confirieron una acción sobre la supervivencia, diferenciación y proliferación neuronal, (Gil y cols., 2003; Chaïb-Oukadour y cols., 2004). Otros estudios en modelos animales de la EP describieron que el tratamiento con Hc-TeTx causa protección y neurorestauración ante una lesión dopaminérgica (Mendieta y cols., 2012; Sánchez-González y cols., 2014; Mendieta y cols., 2016). Además de estos efectos, se ha mostrado que puede tener efectos antioxidantes en un modelo de isquemia (Radenovich y cols, 2014), lo cual sugiere que puede ser un reductor del estrés oxidante. Sin embargo, hasta el momento los efectos antioxidantes del Hc-TeTx en modelos animales de EP no han sido estudiados.

Por otra parte, entre las alternativas farmacológicas durante los estados tempranos de la EP los agonistas dopaminérgicos han mostrado resultados favorables debido a que retardan la administración de L-DOPA y sus efectos adversos como la aparición de discinesias (Huble y Novak, 2001). Estudios recientes han propuesto al PPX, un agonista de los receptores D2/D3, con efectos neuroprotectores dependientes de la activación del receptor D3 (Li y cols., 2010) y con actividad antioxidante independiente de su acción agonista (Le y cols., 2000; Ramírez y cols., 2003). Estas características particulares del PPX han dado nuevos panoramas sobre su acción trófica y han surgido nuevas preguntas sobre sus beneficios en el sistema dopaminérgico.

Con lo anteriormente expuesto, proponemos que el co-tratamiento con el fragmento Hc-TeTx más PPX reducen el estrés oxidante que se genera por la administración del neurotóxico 6-OHDA. También se propone que el co-tratamiento con Hc-TeTx más PPX pueda causar mejorías en las conductas motoras en las ratas hemiparkinsonianas.

### III. HIPOTESIS

El tratamiento con el fragmento C-terminal de la toxina tetánica más el pramipexol reduce el estrés oxidante y mejora las conductas motoras en ratas hemiparkinsonianas.

### IV. OBJETIVOS

#### 4.1 OBJETIVO GENERAL

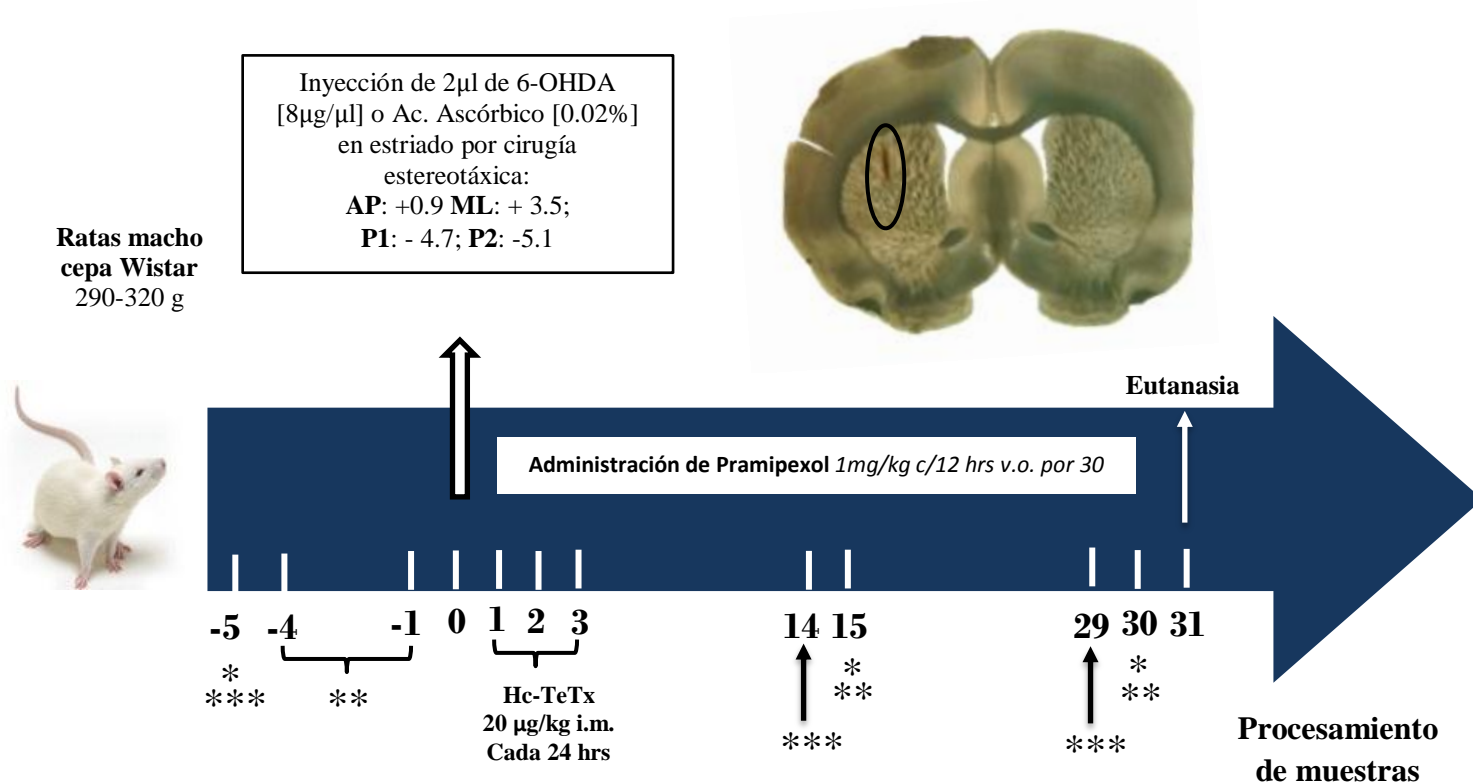
Evaluar el efecto del tratamiento con el fragmento C-terminal de la toxina tetánica más el pramipexol sobre el estrés oxidante y las conductas motoras en ratas con 6-hidroxidopamina.

#### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto del tratamiento con el fragmento C-terminal de la toxina tetánica más el pramipexol sobre la asimetría, la coordinación y la actividad motora en ratas lesionadas con 6-hidroxidopamina.
2. Evaluar el efecto del tratamiento con el fragmento C-terminal de la toxina tetánica más el pramipexol sobre la inmunorreactividad de la tirosina hidroxilasa en el estriado y la sustancia *nigra pars compacta* de ratas con 6-hidroxidopamina.
3. Evaluar el efecto del tratamiento con el fragmento C-terminal de la toxina tetánica más el pramipexol sobre las especies reactivas de oxígeno y la peroxidación lipídica en el estriado de ratas lesionadas con 6-hidroxidopamina.
4. Evaluar el efecto del tratamiento con el fragmento C-terminal de la toxina tetánica más el pramipexol sobre la actividad de la superóxido dismutasa en el estriado de ratas lesionadas con 6-hidroxidopamina.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Diagrama de Trabajo



### EVALUACIÓN DE MODELOS CONDUCTUALES:

- \* Modelo del cilindro
- \*\* Modelo de la viga
- \*\*\* Cajas de actividad motora en campo cerrado

### PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA DETERMINACIÓN DE:

- ✓ Especies reactivas de oxígeno (ROS)
- ✓ Peroxidación de lípidos (LPX)
- ✓ Actividad de la SOD Cu/Zn y SOD Mn
- ✓ Inmunorreactividad para TH

### GRUPOS EXPERIMENTALES:

- Intactos
- Ac. Ascórbico + SSI
- 6-OHDA+SSI
- 6-OHDA + PPX (1.0 mg/kg v.o. c/12 h)
- 6-OHDA + Hc-TeTx (20µg/kg i.m. c/24 h por 3 días)
- 6-OHDA + Hc-TeTx + PPX (1.0 mg/kg + 20µg/kg)

## 5.2 Sujetos de experimentación

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 280-340 g de peso. Todas las ratas fueron proporcionadas por el Bioterio *Claude Bernard* de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los animales fueron separados por cajas individuales y sometidos a una temperatura constante de  $22 \pm 3$  °C, un ciclo luz oscuridad 12/12 h (7:00 h), agua y alimento *ad libitum*. Además se realizó un protocolo de *handling* para disminuir el estrés generado *persé* a la separación y nuevo entorno de las ratas. Todos los procedimientos experimentales fueron realizados de acuerdo a lo establecido por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y por el Comité interno para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL) de la BUAP.

## 5.3 Preparación de sustancias para utilizar en los tratamientos

### 5.3.1 Fragmento Hc-TeTx

El fragmento Hc-TeTx fue donado por el grupo del Dr. José Aguilera de la Universidad Autónoma de Barcelona, España. La síntesis del fragmento Hc-TeTx se realizó de acuerdo al protocolo reportado por Gil y cols 2003, se obtuvo un liofilizado con un grado de pureza de  $99\% \pm 1$  y una estabilidad a largo plazo. El liofilizado se almacenó en viales con 1 mg de Hc-TeTx el cual se mantuvo almacenado  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se realizaron las diluciones para alcanzar una concentración de 0.1 mg/ml.

### 5.3.2 Pramipexol

Se utilizó el medicamento Sifrol<sup>®</sup> (Boehringer Labs) en tabletas de 1mg de PPX. El medicamento fue administrado como una suspensión oral en solución salina isotónica al 0.9% utilizando una cánula esofágica para roedores de acero inoxidable (16G X 3"). El pramipexol (PPX) fue dosificado a 1mg/kg vía oral y fue administrado cada 12 hrs durante 30 días.

## 5.4 Cirugía estereotáxica

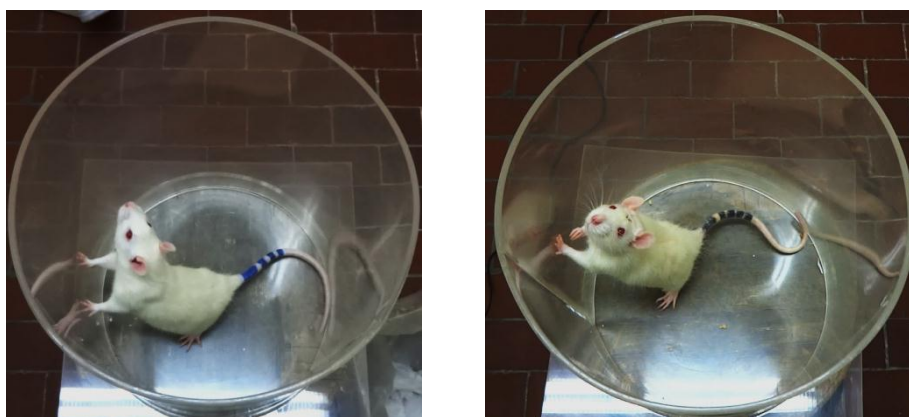
Para realizar la cirugía estereotáxica se sometió a anestesia cada sujeto experimenta con Ketamina - Xilacina (75mg/kg - 10 mg/kg, respectivamente) vía intraperitoneal. Una vez anestesiada la rata se realizó la preparación de asepsia y antisepsia en la zona craneal a incidir. Se colocó la cabeza del animal en el estereotáxico para realizar la cirugía y localizar bregma, se utilizaron las siguientes coordenadas de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson, 1998 para localizar el estriado dorsolateral: (AP: +0.8, L: +3.8, P1: -4.9 P2: -5.3). Posteriormente localizado el sitio de inyección y se realizó la trepanación del cráneo para poder introducir la cánula de administración. Se administró 1 $\mu\text{L}$  de 6-OHDA (8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) o ácido ascórbico [0.02%] para la profundidad 1 (P1), con uso de una jeringa Hamilton<sup>®</sup> acoplada a una bomba de infusión a una

velocidad de 0.2  $\mu$ l/min. Una vez administrado el neurotóxico se esperaron 5 min para continuar con la administración de 1 $\mu$ l en el estriado dorsolateral a la profundidad 2 (P2). Todas las ratas tuvieron un tratamiento post-operatorio con antibiótico, enrofloxacina (7.5 mg/kg) y antiinflamatorio/analgésico, ketoprofeno (5 mg/kg). Se formaron 6 grupos experimentales: Intactos, vehículo+SSI, 6-OHDA+SSI, 6-OHDA+Hc-TeTx, 6-OHDA+PPX, 6-OHDA+Hc-TeTx+PPX.

## **5.5 Modelos conductuales**

### **5.5.1 Modelo del Cilindro**

El modelo del cilindro propuesto por Scharllert y Tillerson en 1999, es un modelo empleado para evaluar la asimetría motora en ratas con lesión dopaminérgica en la vía nigro-estriatal inducido con 6-OHDA. El cilindro empleado tiene una altura de 30 cm de altura y 20 cm de diámetro y está hecho de acrílico transparente. La evaluación en el modelo del cilindro se realizó cinco días previos a la lesión para obtener los niveles basales de su conducta sin lesión, así como a los 15 y 30 días posteriores a la lesión para determinar el grado de asimetría motora inducido por la 6-OHDA. La conducta exploratoria se videograbó para registrar la conducta exploratoria; el protocolo del modelo consistió en colocar una rata dentro de un cilindro de acrílico, posteriormente se cuantificó el número de contactos realizados en la pared: simultáneos (utilizando ambas patas), contralaterales (pata derecha) e ipsilaterales (pata izquierda) en un lapso de cinco minutos. Las ratas que realizaron menos de 10 toques independientes sobre la pared del cilindro fueron excluidas, debido a que menos de 10 toques no permitieron obtener un estimado veraz de la simetría en el uso de ambas patas.

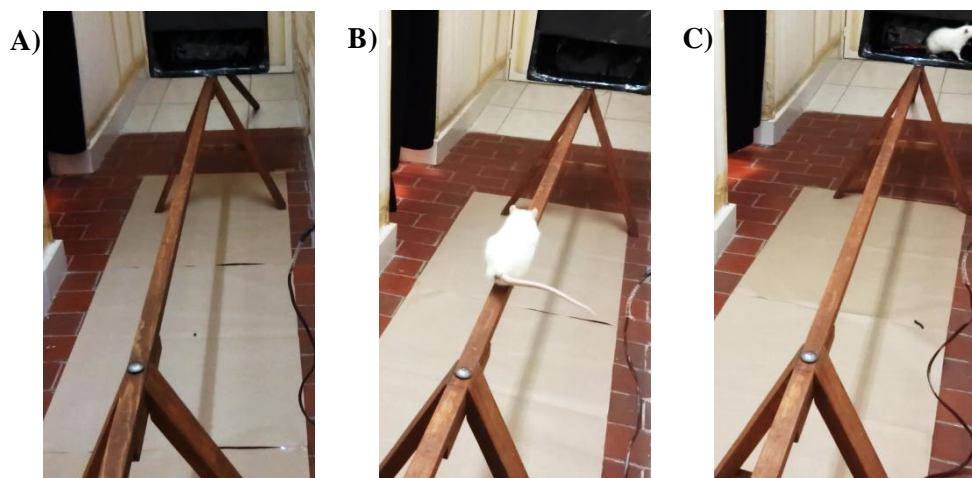


**Figura 15. Modelo del cilindro para evaluar asimetría motora.** A) Se ejemplifica el toque de la pared del cilindro con ambas patas en una rata sin lesión. B) Se muestra una rata lesionada con 6-OHDA y se observa el uso de la pata ipsilateral a la lesión, la pata contralateral no la usa para explorar la pared del cilindro debido al efecto tóxico de la 6-OHDA.

### 5.5.2 Modelo de la viga

El modelo de la viga es una prueba conductual utilizada para evaluar la coordinación motora en ratas y determinar si presentan alteraciones en el comportamiento motor (Metz et al., 1998; Biernaskie et al., 2004; Allbut y Henderson, 2007). La viga que se utilizó está hecha de madera, sus medidas son de 1.6 m de longitud, con un grosor de 4 x 4 cm de ancho, la viga está colocada en dos soportes de madera con una altura de 60 cm entre la viga y el piso. El protocolo se realizó de acuerdo con lo reportado por Allbut y Henderson en el 2007. Durante la prueba se videograbó la ejecución de cada animal; y se realizó el siguiente protocolo: cada rata se colocó en un extremo de la viga para que pudiera llegar hacia su objetivo, una caja oscura que se encontró en el otro extremo de la viga, una vez colocada en la viga se midió el tiempo para su travesía. Un estímulo que recibieron para que la rata pudiera avanzar fue por medio de toques en la grupa de la rata con los dedos del experimentador. El tiempo estimado para que las ratas cruzaran la viga fue de dos minutos.

Una vez que la rata cruzó la viga, el primer cruce se tomó como el primer ensayo; se realizaron cuatro ensayos en una sesión por día. El entrenamiento para cruzar la viga fue de 4 sesiones (cuatro días previos a la lesión) y posteriormente se evaluaron tres ensayos al día 15 y tres ensayos al día 30 post-lesión. Una vez registradas y videograbadas las sesiones se determinó la latencia para cruzar la viga, el número de pasos y el número de errores al cruzar la viga.



**Figura 16. Modelo de la viga para evaluar coordinación motora.** A) Se muestra el modelo de la viga de madera desde el primer extremo hasta el extremo final con la caja oscura, la distancia es de 1.6 metros. B) y C) Se muestra una rata durante la travesía por la viga y su permanencia en la caja oscura.

### 5.5.3 Cajas de actividad motora en campo cerrado

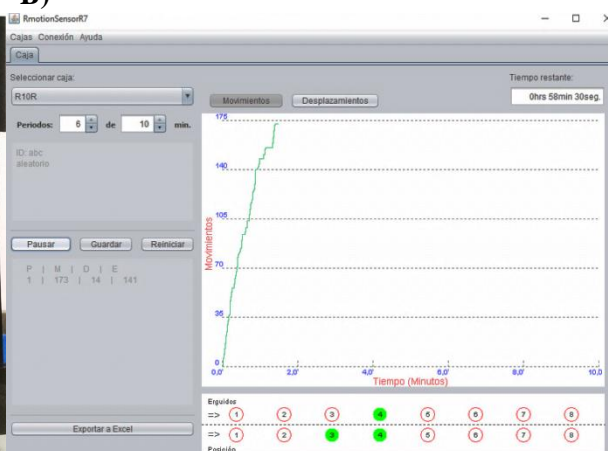
Las cajas de actividad motora en campo cerrado (CAMC) fueron utilizadas para determinar los movimientos gruesos que realiza la rata en un ambiente oscuro, estos movimientos pueden ser realizados de

forma espontánea sin ningún factor externo que influya en la ejecución de sus movimientos. La conducta evaluada en la CAMC se realizó mediante un sistema computacional que determina el número de movimientos, desplazamientos y erguidos de forma automática por medio del Software RmotionSensor iDEC. Las mediciones que se realizan en las CAMC es posible mediante la interrupción de fotodiodos que se encuentran dentro de las cajas en sus paredes laterales, posee ocho fotodiodos de lado izquierdo y de lado derecho a nivel de la base de la caja, que permite cuantificar los movimientos y desplazamientos, además de poseer ocho fotodiodos más en la parte superior de la caja que permite registrar los erguidos que realiza la rata. La prueba en las CAMC se realizó por tres ocasiones durante el experimento. El protocolo para la utilización de las CAMC se realizó de acuerdo con lo reportado por Ramírez-García y cols., en el 2015. Se registraron los movimientos, desplazamientos y erguidos acumulados en seis periodos de diez minutos. Se cuantificaron estos parámetros cinco días previos a la lesión para determinar su comportamiento motor basal, y posteriormente a los 14 y 29 días post-lesión se evaluó el efecto de la 6-OHDA y el co-tratamiento farmacológico.

A)



B)



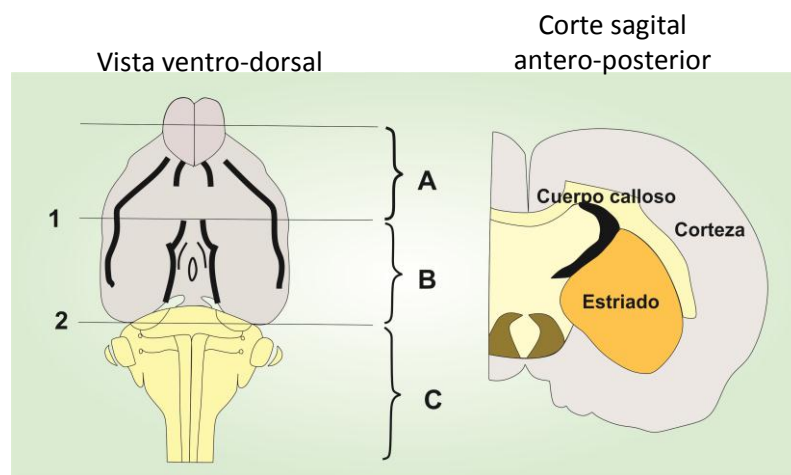
**Figura 17. Evaluación de la actividad motora en cajas de actividad motora en campo cerrado.** A) Se muestran las cajas de actividad motora en campo, internamente se observan los ocho fotodiodos en la parte basal y superior de la caja que permite la cuantificación por medio del software. B) Se ejemplifica la cuantificación realizada por el programa RmotionSensor que evalúa los movimientos, desplazamientos y erguidos en función del tiempo.

## 5.6 Pruebas bioquímicas

### 5.6.1 Obtención de cerebro y extracción de núcleos

Después de realizar el tratamiento farmacológico y al día siguiente de la evaluación conductual se realizó la eutanasia de los sujetos experimentales. Una vez que se realizó la decapitación se extrajo rápidamente el cerebro, la extracción de núcleos se realizó en condiciones frías con hielo seco y solución amortiguadora de fosfatos (PBS pH=7.4) a 4°C para preservar la muestra. Se lavó continuamente el tejido

cerebral con PBS y cortando cuidadosamente con pinzas de disección de punta fina se obtuvieron los núcleos de interés: estriado y corteza frontal. Para extraer el núcleo estriado se separa el rombencéfalo del resto del cerebro, posteriormente se realiza el corte transversal a nivel del quiasma óptico que pasa a través de la comisura anterior que delimita el lóbulo frontal y el cerebro medio. Tanto el estriado como la corteza frontal se extraen del lóbulo frontal. Posteriormente se realizó el pesaje en una báscula analítica y se almacenaron los núcleos cerebrales en un ultracongelador (Panasonic®) de -80 °C para su posterior análisis.



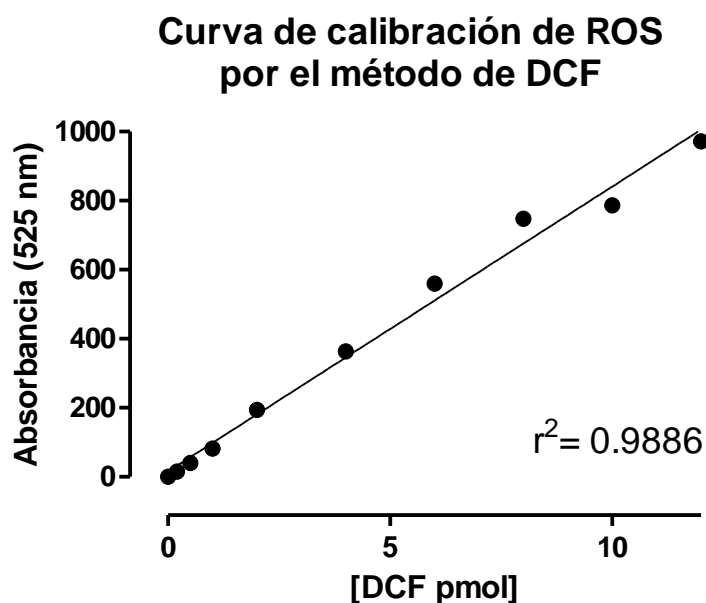
**Figura 18. Planos anatómicos para la extracción de núcleos.** Se muestra el encéfalo de la ratona con vista ventro-dorsal y se muestran tres divisiones: A) lóbulo frontal, B) cerebro medio, C) rombencéfalo. La línea 1 corresponde a la división entre A y B a nivel de la comisura anterior, 2 corresponde a la división de B y C a nivel del cerebelo, médula y encéfalo. En el corte sagital se muestra la porción del estriado y la corteza.

### 5.6.2 Determinación de las especies reactivas de oxígeno

Posterior a la obtención y almacenamiento de las muestras para las pruebas bioquímicas (n=6 por grupo), se realizó la determinación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) como lo reportado por Pérez-Severiano y cols., en el 2004, por el método espectrofluorométrico. Este método se basa en utilizar el fluoróforo 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCF-DA); este compuesto DCF-DA tiene la facultad de atravesar la membrana celular, debido a su característica apolar, dentro de la célula es deacetilado por las esterasas para convertirse en 2',7'-diclorofluoresceína. DCF es oxidada por los oxidantes intracelulares, particularmente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dando como resultado la fluorescencia detectada a una longitud de onda de emisión de 525 nm y una longitud de onda de excitación de 488 nm.

Se realizó una curva de calibración mediante la elaboración de un conjunto de soluciones seriadas con las siguientes concentraciones de DCF: [0.2, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 pmol] que se encontraban en [0.08, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 y 4.8 ng/200µl de buffer TRIS:HEPES (9:1)], respectivamente. El blanco en lugar de DCF se añadió 2µl de MeOH más 198µl del buffer Tris:HEPES. Cada una de las soluciones seriadas se

colocó en los pozos de la microplaca por duplicado. En los pozos restantes se colocaron 145µl del buffer TRIS:HEPES (18:1) más 50 µl de DCF-DA (50µM) más 5µl de las muestras con dilución 1:10. Una vez realizado este procedimiento, se procedió rápidamente a incubar la microplaca a 37°C por 60 min en un lector de ELISA (FLx800, BIOTEK instruments®) a 525 nm. Los resultados son expresados como pmoles de 2',7'-diclorofluoresceína/mg de proteína/min.



**Figura 19. Curva de calibración de ROS.** Se muestra la absorbancia de los niveles de fluorescencia que emite la diclorofluoresceína (DCF) a diferentes concentraciones 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 pmoles de DCF. La longitud de onda que se utilizó fue de 525 nm.

### 5.6.3 Determinación de la Peroxidación lipídica

Las muestras fueron homogenizadas con solución salina isotónica al 0.09% en un homogenizador de vidrio teflón (n=6 por grupo), se colocó la muestra y 3 ml de solución salina. Una vez homogenizado el tejido se realizó la técnica espectrofluorométrica para determinar los niveles de peroxidación lipídica (LPX) y se midió por medio de la formación de fluorescencia en los lípidos solubles como se estableció por Triggs y Willmore en 1984. Se toma 1 ml de la muestra y se añade 4 ml cloroformo:metanol (2:1), posteriormente se agita en un vortex de forma vertical. Una vez realizado este procedimiento se incubó a 4°C por 30 minutos y en oscuridad, transcurrido el tiempo se formaron dos fases, una turbia (superior) y una clara (inferior). Se realizó la aspiración de la fase superior cuidadosamente por medio de una bomba de vacío para obtener solamente la fase inferior que contiene cloroformo, en la celda de cuarzo se añade 2 ml de la muestra más 200 µl de MeOH. La fluorescencia de la fase del cloroformo se determinó en un espectrofluorómetro (PERKIN ELMER®) a una longitud de onda de 370 nm de excitación y una longitud de onda de 430 de emisión; la

calibración del espectrofluorómetro se ajustó a 140 unidades de fluorescencia con la solución de calibración. Todas las muestras se ajustan al blanco, que en lugar de la muestra se añadió agua destilada más cloroformo:metanol (2:1). Así mismo, el control positivo se obtuvo de una solución de 50µl de quinina en 50ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.05 M). Los resultados fueron expresados como Unidades de Fluorescencia Relativa/mg de proteína.

#### **5.6.4 Determinación de la Actividad de la SOD**

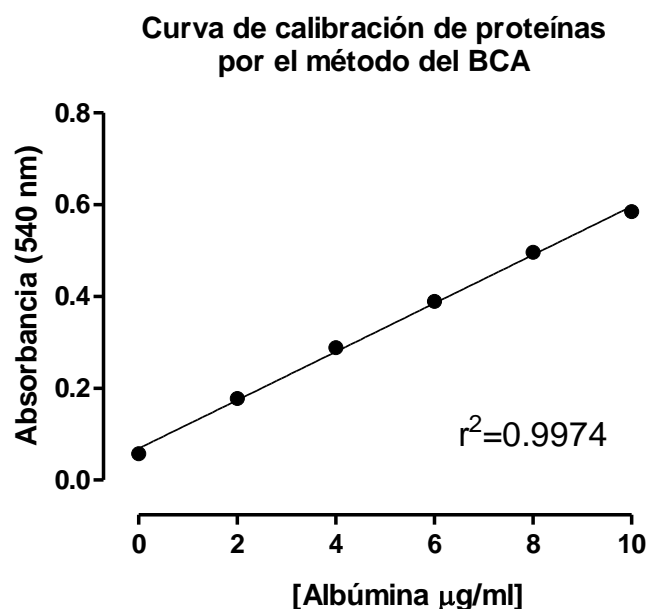
La actividad de la SOD se realizó por medio de un método espectrofotométrico como lo reporta Schwartz y cols en 1998. El fundamento de la técnica se basa en la reducción que sufre el citocromo C por parte del O<sub>2</sub><sup>-</sup>, que es el producto de la reacción de la xantina oxidasa (XO) con la xantina, cuando la SOD dismuta el anión O<sub>2</sub><sup>-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibe la interacción del O<sub>2</sub><sup>-</sup> con el citocromo C, por lo tanto la actividad se determina mediante una inhibición competitiva. Se prepararon las siguientes soluciones para realizar la técnica de la actividad de la SOD: la solución de sustratos que contenían: xantina 100µM, azida de sodio 10µM, EDTA 1mM en Buffer de carbonatos 20mM, pH10.2 y en tritón al 0.02%, esta solución se mantuvo a 37°C; la solución de la enzima XO: 3.4mg de XO y EDTA 0.1mM y se mantuvo en frío. La homogenización de los tejidos cerebrales (n=5 por grupo) se realizó en cinco volúmenes del Buffer de carbonatos (pH10.2) y seis golpes en el homogenizador de vidrio teflón, posteriormente se centrifugó a 140000 g y se utilizó el sobrenadante.

Para realizar la lectura de la actividad de la SOD se depositaron en una celda de cuarzo 20µl de la muestra, 2.85 ml de la solución de sustratos, posteriormente y para iniciar la reacción se depositó 50µl de la XO, se agitó y se colocó en el lector espectrofotométrico UV visible (PERKIN ELMER®) a 550nm, para ajustar el espectrofotómetro el autozero se realizó con agua destilada; la lectura que se realizó cada 30 segundos durante tres minutos. Para realizar la lectura del blanco, se realizó el mismo procedimiento en excepción de la muestra y en su lugar se colocó 20µl de agua destilada. Para determinar la actividad de las isoformas de la SOD se realizó mediante la inhibición de la SOD-Cu/Zn con cianuro de potasio (KCN) y obtener la actividad de la SOD-Mn. La diferencia entre la SOD total y la SOD-Mn corresponde a la actividad de la SOD-Cu/Zn.

#### **5.6.5 Determinación de proteínas por el método del ácido bicinconínico**

Se realizó la determinación de proteínas por el método del ácido bicinconínico (BCA) para la normalización de los resultados de los niveles de ROS y de la LPX. Este método determina la reacción de las proteínas con cobre oxidado Cu<sup>+2</sup> en un medio alcalino para producir cobre reducido Cu<sup>+</sup> (reacción de Biuret). Debido a que el BCA es un reactivo sensible y específico para el ión Cu<sup>+</sup>. El producto de la reacción

presenta un color púrpura formado por la interacción de dos moléculas de BCA con el ión  $\text{Cu}^+$ . Se realizó una curva de calibración, utilizando los estándares de diferentes soluciones con concentraciones de albúmina de suero de bovino (ABS) [2, 4, 6, 8, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] en la microplaca se adicionó 100  $\mu\text{l}$  de agua desionizada, 100  $\mu\text{l}$  de las soluciones seriadas por duplicado y 100  $\mu\text{l}$  de la muestra (relación 1:100). Posteriormente se añadió 100  $\mu\text{l}$  de la solución BCA a todos los pozos. Para la determinación de la absorbancia, se realizó la lectura en un lector automático de microplacas de ELISA (FLx800, BIOTEK instruments<sup>®</sup>) a una longitud de onda de 540 nm.



**Figura 20. Curva de calibración de proteínas.** Se muestra la absorbancia que emiten las proteínas con la reacción que provoca el BCA a diferentes concentraciones de ASB 2, 4, 6, 8, 10  $\mu\text{g}$ , la longitud de onda que se utilizó fue de 540 nm.

### 5.7 Determinación de la TH en estriado y SNpc por la técnica de inmunohistoquímica

Posterior a las pruebas conductuales, se realizó el sacrificio de las ratas ( $n=5$ ) para la determinar la expresión de la TH en la SNpc y el estriado. Las ratas fueron sacrificadas por medio de una sobredosis de pentobarbital sódico y se realizó la perfusión intracardiaca con 100ml solución salina isotónica al 0.9% y 200 ml paraformaldehído al 4% (PFA) en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (PBS) y posteriormente se extrajo el cerebro y se almacenó en PFA al 4% durante 24 h. Una vez transcurridas las 24 hrs los cerebros fueron cortados en vibratomo (Leica VT 1000 systems<sup>®</sup>) realizando cortes de 60  $\mu\text{m}$  para el estriado y SNpc. La técnica se realizó mediante el siguiente protocolo como se reporta por Mendieta y cols 2016.

Se seleccionaron seis tejidos para estriado y seis tejidos para SNpc por rata, cada uno de estos con una diferencia de 240 micras para cubrir todo el núcleo obtenido. Los tejidos fueron colocados en placas de 12 pozos, seis tejidos por pozo, y se realizaron 3 lavados con PBS-Tritón (al 0.2% durante 10 min cada uno a temperatura ambiente, una vez lavados fueron incubados en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% y en PBS-Tx durante 10 min para eliminar peroxidasa endógena. Los tejidos fueron lavados tres veces en PBS-Tritón durante 10 min cada uno. Posteriormente se realizó el bloqueo con NGS al 5 % durante 10 min. Una vez que se lavaron los tejidos tres veces con PBS-Tritón durante 10 min cada uno, se incubaron los tejidos con el anticuerpo primario Anti-TH rabbit (Millipore<sup>®</sup>, 1:1000) durante 2 noches. Se realizaron los tres lavados con PBS-Tritón durante 10 min cada uno y se realizó la incubación del anticuerpo secundario biotinilado Anti-mouse (Jackson labs<sup>®</sup>, 1:500) por una hora. Después de los lavados correspondientes con PBS-Tritón los tejidos fueron incubados con estreptavidina acoplado a HRP (Jackson labs<sup>®</sup>, 1:5000) por una hora, se realizaron tres lavados con PBS sin tritón y posteriormente se realizó el revelado con diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) [50mg/100ml] y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% para realizar la reacción colorimétrica mediante el HRP. Se midió el tiempo para evidenciar el marcaje de la reacción y se determinó 6 min para SNpc y 8 min para estriado. Al terminar, los tejidos fueron montados en portaobjetos y se dejaron secar los tejidos durante 24 hrs para posteriormente llevar a cabo la deshidratación. Este último proceso consistió en pasar las muestras por una batería de soluciones de etanol con las siguientes concentraciones: 80%, 90%, 100% etanol 100%:xilol 100% y xilol 100%. Las muestras se cubrieron con resina y posteriormente se cubrieron con cubreobjetos. Finalmente, los estriados y SNpc fueron observados en un microscopio de campo claro (Leica DM 750<sup>®</sup>) y las fotografías fueron tomadas con una cámara digital acoplada (Leica ICC50<sup>®</sup>) con los objetivos 10x, 40x y 100x para el panel de fotografías y 10x para la cuantificación de las células positivas a TH.

### 5.7.1 Técnica para cuantificación de imágenes por densidad óptica

Se realizó la cuantificación de la inmunorreactividad para la TH por medio de la densidad óptica en las fibras-terminales nerviosas en el estriado. Se cuantificó en el Software IMAGEJ<sup>®</sup>, siguiendo el protocolo como lo reporta Mendieta y cols., 2016. Una vez realizada la inmunohistoquímica y teniendo las laminillas montadas en resina se tomaron imágenes en microscopio de campo claro (Leica DM 750<sup>®</sup>) con objetivo 1.5x a lo largo del eje rostro caudal. Se transformaron las fotos a escala de grises 8bits, posteriormente se dibujó el contorno de la zona a medir del estriado, se dibujaron los umbrales y se ajustó el *dark background* para que quedara sólo la zona teñida con TH, este procedimiento se realiza con las laminillas del grupo control (Intacto) y se toma este ajuste para realizar el *dark background* a las demás laminillas. Una vez realizado este proceso se procedió a realizar el análisis para obtener el porcentaje de área teñida y se realizó la medición que realiza el software de manera automática. Los resultados se grafican con el porcentaje de área teñida con respecto a los grupos experimentales 30 días posterior a la lesión y el tratamiento farmacológico

### **5.7.2 Técnica para cuantificación de imágenes por número de células positivas a TH**

La cuantificación para las células positivas a TH (TH+) en la SNpc, se utilizó el software IMAGEJ<sup>®</sup>. Las fotografías se tomaron con el microscopio de campo claro (Leica DM 750<sup>®</sup>) con el objetivo 10x para tener una imagen completa de la SNpc. Una vez capturadas las imágenes se realizó el siguiente procedimiento. Se transformaron las fotos mediante la inversión de imagen, una vez invertida se ajustó el contraste para determinar el cuerpo neuronal de las neuronas TH+. Una vez evidenciado el cuerpo neuronal se realizó la cuantificación de forma manual con la herramienta multi point. Los resultados se grafican como número de neuronas TH+.

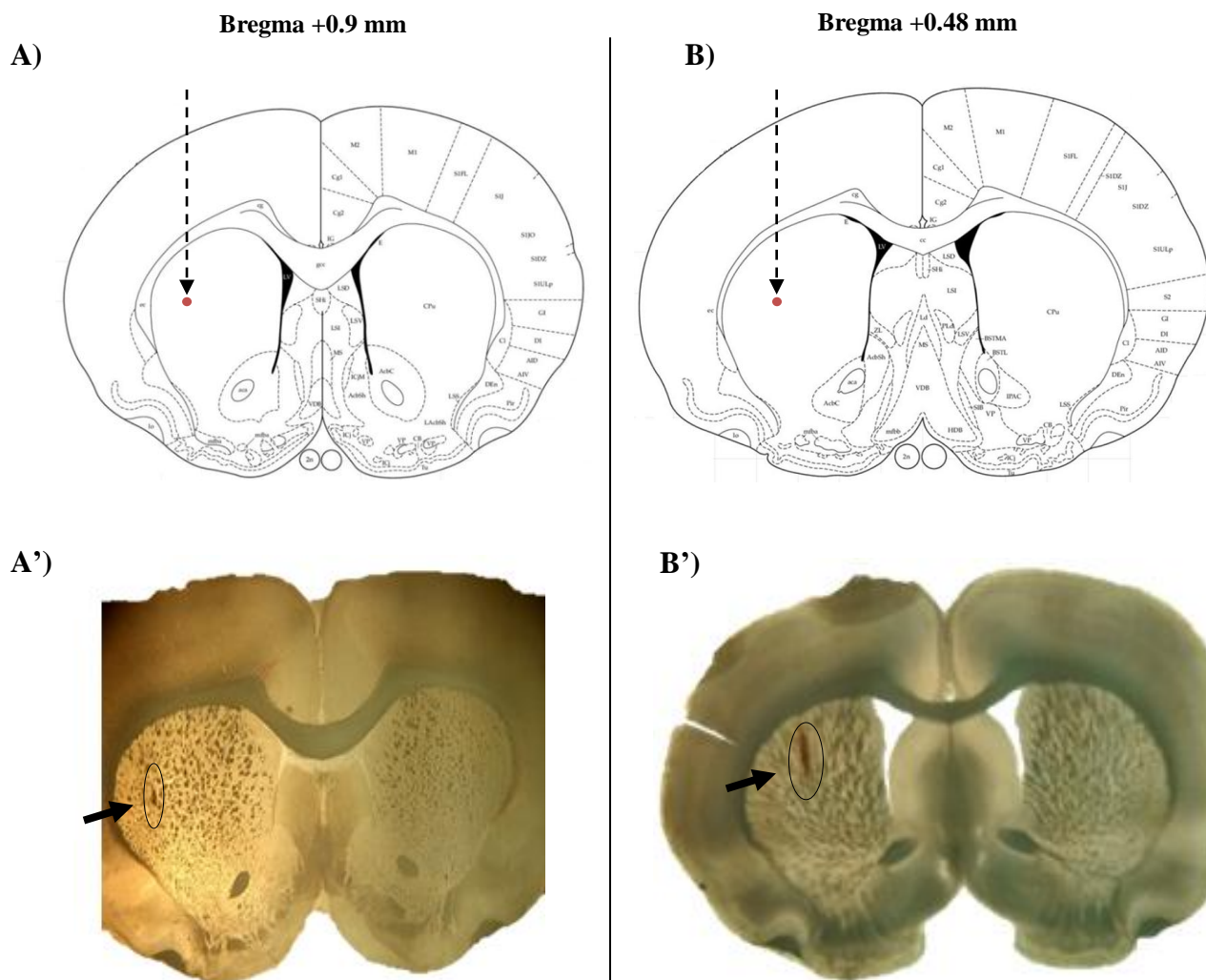
### **5.7.3 Análisis estadístico**

- Los datos obtenidos en la conducta motora para el modelo del cilindro, modelo de la viga en las cuatro sesiones cuatro días previos a la lesión se realizaron con una prueba ANOVA de una vía y una prueba post-test Tukey.
- Los datos obtenidos en la conducta con las cajas de actividad motora en campo cerrado se realizaron con una prueba de Kruskal-Wallis y una prueba post-test de Dunns.
- Los datos obtenidos en los niveles de especies reactivas de oxígeno y lipoperoxidación se realizaron con una prueba ANOVA de una vía y una prueba post-test Tukey.
- Los datos obtenidos en los niveles de la actividad de la SOD total, SOD-Cu/Zn y SOD-Mn se realizaron con una prueba de ANOVA de una vía con y una prueba post-test Bonferroni
- Los datos obtenidos en la cuantificación de la inmunorreactividad para la TH se realizaron con una prueba ANOVA de una vía y una prueba post-test Tukey.

## VI. RESULTADOS

### 6.1. Localización del sitio de lesión en el estriado

Para la localización del sitio de lesión se realizó una inyección con el colorante azul de metileno en la región del estriado dorsal, por medio de cirugía estereotáxica y con referencia del atlas de Paxinos y Watson, 1998. Los valores fueron ajustados para situar el inyector en la región dorso-lateral del estriado y se obtuvieron las siguientes coordenadas: AP: +0.9, ML: +3.5, P<sub>1</sub>: -4.7, y P<sub>2</sub>: -5.1. En la Figura 21 se muestran cortes coronales de cerebro de rata y se señala la ubicación del sitio de inyección y la difusión del azul de metileno en el estriado dorsolateral. Abajo se muestran los esquemas de la región estriatal tomados de Paxinos y Watson, 1998; y se comparan con las fotografías de cortes coronales del estriado donde se muestra el sitio de inyección y que el colorante difunde en la región dorso-lateral del estriado.



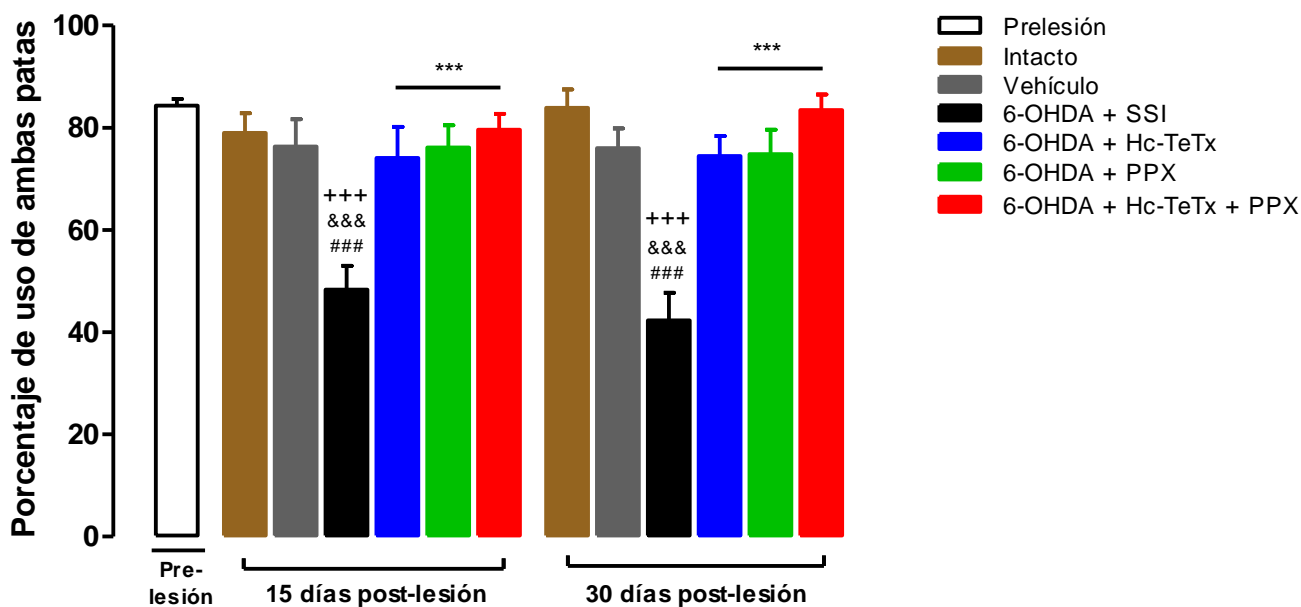
**Figura 21. Localización del sitio de lesión en el estriado dorsal de rata.** A) y B) Se observan los esquemas que muestran la ubicación del estriado de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson, 1998. A') y B') La flecha indica el sitio donde se ubica el trayecto de la cánula de la inyección con azul de metileno en una rebanada coronal del cerebro. A) Corresponde a Bregma +0.9 mm; B) corresponde a Bregma +0.48 mm.

## **6.2 Efecto de la co-administración del fragmento C-terminal de la toxina tetánica más el pramipexol sobre la asimetría motora en ratas hemiparkinsonianas**

Los grupos experimentales fueron evaluados en modelos de conducta motora para conocer si el co-tratamiento del fragmento Hc-TeTx más el PPX mejoraba los procesos motores de ratas lesionadas con 6-OHDA intraestriatal. Se utilizaron modelos de asimetría, coordinación y actividad locomotora para determinar el efecto de los tratamientos sobre la conducta motora.

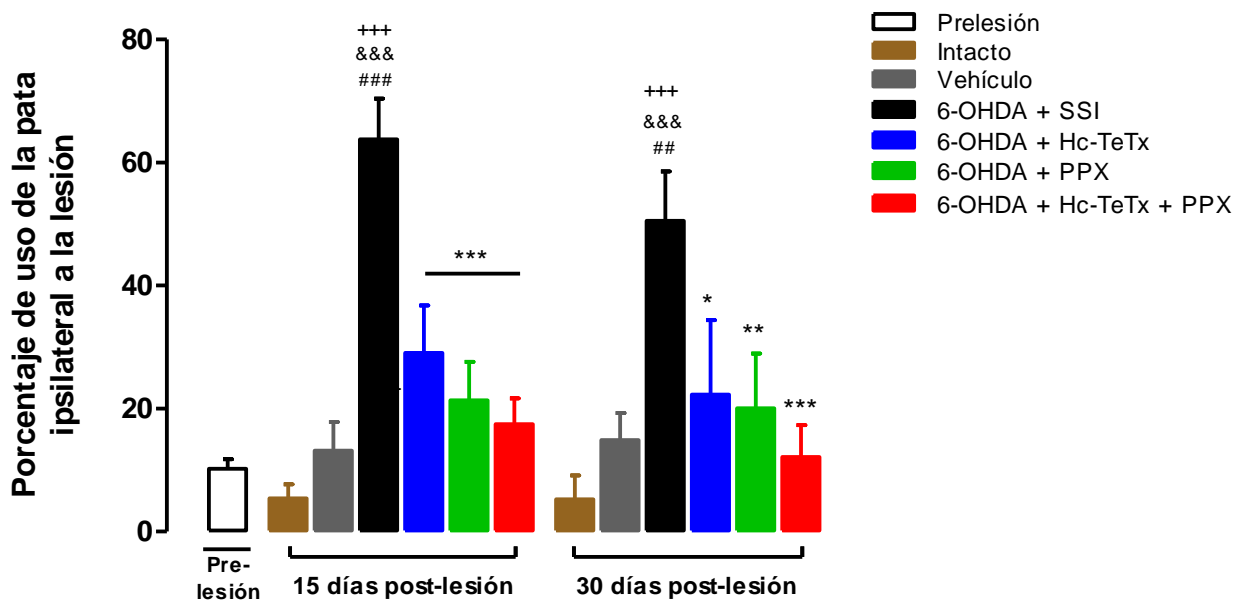
Se evaluó la asimetría motora en el modelo de cilindro para conocer el daño dopaminérgico ocasionado por el neurotóxico 6-OHDA (Figura 22). Todos los sujetos experimentales previos a la lesión dopaminérgica fueron evaluados en 1 ensayo de 5 minutos para determinar el grado de simetría que presentaban las ratas. Se observó un 84.3 % del porcentaje uso de ambas patas, resultado que sugería que no existía asimetría motora en la exploración de las paredes del cilindro. Posterior a la lesión dopaminérgica el grupo lesionado con 6-OHDA+SSI presentó una reducción significativa del porcentaje de uso de ambas patas respecto a su evaluación pre-lesión en el cilindro ( $p < 0.001$  15 días;  $p < 0.001$  30 días). Además, las diferencias que se obtuvieron del grupo 6-OHDA+SSI respecto a sus controles intacto y vehículo al día 15 y 30 post-lesión fueron estadísticamente significativas y se encontraron en un 38.9%, 49.6% y en un 36.7%, 44.4%; respectivamente.

Los resultados indican un efecto benéfico de los grupos tratados farmacológicamente ante la lesión con 6-OHDA intraestriatal. El grupo 6-OHDA+Hc-TeTx presentó un aumento del porcentaje de uso de ambas patas con respecto al grupo 6-OHDA+SSI (en un 53.4%; y en 57.5%) a los 15 y 30 días post-lesión, respectivamente. En el grupo con tratamiento de 6-OHDA+PPX también presentó un aumento significativo en el uso de ambas patas durante la prueba, ya que su ejecución fue de 75.8% y 74.8% de uso de ambas patas a los 15 y 30 días post-lesión. Finalmente, el grupo con el co-tratamiento 6-OHDA+Hc-TeTx+PPX a los 15 días post-lesión se puede observar una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo lesionado con 6-OHDA+SSI ( $p < 0.001$ ) a los 15 días post-lesión (64.5%) y a los 30 día post-lesión (97.1%). Estos resultados sugieren que los tratamientos, así como el co-tratamiento de Hc-TeTx y PPX tienen efectividad en la asimetría motora en las ratas hemiparkinsonianas.



**Figura 22. Porcentaje de uso de ambas patas.** Los animales fueron evaluados durante 5 minutos en el modelo del cilindro a los 15 y 30 días post-lesión. Se graficó el porcentaje de uso de ambas patas evaluado en el modelo del cilindro. Se encontraron mejorías sobre la asimetría de los animales con tratamiento de Hc-TeTx, PPX, así como el grupo con co-tratamiento Hc-TeTx y PPX. Se obtuvo el promedio del porcentaje de uso de ambas patas y el error estándar de la media ( $\pm$ EEM). Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía, con una prueba post-test de Tukey.  $+++p < 0.001$  vs pre-lesión,  $\&\&\&p < 0.001$  vs intacto;  $\#\#\#p < 0.001$  vs vehículo,  $***p < 0.001$  vs 6-OHDA.

Por otra parte, para conocer la severidad y el grado de afectación de la lesión con 6-OHDA y debido a que la lesión aumenta la contracción muscular y la inmovilidad de la pata contralateral se realizó la determinación del porcentaje del uso de la pata ipsilateral. Al analizar los resultados de la ejecución en el cilindro, se graficó el porcentaje de uso de la pata ipsilateral a la lesión (Figura 23). Se observa un aumento significativo del grupo 6-OHDA+SSI con respecto a los grupos pre-lesión a los 15 y 30 días post-lesión (524.5% y 395%, respectivamente), intacto (1079.6% y 971.1%, respectivamente) y vehículo (386.2% y 341.2%, respectivamente) ( $p < 0.001$ ). Los grupos tratados con un solo fármaco, así como los tratados con la coadministración farmacológica se observa una disminución significativa con respecto al grupo 6-OHDA+SSI a los 15 días post lesión 54.5%, 6-OHDA+Hc-TeTx; 66.6% 6-OHDA+PPX; 72.5% 6-OHDA+Hc-TeTx+PPX ( $p < 0.001$ ). Así mismo a los 30 días post-lesión ( $p < 0.05$ ; 0.01 y 0.001) 56.1%, 6-OHDA+Hc-TeTx; 60.4%, 6-OHDA+PPX y 76.1% 6-OHDA+Hc-TeTx+PPX. Además se puede observar una tendencia a disminuir el uso de la pata ipsilateral a la lesión, entre los diferentes tratamientos con respecto al grupo con el co-tratamiento en el día 30 posterior a la lesión.



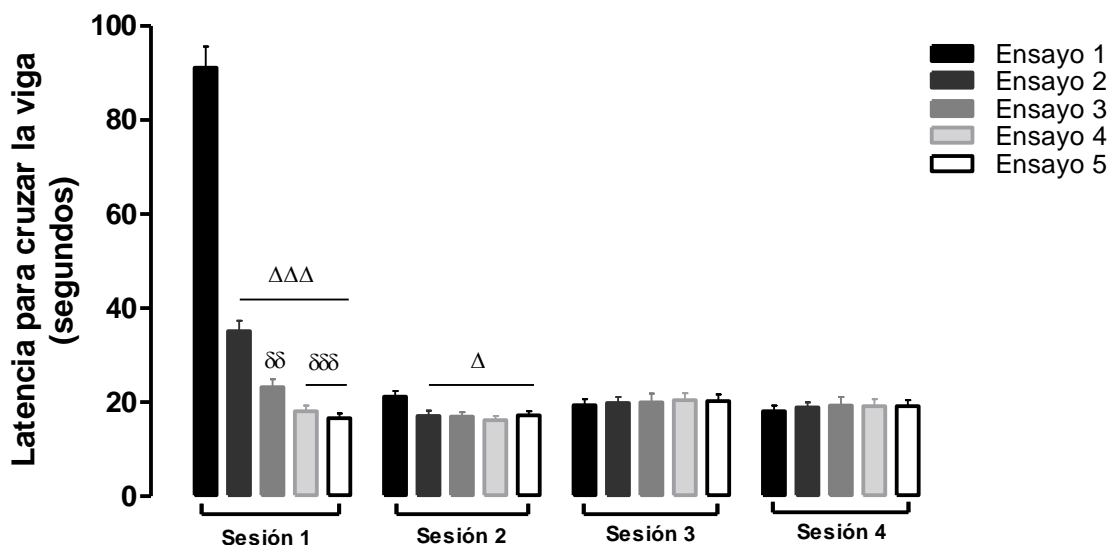
**Figura 23. Porcentaje de uso de la pata ipsilateral a la lesión.** Se grafica el porcentaje de uso de la pata ipsilateral a la lesión evaluado en el modelo del cilindro a los 15 y 30 días después de la lesión y con el tratamiento farmacológico. Los resultados muestran el efecto benéfico de los grupos con tratamiento farmacológico. Se obtuvo el promedio del porcentaje de uso de la pata ipsilateral y el error estándar de la media ( $\pm$ EEM). Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía, con una prueba post-test de Tukey Intactos (n=10); Ac. Asc. (n=12); 6-OHDA (n=16); 6-OHDA+Hc-TeTx (n=15) 6-OHDA+Pramipexol (n=15); 6-OHDA+Hc-TeTx+pramipexol (n=16).  $+++p < 0.001$  vs pre-lesión,  $\&\&\&p < 0.001$  vs intacto;  $\#\#\#p < 0.001$  vs vehículo,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  vs 6-OHDA.

### 6.3 Efecto de la co-administración del fragmento C-terminal de la toxina tetánica más el pramipexol sobre la coordinación motora de ratas hemiparkinsonianas

Para complementar el análisis conductual motor y los efectos tóxicos que puede ocasionar la lesión con 6-OHDA se realizó la determinación de coordinación motora. Los datos obtenidos en el modelo del cilindro evidencian la asimetría ocasionado por la 6-OHDA.

Para obtener un nivel basal de la coordinación motora, se realizó el entrenamiento para cruzar la viga. Este entrenamiento se realizó cuatro días previos a la lesión dopaminérgica a todas las ratas. Cuando se recolectaron los datos, se graficó el tiempo que tardan los sujetos experimentales para cruzar la viga para llegar al objetivo (caja oscura). En la Figura 24 se muestran las 4 sesiones (durante 4 días) y los 5 ensayos de cada sesión. Durante el primer ensayo se obtuvo un tiempo estimado de 91 segundos para cruzar la viga, posteriormente el tiempo del segundo ensayo disminuyó a 35 segundos. Para los ensayos 3, 4 y 5 el tiempo estimado se mantuvieron en 23, 18 y

16 segundos. Los datos muestran una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ ) del ensayo 2 con respecto al ensayo 1. Este resultado nos demuestra que la rata está aprendiendo a cruzar la viga durante la primera sesión. Durante la sesión 2 hubo una diferencia ( $p < 0.05$ ) de los ensayos 2, 3, 4 y 5 con respecto al ensayo 1, lo que nos sugiere que la rata aprendió durante esta sesión. Durante la evaluación de las sesiones 3 y 4 no hubo diferencias significativas, lo que nos indicó que las ratas aprendieron a cruzar la viga, en estas sesiones el tiempo que duraban para cruzar la viga fue de ~19 segundos.

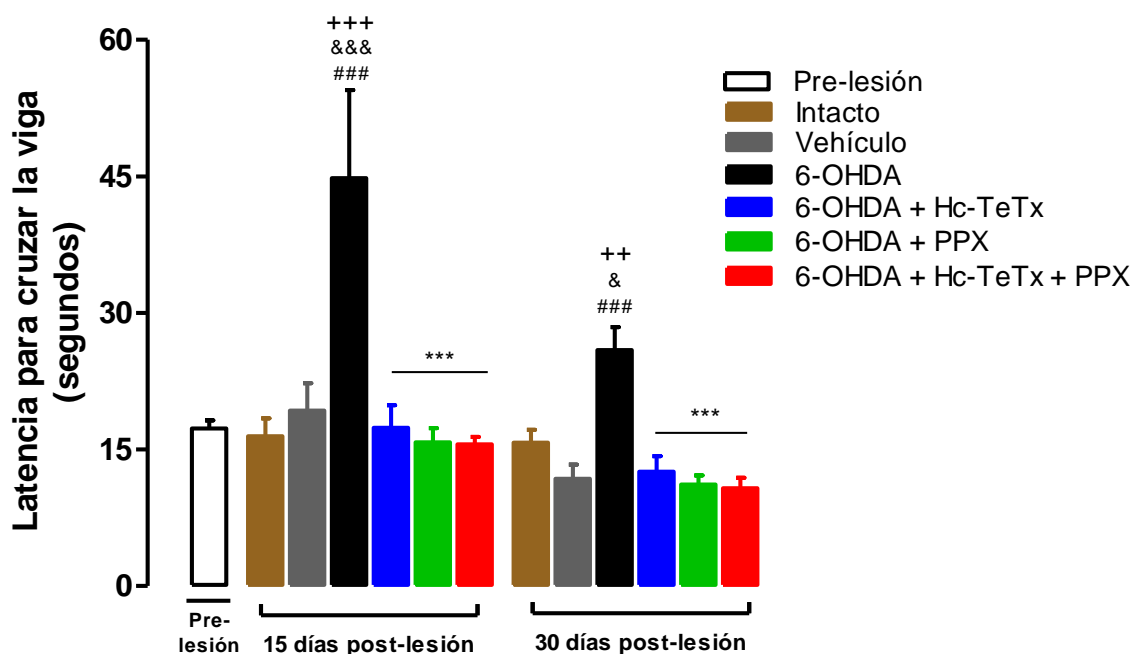


**Figura 24. Evaluación previa a la lesión de la latencia para cruzar la viga.** Se grafica el tiempo que tarda en cruzar la viga cuatro días previos a la lesión, cada sesión se divide en 5 ensayos. Se obtuvo el promedio de la latencia para cruzar la viga y el error estándar de la media ( $\pm$ EEM), los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía, con una prueba post-test de Tukey. Intactos (n=10); Ac. Asc. (n=12); 6-OHDA (n=16); 6-OHDA+Hc-TeTx (n=15) 6-OHDA+Pramipexol (n=15); 6-OHDA+Hc-TeTx+pramipexol (n=16)  $\Delta p < 0.05$ ;  $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$  vs Ensayo 1,  $\delta\delta p < 0.01$ ;  $\delta\delta\delta p < 0.001$  vs Ensayo 2.

Una vez determinado el tiempo que duran en cruzar la viga de todos los sujetos experimentales previos a la cirugía estereotáxica, se realizó el análisis del efecto tóxico de la 6-OHDA sobre la coordinación motora y el tratamiento con el Hc-TeTx y el PPX. Se graficó el tiempo de latencia para cruzar la viga de madera con los seis grupos experimentales a los 15 días y 30 días post-lesión. En la Figura 25 se observa que el grupo 6-OHDA+SSI tarda más en el tiempo para cruzar la viga (44 segundos) con respecto a los grupos controles (15 segundos) el incremento porcentual a los 15 días post-lesión con respecto a los grupos controles, intacto y vehículo son de 173.1% y 133.3%, respectivamente ( $p < 0.001$ ) y a los 30 días post-lesión se visualiza un incremento porcentual de 64.9% y 21.3 %, respectivamente ( $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ ).

Sin embargo, el efecto de los tratamientos con los fármacos administrados en los grupos experimentales 6-OHDA+Hc-TeTx, 6-OHDA+PPx y 6-OHDA+Hc-TeTx+PPX se observó un comportamiento similar a los

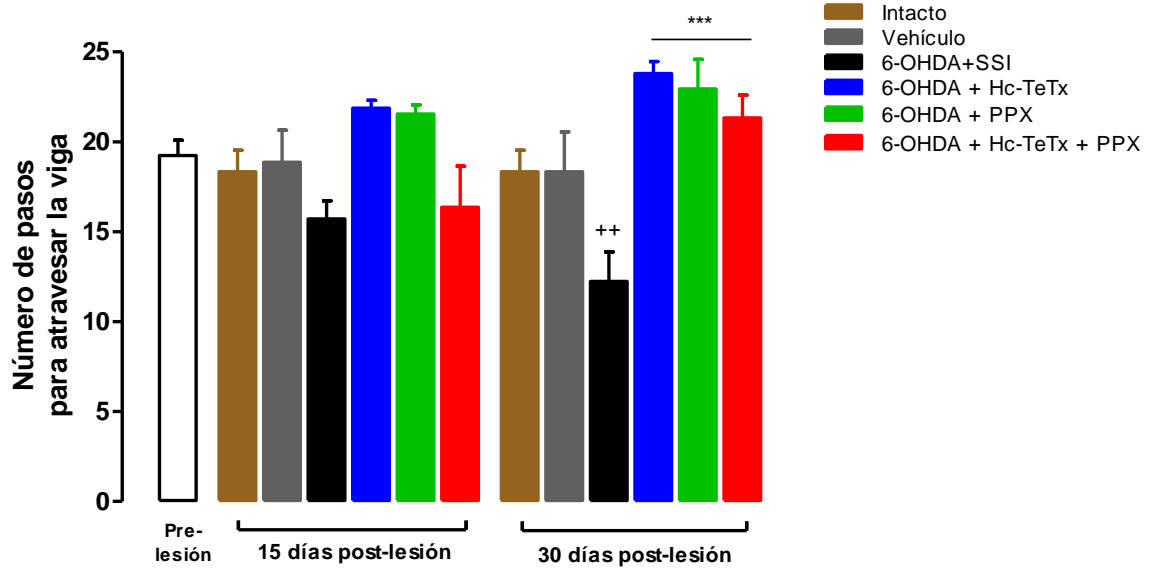
grupos controles, el tiempo de latencia para cruzar la viga fue menor con respecto al grupo 6-OHDA+SSI, la diferencia fue estadísticamente significativa con respecto al grupo lesión  $p < 0.001$ .



**Figura 25. Evaluación post-lesión de la latencia para cruzar la viga.** Se grafica el número de errores que realiza la rata para atravesar la viga a los 15 y 30 días post-lesión. Se obtuvo el promedio de la latencia para cruzar la viga y el error estándar de la media ( $\pm$ EEM), los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía, con una prueba post-test de Tukey. Intactos (n=10); Ac. Asc. (n=12); 6-OHDA (n=16); 6-OHDA+Hc-TeTx (n=15) 6-OHDA+Pramipexol (n=15); 6-OHDA+Hc-TeTx+pramipexol (n=16)  $^{++}$  $p < 0.01$  vs pre-lesión,  $^{***}$  $p < 0.001$  vs 6-OHDA.

Un parámetro adicional que se evaluó para determinar la coordinación motora fue registrar y graficar el número de pasos que utiliza para cruzar la viga de madera. En la figura 26 se muestra el número de pasos realizados por los sujetos experimentales. El grupo 6-OHDA+SSI realizó a los 15 días post-lesión 15 pasos para cruzar la viga, a los 30 días post-lesión realizó 12 pasos para realizar el cruce. Los pasos que realizó a los 30 días post-lesión tuvo una diferencia significativa con respecto a los grupos pre-lesión ( $p < 0.01$ ). La disminución porcentual fue de 57.3% de disminución con respecto al grupo pre-lesión.

En contraste con los grupos 6-OHDA+Hc-TeTx, 6-OHDA+PPX, 6-OHDA+PPX, 6-OHDA+Hc-TeTx+PPX se mostraron cambios estadísticamente significativos con respecto al grupo 6-OHDA+SSI de  $p < 0.001$ ) a los 30 días post-lesión, mostrando valores similares a los grupos controles, intacto y vehículo. El incremento porcentual de los grupos con tratamiento farmacológico fue de 95% en el grupo 6-OHDA+Hc-TeTx, del 87% en 6-OHDA+PPX y un 74.5% en 6-OHDA+Hc-TeTx+PPX con respecto al grupo 6-OHDA+SSI.



**Figura 26. Evaluación post-lesión del número de pasos realizados para atravesar la viga.** Se grafica el número de errores que utiliza para atravesar la viga a los 15 y 30 días post-lesión. Se obtuvo el promedio del número de pasos y el error estándar de la media ( $\pm$ EEM), los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía, con una prueba post-test de Tukey. Intactos (n=10); Ac. Asc. (n=12); 6-OHDA (n=16); 6-OHDA+Hc-TeTx (n=15) 6-OHDA+Pramipexol (n=15); 6-OHDA+Hc-TeTx+pramipexol (n=16) ++p<0.01 vs pre-lesión, \*\*\*p<0.001 vs 6-OHDA.

#### 6.4 Efecto de la co-administración del fragmento C-terminal de la toxina tetánica más el pramipexol sobre la actividad locomotora en ratas hemiparkinsonianas

Para complementar el análisis conductual motor se realizó la evaluación de la actividad locomotora en el modelo de campo cerrado, que determina los movimientos gruesos ejecutados por las ratas. La prueba de actividad locomotora se realizó en tres ocasiones; cinco días previos a la lesión, a los días 14 y a los 29 días post-lesión/tratamiento. En la tabla 4 se muestran los valores de la cuantificación de los movimientos, desplazamientos y erguidos realizados por los sujetos experimentales en función del tiempo, la secuencia temporal fue 60 minutos divididos en 6 periodos de 10 min cada uno. Los datos representan los niveles basales de cada parámetro (movimientos, desplazamientos y erguidos). Se obtuvo la media de los movimientos acumulados en 60 min ( $579.88 \pm 66.2$ ). Así mismo se determinó la media de los desplazamientos acumulados ( $180.53 \pm 10.5$ ) y los erguidos acumulados ( $384.6 \pm 24.8$ ).

Movimientos, desplazamientos y erguidos acumulados por minuto (Prelesión)						
Tiempo	Movimientos		Desplazamientos		Erguidos	
	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM
0	0	0	0	0	0	0
10	562.9	13.6	82.5	2.7	179.2	8.7
20	885.4	25.0	115.9	4.9	256.6	13.2
30	1120.8	38.3	141.1	7.2	310.0	18.3
40	1300.4	50.0	156.8	8.6	337.9	20.2
50	1448.6	59.1	168.3	9.3	358.7	22.0
60	1579.8	66.2	180.5	10.5	384.6	24.8

**Tabla 4. Evaluación de la actividad locomotora previos a la lesión.** Se obtuvo el promedio y el error estándar de la media  $\pm$ EEM del número de movimientos acumulados en seis periodos de diez minutos cada uno en A), el número de desplazamientos en B), y el número de erguidos en C). En las tres gráficas se muestran los valores de todos los grupos experimentales (n=72).

En la tabla 5, 6 y 7 se muestran los resultados de los grupos experimentales posterior a la lesión, evaluados a los 14 y 29 días post-lesión. Los resultados mostrados en las tablas no se determinan diferencias estadísticamente significativas con el modelo de lesión con 6-OHDA con respecto a los grupos controles (intacto y vehículo) y con los grupos con tratamiento farmacológico. Estos hallazgos determinan que el modelo de lesión con 6-OHDA intraestriatal no modifica los movimientos gruesos de las ratas.

MOVIMIENTOS TOTALES						
	Intacto	Vehículo	6-OHDA + SSI	6-OHDA + Hc-TeTx	6-OHDA + Pramipexol	6-OHDA + Hc-TeTx + Pramipexol
<b>14 DÍAS POST-LESIÓN</b>						
<b>Media</b>	911.4	832.9	810.8	868.6	818.9	1035
<b>EEM</b>	±190.1	±179.9	±167.8	±180.3	±176.3	±223.6
<b>29 DÍAS POST-LESIÓN</b>						
<b>Media</b>	871.4	762.2	802.5	761.9	775	883.4
<b>EEM</b>	±191.9	±165.4	±171.3	±164.3	±161.7	±184.5

**Tabla 5. Evaluación de los movimientos totales 14 y 29 días post-lesión.** Se obtuvo el promedio y el error estándar de la media  $\pm$ EEM del número de la cuantificación de los movimientos totales realizados durante 60 min de las dos sesiones 14 y 29 días post-lesión. Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis y una prueba post test de Dunns. Intactos (n=10); Ac. Asc. (n=12); 6-OHDA (n=16); 6-OHDA+Hc-TeTx (n=15) 6-OHDA+Pramipexol (n=15); 6-OHDA+Hc-TeTx+pramipexol (n=16).

DESPLAZAMIENTOS TOTALES						
	Intacto	Vehículo	6-OHDA	6-OHDA + Hc-TeTx	6-OHDA + Pramipexol	6-OHDA + Hc-TeTx + Pramipexol
<b>14 días post-lesión</b>						
<b>Media</b>	128.6	107.4	115.1	115.2	108.3	149.8
<b>EEM</b>	±25.32	±21.34	±21.92	±21.82	±22.2	±30.43
<b>29 días post-lesión</b>						
<b>Media</b>	130.2	107.3	113.4	106.2	112.5	142
<b>EEM</b>	±27.06	±21.31	±22.09	±20.95	±21.42	±27.92

**Tabla 6. Evaluación de los desplazamientos totales 14 y 29 días post-lesión.** Se obtuvo el promedio y el error estándar de la media  $\pm$ EEM del número de la cuantificación de los movimientos totales realizados durante 60 min de las dos sesiones 14 y 29 días post-lesión. Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis y una prueba post test de Dunns. Intactos (n=10); Ac. Asc. (n=12); 6-OHDA (n=16); 6-OHDA+Hc-TeTx (n=15) 6-OHDA+Pramipexol (n=15); 6-OHDA+Hc-TeTx+pramipexol (n=16).

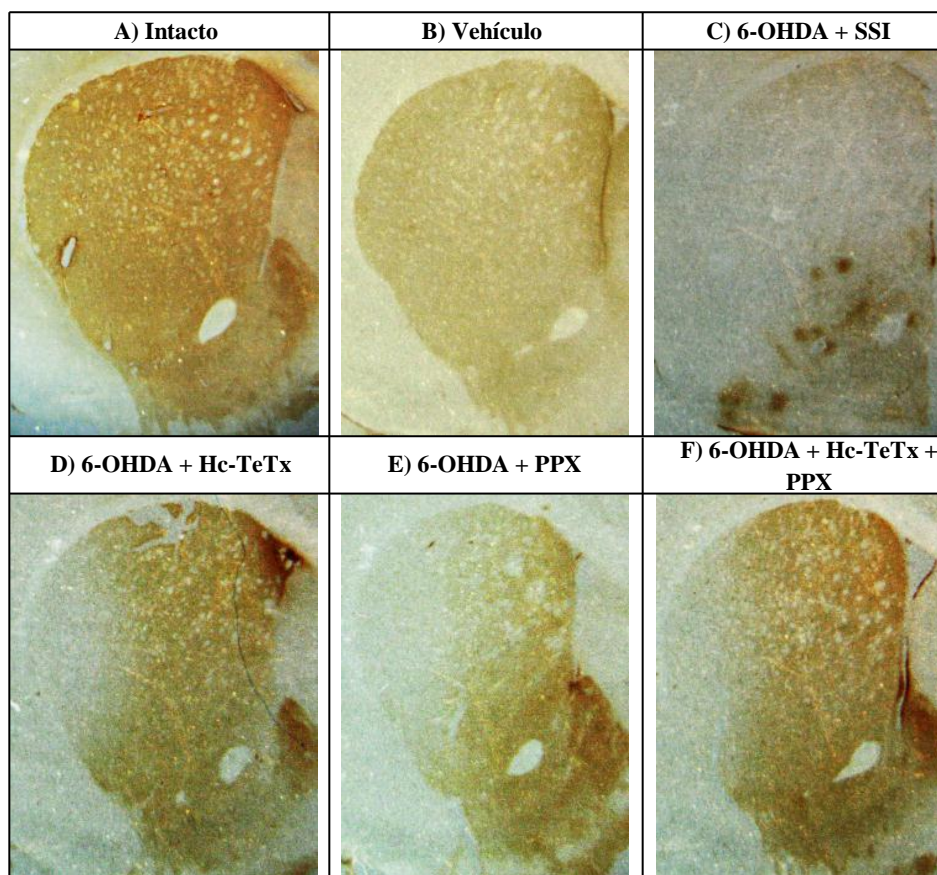
ERGIDOS TOTALES						
	Intacto	Vehículo	6-OHDA	6-OHDA + Hc-TeTx	6-OHDA + Pramipexol	6-OHDA + Hc-TeTx + Pramipexol
<b>14 DÍAS POST-LESIÓN</b>						
<b>Media</b>	203.7	173.7	178	194.1	120.3	296.6
<b>EEM</b>	±37.94	±33.1	±33.48	±37.09	±22.37	±69.03
<b>29 DÍAS POST-LESIÓN</b>						
<b>Media</b>	316.7	172.8	193.5	161.6	170.1	192.6
<b>EEM</b>	±65.79	±34.36	±37.83	±30.15	±33.42	±36.91

**Tabla 7. Evaluación de los ergidos totales 14 y 29 días post-lesión.** Se obtuvo el promedio y el error estándar de la media  $\pm$ EEM del número de la cuantificación de los movimientos totales realizados durante 60 min de las dos sesiones 14 y 29 días post-lesión. Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis y una prueba post test de Dunns. Intactos (n=10); Ac. Asc. (n=12); 6-OHDA (n=16); 6-OHDA+Hc-TeTx (n=15) 6-OHDA+Pramipexol (n=15); 6-OHDA+Hc-TeTx+pramipexol (n=16).

### 6.5 Efecto de la co-administración del fragmento C-terminal de la toxina tetánica más el pramipexol sobre la inmunorreactividad para tirosina hidroxilasa en la SNpc y el estriado

Se determinó el deterioro motor ocasionado por el neurotóxico 6-OHDA de acuerdo con el análisis conductual previamente descrito. Para relacionar la conducta y el sistema dopaminérgico, se realizó la inmunorreactividad de la tirosina hidroxilasa en el estriado y SNpc, mediante la técnica de inmunohistoquímica para la TH y establecer de manera indirecta la integridad del sistema dopaminérgico.

Debido a que el sitio de lesión con 6-OHDA se realizó en el estriado izquierdo, se evaluó la expresión de la TH en esta área. En la Figura 27 se muestra el panel de fotomicrografías de la inmunorreactividad a TH en el estriado. A nivel del estriado dorsolateral ipsilateral a la lesión se observa una disminución de las fibras inmunorreactivas a TH. La Integridad de las fibras dopaminérgicas estriatales se visualizan en los grupos intacto y vehículo. Se puede observar una coloración marrón homogénea en el área que delimita el estriado tanto dorsal (CPu) como ventral (NAc).

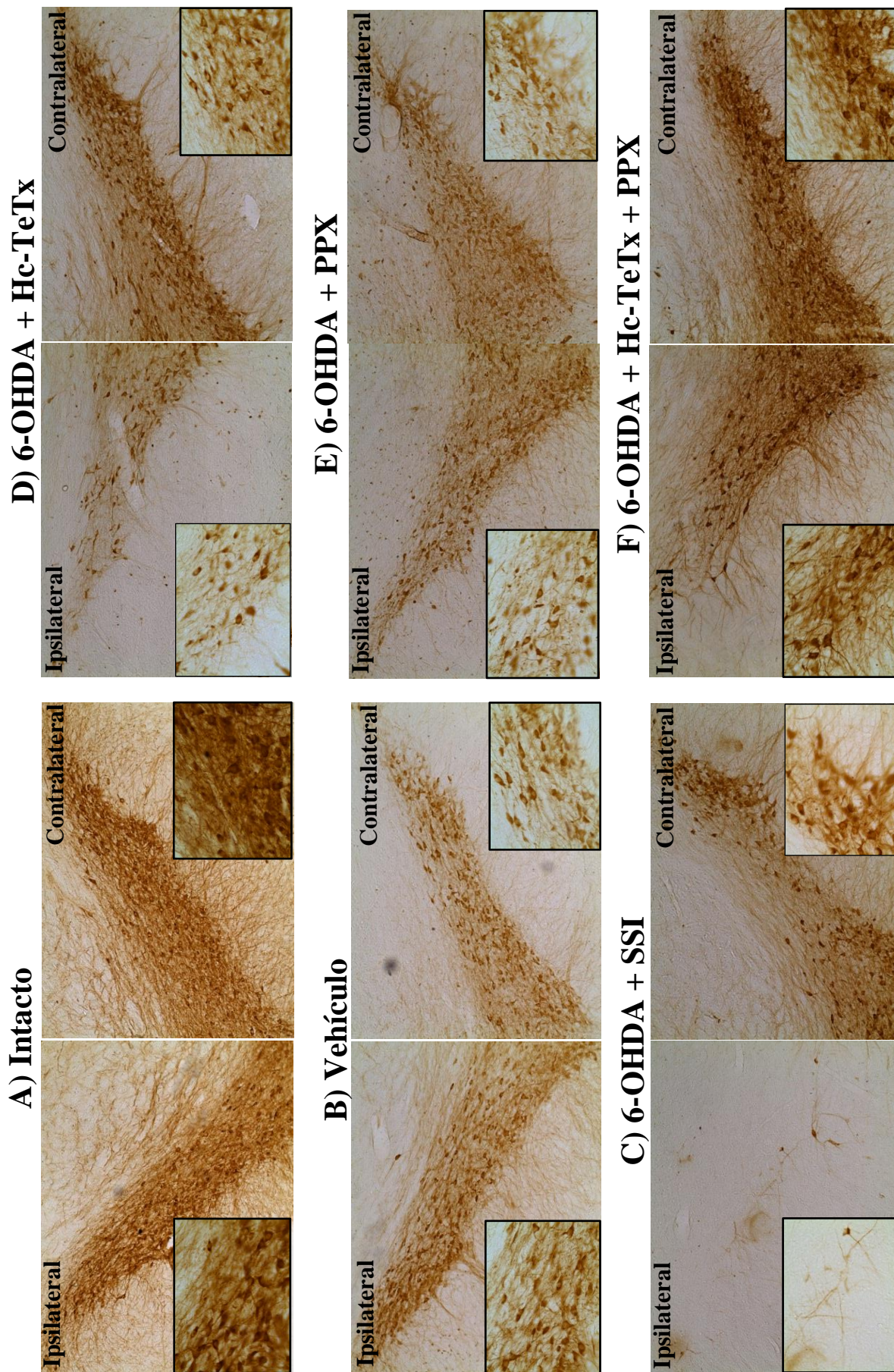


**Figura 27. Inmunorreactividad para TH en el estriado ipsilateral a la lesión.** Panel de fotomicrografías de cuerpo estriado en cortes coronales de los seis grupos experimentales. Se observa la disminución de la inmunorreactividad a la TH de las fibras nerviosas en el estriado ipsilateral a la lesión en el grupo 6-OHDA con respecto a los grupos controles. En los grupos con tratamiento farmacológico se observa un incremento con respecto al grupo lesionado.

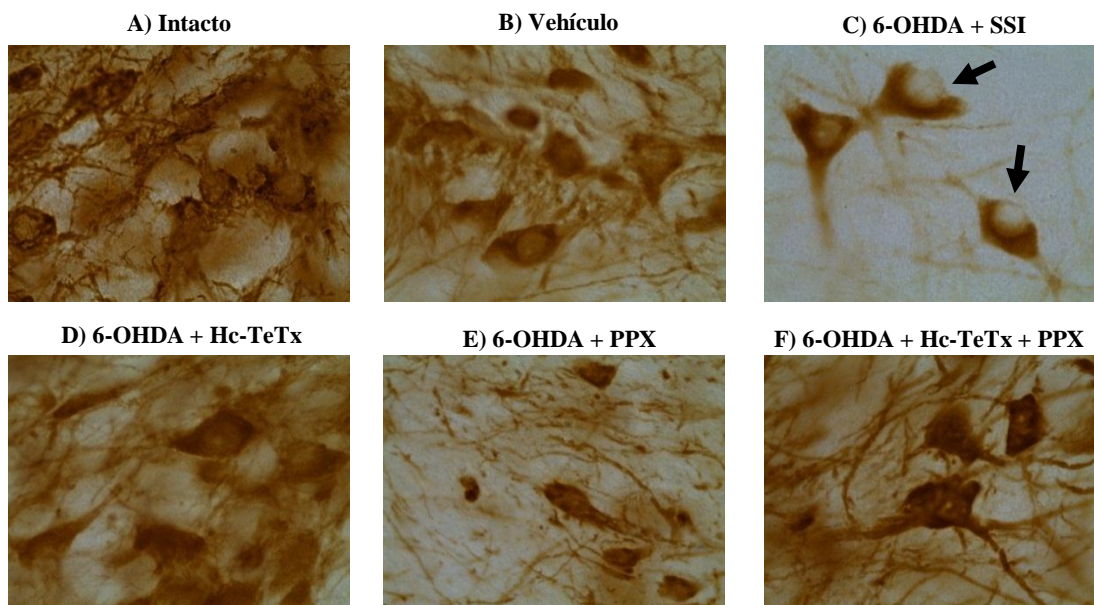
Sin embargo, en el grupo con 6-OHDA se observa una disminución de la inmunorreactividad casi total en el CPu a los 29 días post-lesión con respecto a los grupos controles; en el NAc, se observa una disminución tenue de la inmunorreactividad a la TH. En los grupos con el tratamiento del fragmento Hc-TeTx, el PPX y el fragmento Hc-TeTx más el PPX ante la lesión con 6-OHDA se observa un marcaje homogéneo en la coloración marrón en el estriado, se observa la ausencia de la inmunorreactividad en el CPu a nivel del sitio de inyección del neurotóxico. En la zona del NAc no se observa disminución en la inmunorreactividad.

En la Figura 28, se puede observar que al analizar las fotomicrografías en la SNpc en el grupo intacto y el vehículo las características de las neuronas dopaminérgicas son similares así como del lado ipsilateral como el contralateral. Sin embargo, el grupo lesionado con 6-OHDA se observa una disminución en la coloración marrón que identifica las neuronas dopaminérgicas con respecto al grupo intacto y vehículo. En los grupos con tratamiento, tanto en los grupos con monoterapia como en los grupos con el co-tratamiento farmacológico se observa un restablecimiento de la integridad de la SNpc con respecto al grupo lesionado con 6-OHDA. Así mismo en la Figura 29, se muestran las magnificaciones a 100x de las fotomicrografías de la SNpc, se puede observar una morfología detallada del cuerpo neuronal y en las ramificaciones de las neuronas dopaminérgicas positivas a TH. Se puede observar en la imagen disminuye el marcaje de la inmunorreactividad en el grupo 6-OHDA, también se observa una disminución en las ramificaciones y en su estructura morfológica en relación con los grupos controles, se observa el cuerpo neuronal íntegro y sus dendritas. En los grupos experimentales se observa cualitativamente un restablecimiento de la inmunorreactividad y del cuerpo neuronal y sus dendritas.

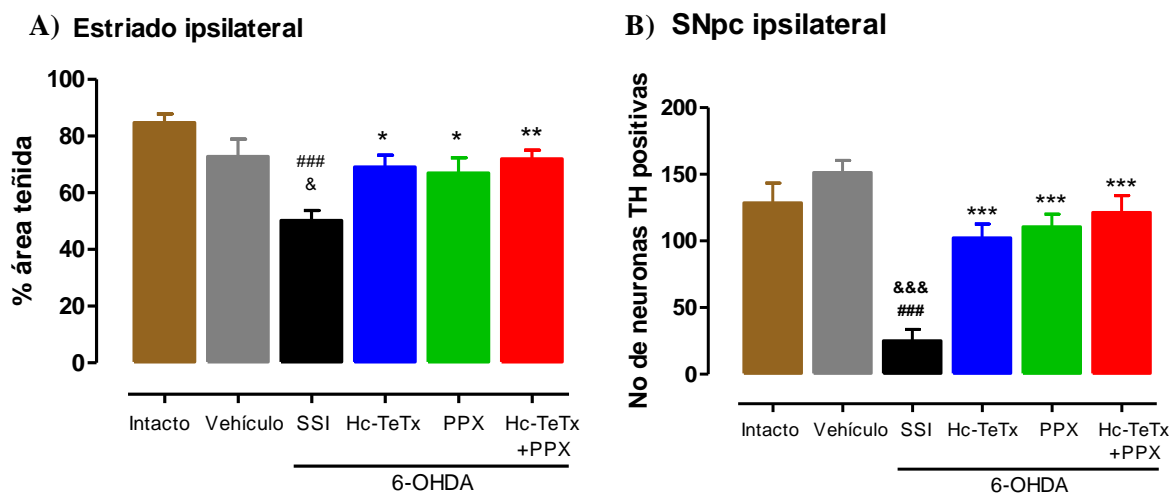
Para determinar la severidad del daño dopaminérgico en la SNpc y en el estriado se realizó la cuantificación de neuronas positivas a TH en la SNpc y el porcentaje de área teñida por densidad óptica en el estriado. En la Figura 30A se expone la gráfica con la cuantificación del número de neuronas positivas a TH y se evidencia la disminución estadísticamente significativa en el número de neuronas del grupo 6-OHDA con respecto a los grupos intacto y vehículo (en un 80.5% y en un 83.5%, respectivamente) ( $p < 0.001$ ). Sin embargo, el restablecimiento de las neuronas positivas a TH en los grupos con tratamiento con 6-OHDA+Hc-TeTx se ve un incremento de un 309%, en el grupo 6-OHDA+PPX un incremento del 340% y en el de 6-OHDA+Hc-TeTx+PPX un incremento del 384% con respecto al grupo con 6-OHDA a los 30 días post-lesión ( $p < 0.001$ ). En la Figura 30B se presenta la gráfica que determina el porcentaje de área teñida en el estriado ipsilateral a la lesión. Se muestra una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) del grupo lesionado con 6-OHDA con respecto al grupo intacto (una disminución del 40.5%) y al grupo vehículo (una disminución del 30.6%). Sin embargo, se observa un incremento del 38% en el grupo Hc-TeTx+6-OHDA; un incremento del 34% en el grupo PPX+6-OHDA y un incremento de 44% en el grupo Hc-TeTx+PPX+6-OHDA, con diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo 6-OHDA+SSI ( $p < 0.001$ ).



**Figura 28. Inmunorreactividad para TH en la SNpc ipsilateral y contralateral a la lesión.** Panel de fotomicrografías de la SNpc en cortes coronales con marcaje para TH (color marrón). A) Corresponde a Intacto, B) Vehículo, C) 6-OHDA+SSI, D) 6-OHDA+Hc-TeTx, E) 6-OHDA+PPX, F) 6-OHDA+Hc-TeTx+PPX. Se puede visualizar la disminución cualitativa de la inmunorreactividad a TH en el grupo 6-OHDA con respecto a los controles. En los grupos con tratamiento farmacológico hay un incremento con respecto al grupo lesionado con 6-OHDA.



**Figura 29.** Magnificación de las fotomicrografías de neuronas positivas a la inmunorreactividad a TH en la SNpc ipsilateral. Se muestra en las magnificaciones los seis grupos experimentales, en la fotomicrografía que corresponde a 6-OHDA se puede observar que disminuye la inmunorreactividad a TH y probablemente la integridad de las neuronas con respecto al grupo control. En las fotomicrografías que corresponden a los tratados farmacológicamente se observa un incremento con respecto al 6-OHDA.



**Figura 30.** Cuantificación de la inmunorreactividad a la TH en la SNpc y estriado ipsilateral. A) Determinación de la inmunorreactividad de la SNpc ipsilateral a los 30 días post-lesión con 6-OHDA y el tratamiento con Hc-TeTx más el pramipexol. B) Determinación del porcentaje del área teñida del estriado dorsal ipsilateral a la lesión a los 30 días post-lesión con 6-OHDA y el tratamiento con Hc-TeTx más el pramipexol. Se obtuvo el promedio y el error estándar de la media  $\pm$  ESM, los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía y una prueba pos-test de Tukey. Intactos (n=3); Ac. Asc. (n=4); 6-OHDA (n=6); 6-OHDA+Hc-TeTx (n=5) 6-OHDA+Pramipexol (n=5); 6-OHDA+Hc-TeTx+pramipexol (n=6) ###p<0.001 vs intacto; &p<0.05, &&p<0.01 vs vehículo; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs 6-OHDA.

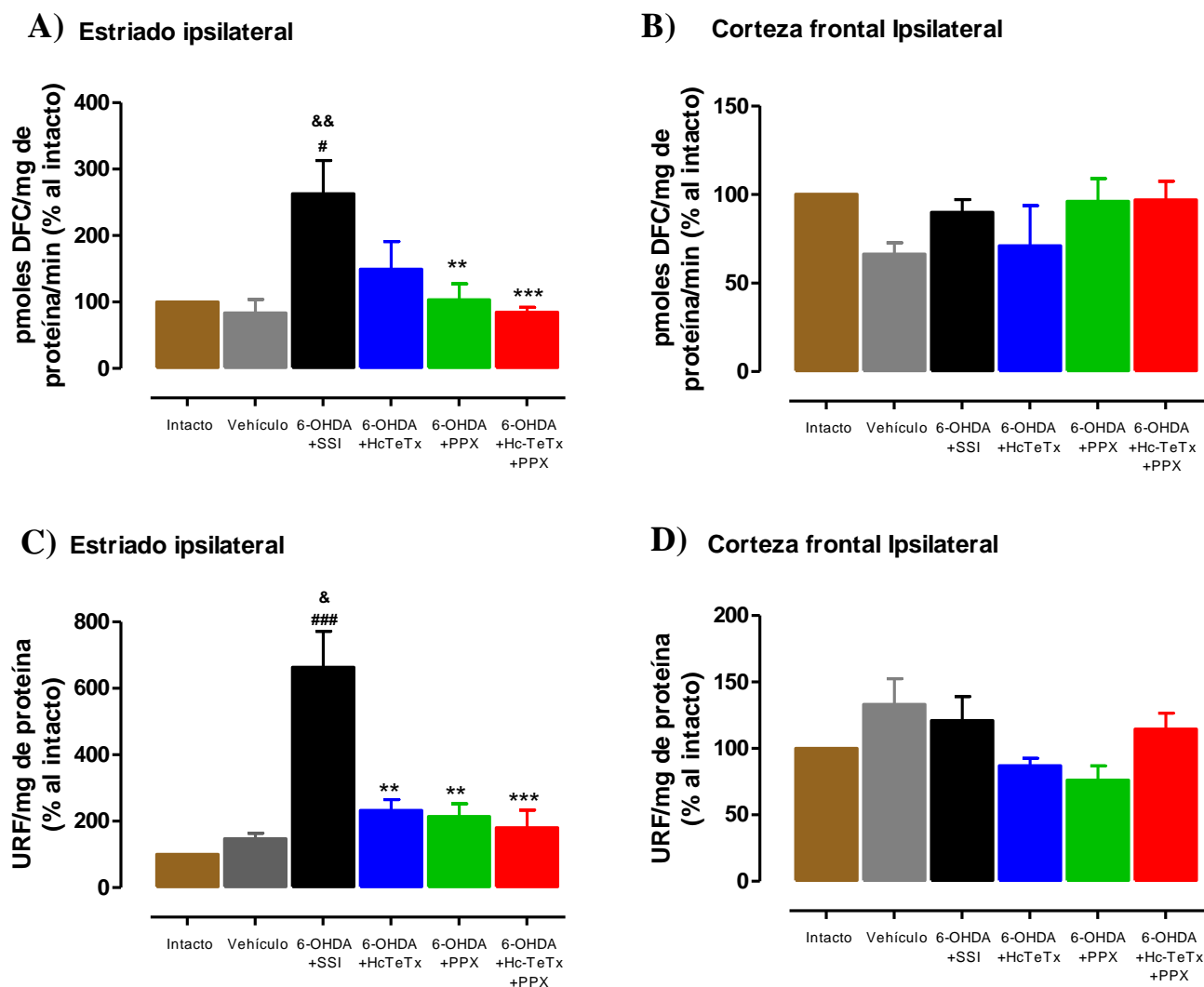
## **6.6 Efecto del fragmento C-terminal de la toxina tetánica más el pramipexol sobre las especies reactivas de oxígeno en estriado y corteza frontal ipsilateral a la lesión**

Corroborados la protección del Hc-TeTx y el PPX sobre los efectos tóxicos de la 6-OHDA en la vía nigro-estriatal por medio de la inmunorreactividad a la TH y la relación con los resultados sobre las conductas motoras, se propuso evaluar el efecto sobre el estrés oxidante. La 6-OHDA es una neurotoxina altamente oxidante, por lo tanto evaluamos el efecto de los tratamientos farmacológicos sobre la producción de ROS, la LPX.

Se cuantificaron los niveles de fluorescencia en picomoles de diclorofluoresceína por medio de espectrofluorimetría, posteriormente se realizó la cuantificación de proteínas totales por el método del ácido bicinónico (BCA) para los normalizar los resultados por miligramo de proteína por minuto y tener los valores para determinar los niveles de ROS en el estriado y corteza ipsilateral a la lesión. En la Figura 31A se observa un incremento estadísticamente significativo en el estriado ipsilateral a la lesión con 6-OHDA con respecto a los grupos controles ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ) intacto (162.8%) y vehículo (179.3%). Sin embargo, en los grupos tratados con el pramipexol ( $p<0.001$ ) y el fragmento Hc-TeTx más Pramipexol ( $p<0.001$ ) se observa una disminución estadísticamente significativo con respecto al grupo 6-OHDA (en un 60.9% y un 67.9%, respectivamente). Los resultados dan evidencia de que la 6-OHDA promueve la generación de las ROS hasta los 30 días post-lesión. En el análisis de datos de las muestras de la corteza frontal ipsilateral a la lesión (Figura 31B) no se observaron modificaciones en los niveles de ROS en ninguno de los grupos experimentales.

## **6.7 Efecto del fragmento C-terminal de la toxina tetánica más el pramipexol sobre las peroxidación lipídica en estriado y corteza frontal ipsilateral a la lesión**

Se realizó el análisis bioquímico para determinar las unidades relativas de fluorescencia (Figura 31C), por medio de los niveles de fluorescencia que emiten los lípidos solubles con el cloroformo. Se observa un aumento estadísticamente significativo en el estriado ipsilateral a la lesión de los grupos 6-OHDA con respecto a los grupos controles, intactos (563.3%) y vehículo (232%) ( $p<0.05$ ;  $p<0.001$ ). Sin embargo en los grupos tratados farmacológicamente se determinó una disminución estadísticamente significativa en los niveles de las unidades relativas de fluorescencia en el grupo tratado con el fragmento Hc-TeTx (65.1%), el PPX (67.7%) y el fragmento Hc-TeTx más el PPX (72.8%) ( $p<0.01$ ;  $p<0.001$ ). En la corteza frontal ipsilateral para peroxidación lipídica (Figura 31D) no se observa diferencia estadísticamente significativa.

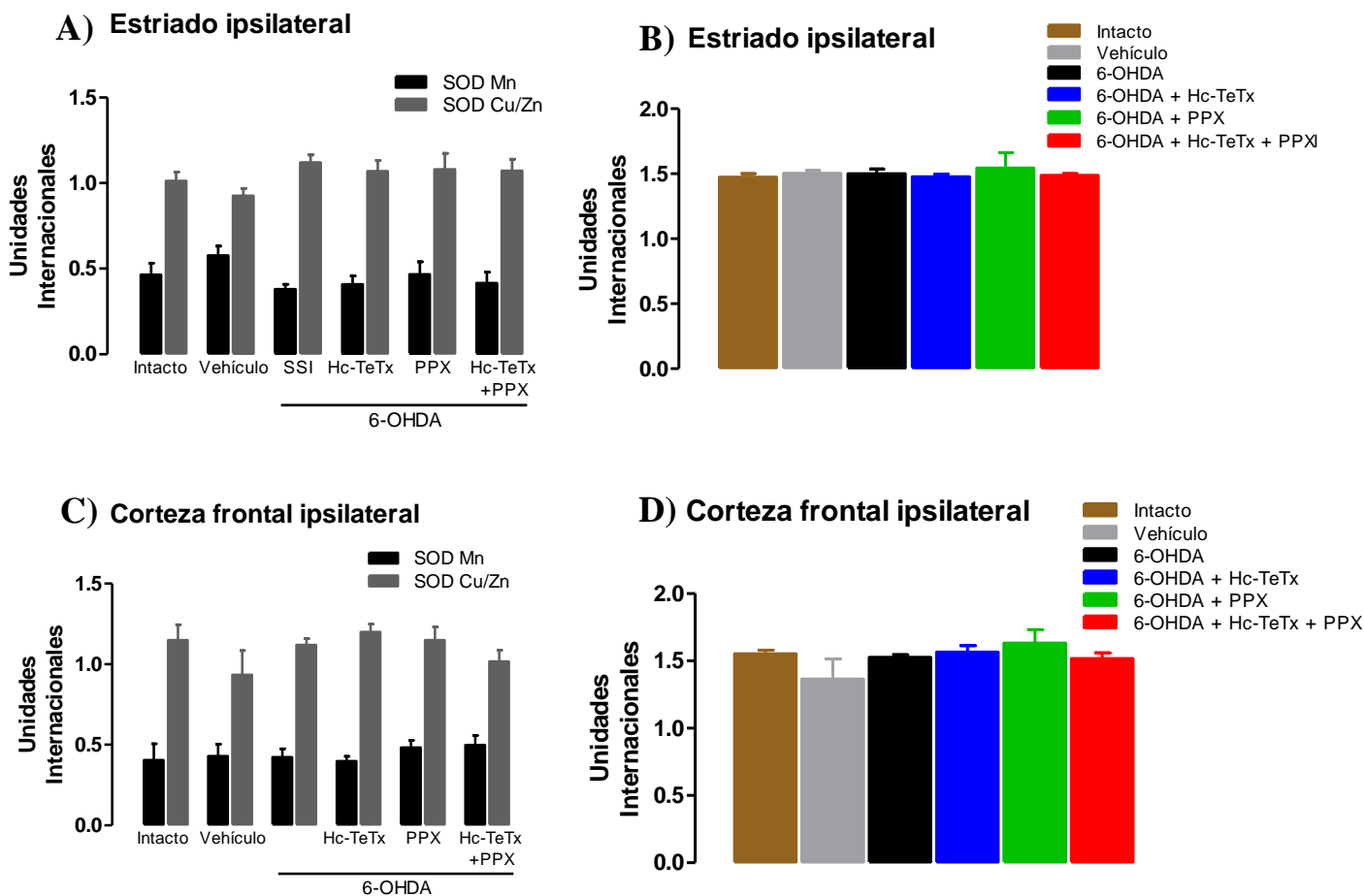


**Figura 31. Determinación del daño oxidante post-lesión y con el co-tratamiento en el estriado de rata.** A) Se muestran los niveles de ROS en el estriado ipsilateral a la lesión. B) Se muestra los niveles de ROS en corteza frontal ipsilateral a la lesión. C) Se determinó el daño por peroxidación lipídica en estriado ipsilateral a la lesión. D) Se determinó el daño de la peroxidación lipídica en corteza frontal ipsilateral a la lesión. Se obtuvo el promedio y el error estándar de la media  $\pm$  ESM, los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía y una prueba pos-test de Tukey. Intactos (n=5); Ac. Asc. (n=5); 6-OHDA (n=7); 6-OHDA+Hc-TeTx (n=5) 6-OHDA+Pramipexol (n=5); 6-OHDA+Hc-TeTx+pramipexol (n=7). +p<0.05 vs pre-lesión, \*\*p<0.01 vs 6-OHDA.

## **6.8 Efecto de la co-administración del fragmento C-terminal de la toxina tetánica más el pramipexol sobre la actividad de la superóxido dismutasa**

Se realizó la evaluación de la actividad de la SOD para determinar el efecto del co-tratamiento Hc-TeTx más el PPX ante la lesión dopaminérgica con 6-OHDA. Se evaluó la actividad de la SOD por medio de la inhibición competitiva de la SOD y la xantina oxidasa, las determinaciones se realizaron por medio de un espectrofotómetro para recolectar los datos de la actividad catalítica en función del tiempo. Posterior a la recolección de datos se realizó el ajuste para convertir a una Unidad Internacional. Una unidad se define como la cantidad de enzima requerida para exhibir el 50% de la dismutación del sustrato.

En el estudio detallado de las dos isoformas expresadas en el estriado ipsilateral (SOD-Cu/Zn y SOD-Mn), los resultados de la actividad de la SOD-Cu/Zn y SOD-Mn del estriado ipsilateral (Figura 32A) así como en la corteza frontal (Figura 32C) no se observa ningún cambio estadísticamente significativo en el grupo 6-OHDA con respecto al grupo control y los grupos con tratamiento con respecto al grupo lesionado con 6-OHDA. Los resultados muestran que en la actividad de la SOD Total del estriado ipsilateral a la lesión (Figura 32B), así como de la corteza frontal ipsilateral a la lesión (Figura 32D) no muestra ningún cambio estadísticamente significativo en el grupo 6-OHDA con respecto a los grupos controles. Así mismo no se observa en los grupos con tratamiento y con respecto a los grupos controles ninguna diferencia estadísticamente significativa.



**Figura 32. Determinación de la actividad de la SOD post-lesión y con el co-tratamiento en estriado de rata.** A) Se muestran los niveles de la actividad de la SOD total en el estriado ipsilateral a la lesión. B) Se muestra los niveles de la actividad de la SOD-Mn y SOD-Cu/Zn en el estriado ipsilateral a la lesión. C) Se muestra la actividad de la SOD total de corteza frontal ipsilateral a la lesión. D) Se muestra la actividad de la corteza frontal ipsilateral a la lesión. Se muestra la media  $\pm$  ESM, los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía y una prueba post-test Bonferroni. Intactos (n=5); Ac. Asc. (n=5); 6-OHDA (n=5); 6-OHDA+Hc-TeTx (n=5) 6-OHDA+Pramipexol (n=5); 6-OHDA+Hc-TeTx+pramipexol (n=5).

## VII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo evaluamos el efecto de la administración intramuscular del fragmento Hc-TeTx más la administración oral del PPX para determinar si la co-administración realiza un efecto sobre las conductas motoras y la disminución del proceso oxidante en ratas con lesión intraestriatal unilateral con 6-OHDA. Se ha demostrado por diferentes estudios in vivo que la 6-OHDA es una molécula altamente oxidante y que es un excelente modelo de la EP para estudiar los efectos de fármacos a nivel preclínico y sus repercusiones ante el estrés oxidativo (Grünblatt y cols., 2000; Bové, 2012; Hernández-Baltazar y cols., 2013). De hecho, se ha propuesto al EO como uno de los mecanismos que participan en la patogénesis de la EP y en la muerte neuronal dopaminérgica de la vía nigro-estriatal (Fariello 1988; Huang y cols., 2003; Yan y cols., 2013; ).

La toxicidad de la 6-OHDA cuando es administrada unilateralmente en el estriado es lenta y progresiva. Su mecanismo de toxicidad da como resultado la muerte neuronal dopaminérgica de la SNpc y se observa principalmente en la disminución del número de neuronas inmunorreactivas a TH en relación con los niveles de dopamina y sus metabolitos. La administración intraestriatal causa la muerte neuronal en un curso temporal más lento, comparado con las lesiones intranigrales así como la lesión en el haz medial del cerebro basal anterior (Kirik y cols., 1998; Deumens y cols., 2002; Simola 2007). El planteamiento de nuestro diseño experimental fue determinar el efecto del co-tratamiento del fragmento Hc-TeTx más el PPX 24 horas posteriores a la lesión, para posteriormente evaluar el efecto conductual y antioxidante.

Se ha demostrado que las lesiones con 6-OHDA en el estriado existen eventos relacionados con la apoptosis, la activación de GSK-3 $\beta$  pY216 y caspasa-3, y que durante las primeras 24 h se activan estos marcadores (Hernández-Baltazar y cols., 2013). Sánchez-Iglesias en el 2007 demostró un curso temporal del estrés oxidativo cuando se administra 6-OHDA en el estriado dorsal y determinaron que al medir los niveles de MDA los niveles más altos de peroxidación de lípidos (LPX) fueron a las 24 y 48 hrs así como de las proteínas carboniladas. Estos hallazgos confirman la participación esencial para el comienzo del daño oxidante como parte de la toxicidad de 6-OHDA. Fue por ello que el diseño experimental del presente trabajo fue realizar la administración de los fármacos 24 h después de la lesión para determinar su efecto una vez que comenzó el proceso de EO y muerte celular por apoptosis.

Al evaluar la conducta motora en modelos de asimetría motora, coordinación y actividad locomotora determinamos el efecto farmacológico del fragmento Hc-TeTx, del PPX y del co-tratamiento a los 15 y 30 días post-lesión. Los resultados observados en la asimetría motora en el modelo del cilindro muestran una mejora del ~80-90% en los grupos con tratamiento farmacológico individual, así como en el co-tratamiento. Estos datos nos indican que los fármacos son eficaces a las dosis administradas en monoterapia como en co-

tratamiento para mantener o mejorar la asimetría evaluada por el porcentaje de uso de ambas patas en el cilindro.

Los resultados mostrados en el presente trabajo son similares a lo ya reportado por Mendieta y cols., en el 2012, en un modelo de lesión con 6-OHDA [16  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ] en ratas y con administración intramuscular del fragmento Hc-TeTx (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.m.) tres días previos a la lesión en ratas hemiparkinsonianas muestra una mejora en el porcentaje de uso de ambas patas en el modelo del cilindro donde se observó un incremento de un ~80% en el grupo Hc-TeTx con respecto al grupo 6-OHDA ~20%. Así mismo, este efecto ha sido demostrado por Sánchez-González en el 2014, en la evaluación del porcentaje del uso de la pata ipsilateral y contralateral en el modelo del cilindro a los 14, 21 y 28 días en ratas tratadas con el fragmento Hc-TeTx (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 8 días posteriores a la lesión con 6-OHDA. Por otra parte, el PPX ha sido evaluado en modelos de 6-OHDA y su efecto farmacológico sobre la asimetría motora en ratas. Farbood y cols., en el 2015 muestran el efecto del PPX sobre la lesión unilateral con 6-OHDA [16  $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$ ] en el haz medial del cerebro anterior, comenzando el mismo día con el tratamiento de PPX por 10 días consecutivos. En este estudio se observó que había una recuperación en la asimetría motora en el grupo con PPX con respecto al grupo con 6-OHDA. En el presente trabajo, el tratamiento sólo con PPX también generó un efecto de mejoría sobre la asimetría motora durante y finalizando el tratamiento.

Para determinar el efecto del co-tratamiento y el deterioro dopaminérgico reflejado en las conductas motoras, se empleó el modelo de la viga. Allbutt y Henderson en el 2007 propusieron el modelo de la viga y demostraron que esta técnica es viable para el estudio de fármacos que pueden proporcionar una alternativa en el tratamiento de la EP. Los resultados mostrados en las sesiones pre-lesión fueron determinantes para considerar los días en que se realizaría el entrenamiento de las ratas para cruzar la viga, en esta etapa los resultados nos proporcionaron datos con diferencias estadísticamente significativas durante las primeras dos sesiones, posteriormente se observó un mantenimiento homogéneo en el tiempo que ocupa la rata para cruzar la viga. Los resultados corroboran lo estudiado por Allbutt y Henderson en el 2007, que muestran el primer día como un factor importante para que la rata sea entrenada y realice el cruce eficazmente. Nosotros observamos que los primeros días son necesarios para que la rata se habitúe al modelo y pueda realizar su ensayo de cruzar la viga durante los días 3 y 4.

Durante la evaluación a los 15 y 30 días post-lesión demostramos que los fármacos administrados por separado ejerce un efecto farmacológico que permiten una adecuada marcha para cruzar la viga similar a nuestros grupos controles. El efecto sobre el número de pasos se ve mejorado específicamente con el grupo con PPX y sobre los animales con la coadministración del fragmento Hc-TeTx más el PXX, la gráfica mostrada con la evaluación con el número de errores no se observaron con cambios estadísticamente significativos con respecto a los controles y los grupos con tratamiento farmacológico. Probablemente los

resultados favorables en el tiempo que tarda la rata para cruzar la viga y que se determinaron con los fármacos administrados por separado así como su co-administración se ven favorecidos por el restablecimiento de los niveles de dopamina en el estriado CPu, como lo reporta Mendieta y cols., 2012, Li y cols., 2010 y su relación con la ejecución motora. Sin embargo, en los resultados mostrados con el modelo de la viga y que involucran la coordinación como el número de pasos, probablemente se necesita una modulación más fina a nivel de la circuitería de los GB, (François-Brosseau y cols., 2009) y que involucra tanto la interacción del PPX con los receptores D<sub>3</sub> que se expresan en diferentes núcleos de los GB (Ahlenius y Salm, 1999; Gurevich y Joyce, 1999.).

Particularmente, en los experimentos realizados con el modelo de las cajas de actividad motora en campo cerrado, nuestro modelo con 6-OHDA administrado de manera unilateral e intraestriatal no hubo disminución tanto en el número de movimientos acumulados así como en el número de desplazamientos y erguidos, con lo que se demuestra que los movimientos gruesos no se afectan drásticamente. Estos resultados son equivalentes con lo reportado por Ramírez-García en el 2015 en el que el modelo de lesión con 6-OHDA intra-nigral no afecta los movimientos gruesos en el modelo de actividad locomotora en campo cerrado. Así mismo, no se observan cambios en los grupos experimentales con Hc-TeTx más pramipexol ante la lesión con 6-OHDA, lo que sugiere que los fármacos no tienen tampoco repercuten en los movimientos gruesos de los animales.

El análisis de los datos presentados en el presente trabajo, en conjunto involucran las conductas motoras en ratas, que ante la lesión dopaminérgica se ve deteriorada por la disminución en los niveles de DA y la muerte neuronal dopaminérgica. Las alteraciones en la simetría así como en la coordinación son moduladas mediante los GB, para ejercer una correcta ejecución de los movimientos (Blandini y cols., 2000; Bolam y cols., 2000) El efecto de los fármacos administrados en las ratas lesionadas con 6-OHDA probablemente se deba a sus efectos tróficos al inhibir la cascada de la vía apoptótica mediante GSK-3 $\beta$  y caspasa-3; como ha sido demostrado tanto para el fragmento Hc-TeTx al activar la vía de señalización PI3K/AKT como para la activación del PPX al receptor dopaminérgico D<sub>3</sub> y el desacople de la subunidad de la proteína G $\beta\gamma$  y la activación de la vía ERK1/2. Estos efectos probablemente estén involucrados en la modulación de la actividad de la tirosina hidroxilasa, como lo reporta Fukuchi y cols., en el 2010 que demuestra la activación de la TH mediante la vía MAPK mediante BDNF. Por esta razón nos hicimos la pregunta si el deterioro dopaminérgico provocado por la 6-OHDA ¿Puede ser disminuido 30 días post-lesión por el tratamiento farmacológico con el fragmento Hc-TeTx más el PPX administrados 24 hrs después de la lesión?

Ha sido bien estudiado y establecido que la toxicidad de la 6-OHDA disminuye la inmunoreactividad a Tirosina hidroxilasa (TH) dependiendo de la concentración y el sitio de lesión en el estriado (Kirik y cols., 1998; Deumens y cols., 2002) Nuestros resultados muestran una disminución aproximadamente del 80.5%

de neuronas dopaminérgicas de la SNpc y en el estriado disminuyó el 40.5% de neuronas dopaminérgicas. Estos datos se correlacionan con lo reportado por Kirik y colaboradores en 1998, pues la disminución mostrada determina un decremento con la dosis a 8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  dividido en dos proporciones del estriado dorsal, en la SNpc se observó una inmunorreactividad positiva a TH de un 19.5% y probablemente se debe a neuronas positivas a calretinina (Nemoto y cols., 1999) o a calbidina (Yamada y cols., 1990) que son neuronas dopaminérgicas resistentes a la toxicidad a 6-OHDA y la excitotoxicidad provocada por glutamato (Tsuboi y cols., 2000; Rodríguez y cols., 2001). El efecto tóxico mediado por la 6-OHDA que se observa en las fotomicrografías a 100x en la SNpc ipsilateral a la lesión y que probablemente pueda estar dañando la integridad de las neuronas dopaminérgicas fue demostrado por Hernández-Baltazar al evaluar los marcadores neuronales  $\beta$ -tubulina y NeuN, y observó que disminuye el marcaje a estas proteínas en modelos animales con 6-OHDA. Probablemente la pérdida inmunorreactiva observada en los cuerpos neuronales y en las ramificaciones axonales se correlacionan con la pérdida axonal observada en diversos estudios que determinan la tipificación y morfología neuronal con la técnica de Golgi Cox (Solís y cols., 2007; Razgado-Hernández y cols., 2015). Los tratamientos con los fármacos utilizados en el presente trabajo, Hc-TeTx y PPX, mostraron una restauración neuronal al ser administrados 24 horas posteriores a la lesión. Estos datos se correlacionan con lo reportado como agentes neuroprotectores administrados previamente a la lesión con la 6-OHDA y el PPX (Vu y cols., 2000; Taravini y cols., 2016) y con el fragmento Hc-TeTx (Mendieta y cols., 2012) como neuroprotector tres días previos a la lesión y (Sánchez-González y cols., 2014) como neurorestaurador 8 días posterior a la lesión. Nuestros resultados muestran un incremento similar a lo observado como agentes neuroprotectores; Sin embargo, el efecto potenciador no se vio remarcado, probablemente porque hubo una saturación en la activación en las vías de señalización celular para la inmunorreactividad a la TH. Por otra parte, a nivel estriatal, se observó la disminución en la inmunorreactividad en la zona dorsolateral como lo muestran previas investigaciones (Kirik y cols., 1998; Deumens y cols., 2002). Sin embargo, en los grupos con tratamiento y co-tratamiento farmacológico se observó el patrón de la disminución en el sitio de lesión en los tres grupos experimentales pero una marcada inmunorreactividad en las zonas adyacentes.

Diversos autores han descrito el papel de la 6-OHDA como un tóxico altamente oxidante (Graham y cols., 1978; Soto-Otero y cols., 2000; Blum y cols., 2001; Blandini y Armentero, 2012). El papel de la 6-OHDA como generador de radicales libres (RL) y especies reactivas de oxígeno (ROS) se observa a partir de las 24 hrs como lo demuestra Sánchez-Iglesias en el 2007. Nuestros resultados muestran un incremento de ROS fue de un 162% y en la LPX un 563%. Estos datos nos permiten sugerir que probablemente el daño inducido por ROS en la membrana es mayor una vez que desencadenó la LPX y su reacción en cadena, probablemente es en función del tiempo y concentración de 6-OHDA (Méndez-Álvarez y cols., 2001; Soto-Otero y cols., 2000; Mazzió y cols., 2004). El tratamiento con el fragmento Hc-TeTx no se observó una

disminución en los niveles de ROS y que probablemente sea modulada por la actividad de los receptores Trk-B como se ha demostrado con el BDNF (Kim y cols., 2002) y que puede activar al factor de transcripción Nrf2 que incrementa la expresión de enzimas antioxidantes (Murphy y Park, 2017). Por otra parte el PPX puede tener un efecto antioxidante independiente de la activación del receptor D3 como lo demuestra Le y cols., en el 2000. El efecto de “barrer” radicales libres lo podría estar modulando su estructura molecular y a nivel extracelular (Cassarino y cols., 1998; Feger y cols., 2000). Este papel antioxidante de ambos fármacos se realiza por medio de diferentes vías de señalización por medio de la activación del receptor Trk-B y por la y probablemente por la estructura molecular del PPX.

Debido a que la sobreproducción de ROS en las células daña estructuras principales como membrana celular, DNA y proteínas (Halliwell, 2006; Birben y cols., 2012), y debido a que se ha demostrado que la 6-OHDA altera la actividad de la SOD (Kunikowska y Jenner, 2001) y aún, si la toxicidad de la 6-OHDA se ve incrementada por la producción concomitante de ROS a través de su auto-oxidación que ocurre, se ha demostrado que la SOD tiene un efecto inhibitorio sobre la auto-oxidación de la 6-OHDA (Heikkila y Cohen, 1973) y que la sobreexpresión de la SOD en ratones transgénicos disminuye la toxicidad de la 6-OHDA (Asanuma y cols, 1998) probablemente en nuestro diseño experimental podría alterar la actividad de la SOD.

Los resultados mostrados en el presente trabajo no mostraron diferencias estadísticamente significativas a los 30 días post-lesión en el estriado. Es importante recalcar que se esperaba que los niveles de la actividad de la SOD-Cu/Zn y SOD-Mn se observaran disminuidos en el grupo lesionado con 6-OHDA debido a la presencia de ROS en el día 30 post-lesión, los resultados son determinantes al no observar cambios; en contraste, otros estudios realizados en ratas lesionadas con 6-OHDA se observa una disminución en la actividad de la SOD. Probablemente la actividad de la SOD podría ser más evidente a los primeros días post-lesión, donde se espera la mayor actividad (Kita, 1993; Kawaguchi, 1993). Estos componentes y complejos celulares en el estriado podrían participar sobre la expresión de SOD y la presencia de ROS exacerbados en las terminales nigrales a los 30 días post-lesión. A pesar de ello el sitio de lesión podría mostrar un efecto más contundente sobre la regulación de enzimas antioxidantes

## **VIII. CONCLUSIONES**

- 1.- El co-tratamiento con el Hc-TeTx más el pramipexol mejora la asimetría y la coordinación motora de ratas hemiparkinsonianas a los 15 y 30 días post-lesión, similar al efecto que provoca en los tratamientos con Hc-TeTx y PPX de forma independiente.
- 2.- La actividad locomotora no se modificó por la lesión dopaminérgica con 6-OHDA o los tratamientos con el fragmento Hc-TeTx y PPX evaluado a los 14 y 29 días en ratas hemiparkinsonianas.
- 3.- El co-tratamiento con el fragmento Hc-TeTx más el PPX mantiene los niveles de TH en el estriado y la SNpc posterior a 31 días post-lesión en ratas hemiparkinsonianas, similar al efecto que causan el tratamiento con el fragmento Hc-TeTx y PPX de forma independiente.
- 4.- El co-tratamiento con el fragmento C-terminal de la toxina tetánica más el pramipexol disminuye los niveles de especies reactivas de oxígeno y la peroxidación de lípidos en el estriado de ratas hemiparkinsonianas 31 días post-lesión.
- 5.- La actividad enzimática de la SOD en el estriado ipsilateral de ratas hemiparkinsonianas no se modificó posterior a la lesión dopaminérgica con 6-OHDA y los tratamientos y co-tratamiento con Hc-TeTx más PPX al día 31.

## **IX. PERSPECTIVAS**

- Realizar la co-administración a dosis bajas del fragmento Hc-TeTx (20 µg/kg) una sola administración y PPX (0.5 mg/kg) cada 12 h para evaluar el efecto sinérgico ante la lesión con 6-OHDA intraestriatal.
- Determinar el efecto de la co-administración del fragmento Hc-TeTx (20 µg/kg) una sola administración y PPX (0.5 mg/kg) cada 12 h y determinar los niveles de ROS, LPX y la actividad de la SOD a diferentes tiempos 3, 7, 15, 20 y 30 días post-lesión.
- Determinar el efecto de la co-administración del fragmento Hc-TeTx (20 µg/kg) una sola administración y PPX (0.5 mg/kg) cada 12 h y determinar los niveles de la expresión la SOD del receptor D<sub>3</sub> y del BDNF a diferentes tiempos

## **X. REFERENCIAS**

- Ahlenius S, Salmi P. 1994. Behavioral and biochemical effects of the dopamine D3 receptor-selective ligand, 7-OH-DPAT, in the normal and the reserpine-treated rat. *Eur J Pharmacol.* 260(2-3):177-81.
- Andrew R, Watson DG, Best SA, Midgley JM, Wenlong H, Petty RK. 1993. The determination of hydroxydopamines and other trace amines in the urine of parkinsonian patients and normal controls. *Neurochem Res.* 18(11):1175-7.
- Aruoma OI. 1996. Peroxyl radical scavenging activity of the antihypertensive drug carvedilol. *Toxicol In Vitro.* 10(5):625-9.
- Barber SC, Shaw PJ. 2010. Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic Biol Med.* 48(5):629-41.
- Bazan NG, Marcheselli VL, Cole-Edwards K. 2005. Brain response to injury and neurodegeneration: endogenous neuroprotective signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, pp. 137-147.
- Bevan MD, Bolam JP, Crossman AR. 1994. Convergent synaptic input from the neostriatum and the subthalamus onto identified nigrothalamic neurons in the rat. *Eur J Neuro Sci.* 6:320-33.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 5(1):9-19.
- Bishop GA, Chang HT, Kitai ST. 1982. Morphological and physiological properties of neostriatal neurons: an intracellular horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience.* 7(1):179-91.
- Bizzini B, Grob P, Akert K. 1981. Papain-derived fragment IIC of tetanus toxin: its binding to isolated synaptic membranes and retrograde axonal transport. *Brain Res.* 210(1-2):291-9.
- Björklund A, Dunnett SB. 2007. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* 30(5):194-202.
- Blandini F, Armentero 2012. Animal models of Parkinson's disease. *MT. FEBS J.* Apr;279(7):1156-66.
- Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E. 2000. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 62(1):63-88.
- Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S. 2012. Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol.* 2012:845618.
- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 65(2):135-72.
- Bolam JP, Clarke DJ, Smith AD, Somogyi P. 1983. A type of aspiny neuron in the rat neostriatum accumulates [3H]gamma-aminobutyric acid: combination of Golgi-staining, autoradiography, and electron microscopy. *J Comp Neurol.* 213(2):121-34.

- Bolam JP, Smith Y. 1990. The GABA and substance P input to dopaminergic neurones in the substantia nigra of the rat. *Brain Res.* 529:57–78.
- Bové J, Perier C. 2012. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience.* Jun 1;211:51-76.
- Breese GR, Traylor TD. 1971. Depletion of brain noradrenaline and dopamine by 6-hydroxydopamine. *Br J Pharmacol.* 42(1):88-99.
- Brusa L, Bassi A, Stefani A, Pierantozzi M, Peppe A, Caramia MD, Boffa L, Ruggieri S, Stanzione P. 2003. Pramipexole in comparison to l-dopa: a neuropsychological study. *J Neural Transm (Vienna).* 110(4):373-80.
- Calvo AC, Oliván S, Manzano R, Zaragoza P, Aguilera J, Osta R. 2012. Fragment C of tetanus toxin: new insights into its neuronal signaling pathway. *Int J Mol Sci.* 13(6):6883-901.
- Camacho-Ochoa M, Walker EL, Evans DL, Piercey MF. 1995. Rat brain binding sites for pramipexole, a clinically useful D3-preferring dopamine agonist. *Neurosci Lett.* 196(1-2):97-100.
- Carter AJ, Müller RE. 1991. Pramipexole, a dopamine D2 autoreceptor agonist, decreases the extracellular concentration of dopamine in vivo. *Eur J Pharmacol.* 200(1):65-72.
- Cassarino DS, Fall CP, Smith TS, Bennett JP Jr. 1998. Pramipexole reduces reactive oxygen species production in vivo and in vitro and inhibits the mitochondrial permeability transition produced by the parkinsonian neurotoxin methylpyridinium ion. *J Neurochem.* Jul; 71(1):295-301.
- Chaib-Oukadour I, Gil C., Aguilera J. 2004. The C-terminal domain of heavy chain of tetanus toxin rescues cerebellar granule neurons from apoptotic death: Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Neurochem.* 90:1227–1236.
- Chaib-Oukadour I, Gil C., Rodríguez-Álvarez J., Ortega A., Aguilera J. 2009. Tetanus toxin HC fragment reduces neuronal MPP+ toxicity. *Mol. Cell. Neurosci.* 41:297–303.
- Chiba K, Trevor A, Castagnoli N Jr. 1984. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 120(2):574-8.
- Chiu WH, Depboylu C, Hermanns G, Maurer L, Windolph A, Oertel WH, Ries V, Höglinger GU. 2015. Long-term treatment with L-DOPA or pramipexole affects adult neurogenesis and corresponding non-motor behavior in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology.* 95:367-76.
- Chuhma N, Mingote S, Moore H, Rayport S. 2014. Dopamine neurons control striatal cholinergic neurons via regionally heterogeneous dopamine and glutamate signaling. *Neuron.* 81(4):901-12.
- Chung SJ, Armasu SM, Biernacka JM, Lesnick TG, Rider DN, Cunningham JM, Maraganore DM. 2011. Variants in estrogen-related genes and risk of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 26(7):1234-42.
- Clarke R, Adermark L. 2015. Dopaminergic Regulation of Striatal Interneurons in Reward and Addiction: Focus on Alcohol. *Neural Plast.* 2015:814567.

- Coen L, Osta R, Maury M, Brûlet P. 1997. Construction of hybrid proteins that migrate retrogradely and transynaptically into the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94(17):9400-5.
- Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. 2002. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods*. 265(1-2):49-72.
- Dahlström A, Fuxe K. 1964. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 232, 1–55.
- Daubner SC, Lauriano C, Haycock JW, Fitzpatrick PF. 1992. Site-directed mutagenesis of serine 40 of rat tyrosine hydroxylase. Effects of dopamine and cAMP-dependent phosphorylation on enzyme activity. *J Biol Chem*. 267(18):12639-46.
- Daubner SC, Le T, Wang S. 2011. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys*. 508(1):1-12.
- Davis SM, Pennypacker KR. 2017. Targeting antioxidant enzyme expression as a therapeutic strategy for ischemic stroke. *Neurochem Int*. 107:23-32.
- Deinhardt K, Salinas S, Verastegui C, Watson R, Worth D, Hanrahan S, Bucci C, Schiavo G. 2006. Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. *Neuron*. 52(2):293-305.
- Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. 2002. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol*. 175(2):303-17.
- Dias V, Junn E, Mouradian M. M. 2013. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*. 3 461–491.
- Diaz NL, Waters CH. 2009. Current strategies in the treatment of Parkinson's disease and a personalized approach to management. *Expert Rev Neurother*. 9(12):1781-9.
- Dooley M, Markham A. 1998. Pramipexole. A review of its use in the management of early and advanced Parkinson's disease. *Drugs Aging*. 12(6):495-514.
- Dupuy C, Virion A, Ohayon R, Kaniewski J, Dème D, Pommier J. 1991. Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane. *J Biol Chem*. 266(6):3739-43.
- Ehringer H, Hornykiewicz O. *Klin Wochenschr*. Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. 38:1236-9.
- Elsworth JD, Roth RH. 1997. Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 144(1):4-9.

- Emsley P, Fotinou C, Black I, Fairweather NF, Charles IG, Watts C, Hewitt E, Isaacs NW. 2000. The structures of the H(C) fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding. *J Biol Chem.* 275(12):8889-94.
- Evinger C, Erichsen JT. 1986. Transsynaptic retrograde transport of fragment C of tetanus toxin demonstrated by immunohistochemical localization. *Brain Res.* 380(2):383-8.
- Fallon JH, Moore RY. 1978. Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol.* 180(3):545-80.
- Fariello RG. 1988. Experimental support for the implication of oxidative stress in the genesis of parkinsonian syndromes. *Funct Neurol.* 3(4):407-12.
- Fee JA, McClune GJ, O'Neill P, Fielden EM. 1981. Saturation behavior of superoxide dismutation catalyzed by the iron containing superoxide dismutase of *E. coli* B. *Biochem Biophys Res Commun.*;100:377-384.
- Fenton HJH. 1984. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J Chem Soc.* 65:899-910.
- Ferger B, Teismann P, Mierau J. 2000. The dopamine agonist pramipexole scavenges hydroxyl free radicals induced by striatal application of 6-hydroxydopamine in rats: an in vivo microdialysis study. *Brain Res.* 883(2):216-23.
- Ferrari F, Pelloni F, Giuliani D. 1993. Behavioural evidence that different neurochemical mechanisms underly stretching-yawning and penile erection induced in male rats by SND 919, a new selective D2 dopamine receptor agonist. *Psychopharmacology (Berl).* 113(2):172-6.
- Fisher CL, Cabelli DE, Hallewell RA, Beroza P, Lo TP, Getzoff ED, Tainer JA. 1997. Computational, pulse-radiolytic, and structural investigations of lysine-136 and its role in the electrostatic triad of human Cu,Zn superoxide dismutase. *Proteins.* 29:103-112.
- Fishman PS, Carrigan DR. 1987. Retrograde transneuronal transfer of the C-fragment of tetanus toxin. *Brain Res.* 406(1-2):275-9.
- Fishman PS, Savitt JM. 1989. Transsynaptic transfer of retrogradely transported tetanus protein-peroxidase conjugates. *Exp Neurol.* 106(2):197-203.
- Fitzpatrick PF. 1999. Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu Rev Biochem.* 68:355-81.
- Floor E, Wetzel MG. 1998. Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *J Neurochem.* 70(1):268-75.
- Forn J, KruegerBK, Greengard P. 1974. Adenosine 3',5'-monophosphate content in rat caudate nucleus: demonstration of dopaminergic and adrenergic receptors. *Science*, 186:1118-1120.
- Forno L. S. 1996. Neuropathology of Parkinson's disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.* 55(3):259-272.

- Francis J.W., Figueiredo D., vanderSpek J.C., Ayala L.M., Kim Y.S., Remington M.P., Young P.J., Lorson C.L., Ikebe S., Fishman P.S., Brown R.H., Jr. 2004. A survival motor neuron: tetanus toxin fragment C fusion protein for the targeted delivery of SMN protein to neurons. *Brain Res.* 995:84–96.
- François-Brosseau FE, Martinu K, Strafella AP, Petrides M, Simard F, Monchi O. 2009. Basal ganglia and frontal involvement in self-generated and externally-triggered finger movements in the dominant and non-dominant hand. *Eur J Neurosci.* 29(6):1277-86.
- Frank C, Pari G, Rossiter JP. 2006. Approach to diagnosis of Parkinson disease. *Can Fam Physician.* 52:862-8.
- Gao J, Liu R, Zhao E, Huang X, Nalls MA, Singleton AB, Chen H. 2015. Head injury, potential interaction with genes, and risk for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 21(3):292-6.
- Gerfen CR, Wilson CJ. 1996. The basal ganglia. In: Swanson LW, Bjorklund A, Hokfelt T (eds) *Handbook of Chemical Neuroanatomy* (12th Edition). Elsevier, Amsterdam, pp 371–468.
- Getzoff ED, Cabelli DE, Fisher CL, Parge HE, Viezzoli MS, Banci L, Hallewell RA. 1992. Faster superoxide dismutase mutants designed by enhancing electrostatic guidance. *Nature.* 358:347–351.
- Getzoff ED, Tainer JA, Weiner PK, Kollman PA, Richardson JS, Richardson DC. 1983. Electrostatic recognition between superoxide and copper, zinc superoxide dismutase. *Nature.* 306:287–290.
- Gil C, Chaib-Oukadour I, Aguilera J. 2003. C-terminal fragment of tetanus toxin heavy chain activates Akt and MEK/ERK signalling pathways in a Trk receptor-dependent manner in cultured cortical neurons. *Biochem J.* 373(Pt 2):613-20.
- Gil C, Chaib-Oukadour I, Blasi J, Aguilera J. 2001. HC fragment (C-terminal portion of the heavy chain) of tetanus toxin activates protein kinase C isoforms and phosphoproteins involved in signal transduction. *Biochem J.* 356(Pt 1):97-103.
- Graham DG, Tiffany SM, Bell WR Jr, Gutknecht WF. 1978. Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. *Mol Pharmacol.* 14(4):644-53.
- Greengard P, Allen PB, Nairn AC. 1999. Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron.* 23:435-447.
- Grünblatt E, Mandel S, Youdim MB. 2000. MPTP and 6-hydroxydopamine-induced neurodegeneration as models for Parkinson's disease: neuroprotective strategies. *J Neurol.* Apr;247 Suppl 2:II95-102.
- Gubellini P, Kachidian P. 2015. Animal models of Parkinson's disease: An updated overview. *Rev Neurol (Paris).* 171(11):750-61.
- Guillot TS, Miller GW. 2009. Protective actions of the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) in monoaminergic neurons. *Mol Neurobiol.* 39(2):149-70.

- Gurevich EV, Joyce JN. 1999. Distribution of dopamine D3 receptor expressing neurons in the human forebrain: comparison with D2 receptor expressing neurons. *Neuropsychopharmacology*. 20(1):60-80.
- Habermann E, Dreyer F. 1986. Clostridial neurotoxins: Handling and action at the cellular and molecular level. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 129:93–179.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med.* 18(1):125-6.
- Halliwell B. 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging.* 18(9):685-716.
- Halliwell B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 97(6):1634-58.
- Hebb MO, Robertson HA. J. 2000. Identification of a subpopulation of substantia nigra pars compacta gamma-aminobutyric acid neurons that is regulated by basal ganglia activity. *Comp Neurol.* 416(1):30-44.
- Heise K, Puntarulo S, Pörtner HO, Abele D. 2003. Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) under heat stress. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 134(1):79-90.
- Huang Z, de la Fuente-Fernández R, Stoessl AJ. 2003. Etiology of Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci.* Mar;30 Suppl 1:S10-8.
- Hubble JP. 2002. Long-term studies of dopamine agonists. *Neurology.* 58(4 Suppl 1):S42-50.
- Hung HC, Lee EH. 1998. MPTP produces differential oxidative stress and antioxidative responses in the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways. *Free Radic Biol Med.* 24(1):76-84.
- Ibáñez CF, Simi A. 2012. p75 neurotrophin receptor signaling in nervous system injury and degeneration: paradox and opportunity. *Trends Neurosci.* 35(7):431-40.
- Jackson DM, Westlind-Danielsson A. 1994. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther.* 64:291-370.
- Jellinger K, Linert L, Kienzl E, Herlinger E, Youdim MB. 1995. Chemical evidence for 6-hydroxydopamine to be an endogenous toxic factor in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 46:297-314.
- Jenner P, Schapira AH, Marsden CD. 1992. New insights into the cause of Parkinson's disease. *Neurology.* 42(12):2241-50.
- Jenner P. 2002. Pharmacology of dopamine agonists in the treatment of Parkinson's disease. *Neurology.* 58(4 Suppl 1):S1-8.
- Johnson E.A. 1999. Clostridial toxins as therapeutic agents: Benefits of nature's most toxic proteins. *Ann. Rev. Microbiol.* 53:551–575.

- Karoum F, Chrapusta SJ, Egan MF, Wyatt RJ. 1993. Absence of 6-hydroxydopamine in the rat brain after treatment with stimulants and other dopaminergic agents: a mass fragmentographic study. *J Neurochem.* 61(4):1369-75.
- Kawaguchi Y. 1993. Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci.* 13(11):4908-23.
- Kemp JM, Powell TP. 1971. The synaptic organization of the caudate nucleus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 262(845):403-12.
- Kiebertz K, Wunderle KB. 2013. Parkinson's disease: evidence for environmental risk factors. *Mov Disord.* 28(1):8-13.
- Kim CY, Alcalay RN. 2017. Genetic Forms of Parkinson's Disease. *Semin Neurol.* 37(2):135-146
- Kim SH, Won SJ, Sohn S, Kwon HJ, Lee JY, Park JH, Gwag BJ. 2002. Brain-derived neurotrophic factor can act as a proneurotrophic factor through transcriptional and translational activation of NADPH oxidase. *J Cell Biol.* 159(5):821-31.
- Kinnula VL, Crapo JD. 2003. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 167(12):1600-19.
- Kirik D, Rosenblad C, Björklund A. 1998. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol.* 152(2):259-77.
- Kita H. 1993. GABAergic circuits of the striatum. *Prog Brain Res.* 99:51-72.
- Kreitzer AC. 2009. Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annu Rev Neurosci.* 32:127-47.
- Kumer SC, Vrana KE. 1996. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem.* 67(2):443-62.
- Kunikowska G, Jenner P. 2001. 6-Hydroxydopamine-lesioning of the nigrostriatal pathway in rats alters basal ganglia mRNA for copper, zinc- and manganese-superoxide dismutase, but not glutathione peroxidase. *Brain Res.* 922(1):51-64.
- Kwakye GF, McMinimy RA, Aschner M. 2017. Disease-Toxicant Interactions in Parkinson's Disease Neuropathology. *Neurochem Res.* 42(6):1772-1786.
- Lah MS, Dixon MM, Patridge KA, Stallings WC, Fee JA, Ludwig ML. 1995. Structure-function in *Escherichia coli* iron superoxide dismutase: comparisons with the manganese enzyme from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry.*;34:1646-1660.
- Lalli G, Schiavo G. 2002. Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75NTR. *J Cell Biol.* 156(2):233-9.
- Lanciego JL, Luquin N, Obeso JA. 2012. Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2(12):a009621.

- Langston JW, Ballard P, Tetrad JW, Irwin I. 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. Feb 25;219(4587):979-80.
- Le WD, Jankovic J, Xie W, Appel SH. 2000. Antioxidant property of pramipexole independent of dopamine receptor activation in neuroprotection. *J Neural Transm (Vienna)*. 107(10):1165-73.
- Ledley FD, DiLella AG, Kwok SC, Woo SL. 1985. Homology between phenylalanine and tyrosine hydroxylases reveals common structural and functional domains. *Biochemistry*. 24(14):3389-94.
- Lee CR, Tepper JM. 2007. Morphological and physiological properties of parvalbumin- and calretinin-containing gamma-aminobutyric acidergic neurons in the substantia nigra. *J Comp Neurol*. 500:958–972
- Li C, Guo Y, Xie W, Li X, Janokovic J, Le W. 2010. Neuroprotection of pramipexole in UPS impairment induced animal model of Parkinson's disease. *Neurochem Res*. 35(10):1546-56. doi: 10.1007/s11064-010-0214-3. Epub 2010 Jul 16.
- Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet*. 1995;11:376–381.
- Liochev SI, Fridovich I. J. 2002. Copper, zinc superoxide dismutase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Effects of bicarbonate on inactivation and oxidations of NADPH and urate, and on consumption of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Biol Chem*. 277(38):34674-8.
- Ludwig ML, Metzger AL, Patridge KA, Stallings WC. 1991. Manganese superoxide dismutase from *Thermus thermophilus*. A structural model refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol*. 219:335–358.
- Maj J, RogóZ Z, Skuza G, Kołodziejczyk K. 1997. The behavioural effects of pramipexole, a novel dopamine receptor agonist. *Eur J Pharmacol*. 324(1):31-7.
- Malessa S, Hirsch EC, Cervera P, Duyckaerts C, Agid Y. 1990. Catecholaminergic systems in the medulla oblongata in parkinsonian syndromes: a quantitative immunohistochemical study in Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy, and striatonigral degeneration. *Neurology*. 40(11):1739-43.
- Mann T, Keilin D. 1938. Haemocuprein and hepatocuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals. *Proc Roy Soc Ser B-Biol Sci*. 126:303–315.
- Marnett LJ. 1999. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res*. Mar 424(1-2):83-95.
- McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyuprein (hemocuprein) *J Biol Chem*. 244:6049–6055.
- Melov S, Coskun P, Patel M, Tuinstra R, Cottrell B, Jun AS, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Goodman SI, Huang TT, Mizioroko H, Epstein CJ, Wallace DC. 1999. Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:846–851.

- Melov S, Doctrow SR, Schneider JA, Haberson J, Patel M, Coskun PE, Huffman K, Wallace DC, Malfroy B. 2001. Lifespan extension and rescue of spongiform encephalopathy in superoxide dismutase 2 nullizygous mice treated with superoxide dismutase-catalase mimetics. *J Neurosci.*;21:8348–8353.
- Méndez-Alvarez E, Soto-Otero R, Hermida-Ameijeiras A, López-Martín ME, Labandeira-García JL. 2001. Effect of iron and manganese on hydroxyl radical production by 6-hydroxydopamine: mediation of antioxidants. *Free Radic Biol Med.* Oct 15;31(8):986-98.
- Mendieta L, Bautista E., Sánchez A., Guevara J., Herrando-Grabulosa M., Moran J., Martínez R., Aguilera J., Limón ID. (2012) The C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin given by intramuscular injection causes neuroprotection and improves the motor behavior in rats treated with 6-hydroxydopamine. *Neurosci Res.* 74(2):156-67
- Mendieta L, Granado N., Aguilera J., Tizabi Y., Moratalla R. (2016). Fragment C Domain of Tetanus Toxin Mitigates Methamphetamine Neurotoxicity and Its Motor Consequences in Mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* 19(8). pii: pyw021
- Mendieta L, Venegas B., Moreno N., Patricio A., Martínez I., Aguilera J., Limón I.D. 2009. The carboxyl-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin prevents dopaminergic degeneration and improves motor behaviour in rats with striatal MPP+ -lesions. *Neurosci. Res.* 65:98–106.
- Mierau J, Schingnitz G. 1992. Biochemical and pharmacological studies on pramipexole, a potent and selective dopamine D2 receptor agonist. *Eur J Pharmacol.* 215(2-3):161-70.
- Mierau J, Schneider FJ, Ensinger HA, Chio CL, Lajiness ME, Huff RM. 1995. Pramipexole binding and activation of cloned and expressed dopamine D2, D3 and D4 receptors. *Eur J Pharmacol.* 290(1):29-36.
- Miller AF, Sorkin DL, Padmakumar K. 2005. Anion binding properties of reduced and oxidized iron-containing superoxide dismutase reveal no requirement for tyrosine 34. *Biochemistry.* 44:5969–5981.
- Mochida S. 2000. Protein-protein interactions in neurotransmitter release. *Neurosci. Res.* 36:175–182.
- Molinoff PB, Axelrod J. 1971. Biochemistry of catecholamines.. *Annual Review of Biochemistry.*; 40:465–500.
- Moore RY, Bloom FE. 1978. Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the dopamine systems. *Annu Rev Neurosci.* 1:129-69.
- Moreno-Igoa M, Calvo AC., Ciriza J., Muñoz MJ., Zaragoza P., Osta R. (2012). Non-viral gene delivery of the GDNF, either alone or fused to the C-fragment of tetanus toxin protein, prolongs survival in a mouse ALS model. *Restor Neurol Neurosci.*30(1):69-80.
- Muñoz P, Huenchuguala S, Paris I, Segura-Aguilar J. 2012. Dopamine oxidation and autophagy. *Parkinsons Dis.* 2012:920953.

- Murphy KE, Park JJ. 2017. Can Co-Activation of Nrf2 and Neurotrophic Signaling Pathway Slow Alzheimer's Disease? *Int J Mol Sci.* 18(6)
- Nagatsu T, Ichinose H. 1999. Regulation of pteridine-requiring enzymes by the cofactor tetrahydrobiopterin. *Mol Neurobiol.* 19(1):79-96.
- Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S. 1964. Conversion of L-tyrosine to 3,4-dihydroxy-phenylalanine by cell-free preparations of brain and sympathetically innervated tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 1964;14:543-9.
- Nagatsu T, Nagatsu I. J 2016. Tyrosine hydroxylase (TH), its cofactor tetrahydrobiopterin (BH4), other catecholamine-related enzymes, and their human genes in relation to the drug and gene therapies of Parkinson's disease (PD): historical overview and future prospects. *Neural Transm (Vienna).* 123(11):1255-1278.
- Nemoto C, Hida T, Arai R. 1999. Calretinin and calbindin-D28k in dopaminergic neurons of the rat midbrain: a triple-labeling immunohistochemical study. *Brain Res* 846 (1): 129–136.
- Ohtaki H, Takeda T, Dohi K, Yofu S, Nakamachi T, Satoh K, Hiraizumi Y, Miyaoka H, Matsunaga M, Shioda S. 2007. Increased mitochondrial DNA oxidative damage after transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Neurosci Res.* 58(4):349-55.
- Oorschot DE. 1996. Total number of neurons in the neostriatal, pallidal, subthalamic, and substantia nigral nuclei of the rat basal ganglia: a stereological study using the cavalieri and optical disector methods. *J Comp Neurol.* 366(4):580-99.
- Parkinson J. 1817. An essay on the shaking palsy. Whittingham and Rowland for Sherwood, Neely and Jones.
- Pellizari R., Rossetto O., Schiavo G., Montecucco C. 1999. Tetanus and botulinum neurotoxins: Mechanism of action and therapeutic uses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* 354:259–268.
- Perry JJ, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA. 2010. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta.* 1804(2):245-62.
- Piercey MF, Hoffmann WE, Smith MW, Hyslop DK. 1996. Inhibition of dopamine neuron firing by pramipexole, a dopamine D3 receptor-preferring agonist: comparison to other dopamine receptor agonists. *Eur J Pharmacol.* 312(1):35-44.
- Porter CC, Totaro JA, Stone CA. 1963. Effect of 6-hydroxydopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice. *Pharmacol Exp Ther.* 140:308-16.
- Radenovic L, Selakovic V, Oliván S, Calvo AC, Rando A, Janac B, Osta R. 2014. Neuroprotective efficiency of tetanus toxin C fragment in model of global cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *Brain Res Bull.* 101:37-44.

- Ramirez AD, Wong SK, Menniti FS. 2003. Pramipexole inhibits MPTP toxicity in mice by dopamine D3 receptor dependent and independent mechanisms. *Eur J Pharmacol.* 475(1-3):29-35.
- Rana AQ, Siddiqui I, Yousuf MS. J. 2012. Challenges in diagnosis of young onset Parkinson's disease. *Neurol Sci.* 323(1-2):113-6.
- Rangel-Barajas C, Coronel I, Florán B. 2015. Dopamine Receptors and Neurodegeneration. *Aging Dis.* 6(5):349-68.
- Razgado-Hernandez LF, Espadas-Alvarez AJ, Reyna-Velazquez P, Sierra-Sanchez A, Anaya-Martinez V, Jimenez-Estrada I, Bannon MJ, Martinez-Fong D, Aceves-Ruiz J. 2015. The transfection of BDNF to dopamine neurons potentiates the effect of dopamine D3 receptor agonist recovering the striatal innervation, dendritic spines and motor behavior in an aged rat model of Parkinson's disease. *PLoS One.* 10(2):e0117391.
- Reeve A, Simcox E, Turnbull D. 2014. Ageing and Parkinson's disease: why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing Res Rev.* 14:19-30.
- Richter C, Park J, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. 1988. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:6465-6467.
- Rodríguez M, Barroso-Chinea P, Abdala P, Obeso J, Gonzalez-Hernandez T. 2001. Dopamine cell degeneration induced by intraventricular administration of 6-hydroxydopamine in the rat: similarities with cell loss in parkinson's disease. *Exp Neurol* 169 (1): 163-181.
- Rodriguez M, Morales I, Rodriguez-Sabate C, Sanchez A, Castro R, Brito JM, Sabate M. 2014. The degeneration and replacement of dopamine cells in Parkinson's disease: the role of aging. *Front Neuroanat.* 8:80.
- Ryan BJ, Hoek S, Fon EA, Wade-Martins R. 2015. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. *Trends Biochem Sci.* 40(4):200-10.
- Salonen T, Haapalinna A, Heinonen E, Suhonen J, Hervonen A. 1996. Monoamine oxidase B inhibitor selegiline protects young and aged rat peripheral sympathetic neurons against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Acta Neuropathol.* 91(5):466-74.
- Sánchez-González A., Mendieta L., Palafox V., Candalija A., Luna F., Aguilera J., Limón ID. (2014). The restorative effect of intramuscular injection of tetanus toxin C-fragment in hemiparkinsonian rats. *Neurosci Res.* 84:1-9.
- Sánchez-Iglesias S, Rey P, Méndez-Alvarez E, Labandeira-García JL, Soto-Otero R. 2007. Time-course of brain oxidative damage caused by intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine in a rat model of Parkinson's disease. *Neurochem Res.* 32(1):99-105.

- Sanyal J, Chakraborty DP, Sarkar B, Banerjee TK, Mukherjee SC, Ray BC, Rao VR. 2010. Environmental and familial risk factors of Parkinson's disease: case-control study. *Can J Neurol Sci.* 37(5):637-42.
- Sarkaki A, Farbood Y, Dolatshahi M, Mansouri SM, Khodadadi A. 2016. Neuroprotective Effects of Ellagic Acid in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Acta Med Iran.* 54(8):494-502.
- Schapira AH, Jenner P. 2011. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 26(6):1049-55.
- Schneider SA, Obeso JA. 2015. Clinical and Pathological Features of Parkinson's disease, Chapter 8. *Behavioral Neurobiology of Huntington's Disease and Parkinson's Disease* pp.205-220. Springer Heidelberg. ISSN 1866-3389.
- Segura-Aguilar J, Kostrzewa RM. 2006. Neurotoxins and neurotoxicity mechanisms. An overview. *Neurotox Res.* 10(3-4):263-87.
- Seitz G, Bruchelt G, Kuci Z, Roginsky VA, Wolburg H, Stegmann HB, Niethammer D. 2000. 6-fluorodopamine selectively destroys neuroblastoma cells expressing the noradrenaline transporter. *Med Pediatr Oncol.* 35(6):612-5.
- Senoh, S. Witkop, B. 1959. Non-enzymatic conversions of dopamine to norepinephrine and trihydroxyphenethylamine. *J. Amer. chem. Soc.*, 81, 6222-6231.
- Sethy VH, Wu H, Oostveen JA, Hall ED. 1997. Neuroprotective effects of the dopamine agonists pramipexole and bromocriptine in 3-acetylpyridine-treated rats. *Brain Res.* 754(1-2):181-6.
- Simola N, Morelli M, Carta AR. 2007. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox Res.* Apr;11(3-4):151-67.
- Singh S, Kumar S, Dikshit M. 2010. Involvement of the mitochondrial apoptotic pathway and nitric oxide synthase in dopaminergic neuronal death induced by 6-hydroxydopamine and lipopolysaccharide. *Redox Rep.* 15(3):115-22
- Sinha K, Box M, Lalli G, Schiavo G, Schneider H, Groves M, Siligardi G, Fairweather N. 2000. Analysis of mutants of tetanus toxin Hc fragment: ganglioside binding, cell binding and retrograde axonal transport properties. *Mol Microbiol.* 37(5):1041-51.
- Slivka A, Cohen G. 1985. Hydroxyl radical attack on dopamine. *J Biol Chem.* 260(29):15466-72.
- Smith Y, Kieval JZ. 2000. Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 23(10 Suppl):S28-33.
- Solis O, Limón DI, Flores-Hernández J, Flores G. 2007. Alterations in dendritic morphology of the prefrontal cortical and striatum neurons in the unilateral 6-OHDA-rat model of Parkinson's disease. *Synapse.* 61(6):450-8.
- Soto-Otero R, Méndez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, Muñoz-Patiño AM, Labandeira-Garcia JL. 2000. Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants:

- potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 74(4):1605-12.
- Subramanian M, Roeper J. 2010. Subtypes of midbrain dopamine neurons. Chapter 1. Handbook of basal ganglia structure and function. Second edition., pp. 317-334.
- Tainer JA, Getzoff ED, Beem KM, Richardson JS, Richardson DC. J. 1982. Determination and analysis of the 2 A-structure of copper, zinc superoxide dismutase. *Mol Biol.* 160(2):181-217.
- Tainer JA, Getzoff ED, Richardson JS, Richardson DC. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. 1983. *Nature.*;306:284–287.
- Taravini IR, Larramendy C, Gomez G, Saborido MD, Spaans F, Fresno C, González GA, Fernández E, Murer MG, Gershanik OS. 2016. Contrasting gene expression patterns induced by levodopa and pramipexole treatments in the rat model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology.* 101:576-89.
- Tepper JM, Abercrombie ED, Bolam JP. 2007. Basal ganglia macrocircuits. *Prog Brain Res.* 160:3–7.
- Toivonen JM, Oliván S, Osta R. 2010. Tetanus toxin C-fragment: the courier and the cure? *Toxins (Basel).* 2(11):2622-44.
- Tranzer JP, Thoenen H. 1973 Selective destruction of adrenergic nerve terminals by chemical analogues of 6-hydroxydopamine. *Experientia.* 29(3):314-5.
- Trinh J, Farrer M. 2013. Advances in the genetics of Parkinson disease. *Nat Rev Neurol.* 9(8):445-54.
- Tsuboi K, Kimber TA, Shults. CW. 2000. Calretinin-containing axons and neurons are resistant to an intrastriatal 6-hydroxydopamine lesion. *Brain Res* 866 (1–2): 55–64.
- Ungar D., Hughson F.M. 2003. SNARE protein structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19:493–517.
- Ungerstedt U. 1968. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol.* Dec;5(1):107-10.
- Vu TQ, Ling ZD, Ma SY, Robie HC, Tong CW, Chen EY, Lipton JW, Carvey PM. 2000. Pramipexole attenuates the dopaminergic cell loss induced by intraventricular 6-hydroxydopamine. *J Neural Transm (Vienna).* 107(2):159-76.
- Waters CH. 2002. Treatment of advanced stage patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 9(1):15-21.
- Waters CH. 2008. Diagnosis and management of Parkinson's Disease (Vol. 6). Caddo: Professional Communications.
- Weissmiller AM, Wu C. 2012. Current advances in using neurotrophic factors to treat neurodegenerative disorders. *Transl Neurodegener.* 1(1):14. doi: 10.1186/2047-9158-1-14.
- Whittaker MM, Whittaker JW. 1996. Low-temperature thermochromism marks a change in coordination for the metal ion in manganese superoxide dismutase. *Biochemistry.*;35:6762–6770.

- Yamada T, McGeer PL, Baimbridge KG, McGeer EG. 1990. Relative sparing in Parkinson's disease of substantia nigra dopamine neurons containing calbindin-D28K. *Brain Res* 526 (2): 303–307.
- Yamamoto M. 1998. Do dopamine agonists provide neuroprotection? *Neurology*. 51(2 Suppl 2):S10-2.
- Yan MH, Wang X, Zhu X. 2013. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med*. 62:90-101.
- Yetnikoff L, Lavezzi HN, Reichard RA, Zahm DS. 2014. An update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex. *Neuroscience*. 282:23-48.
- Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y. 1996. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93(7):2696-701.
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 33(3):337-49.