



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

**DEGENERACION NIGROESTRIADA Y
DETERIORO MOTOR POR EXPOSICIÓN PRENATAL
A LA ROTENONA EN LA RATA**

Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas y de la Salud

P R E S E N T A

M. en C. Blanca Margarita Gómez Chavarín

Comité tutorial:

DR. CARLOS A. TORNER AGUILAR

Director - Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco

DR. GABRIEL ROLDAN ROLDAN

Codirector - Universidad Nacional Autónoma de México-Facultad de Medicina

DRA. MA. JESUS FERRARA GUERRERO

Asesor - Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco

(Septiembre/2012)

“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la
Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de
Posgrados de Excelencia del CONACyT y cuenta con apoyo del mismo
Consejo, con el convenio PFP-20-93”.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud
aprobó la tesis que presentó

M. en C. Blanca Margarita Gómez Chavarín

El 28 de septiembre de 2012

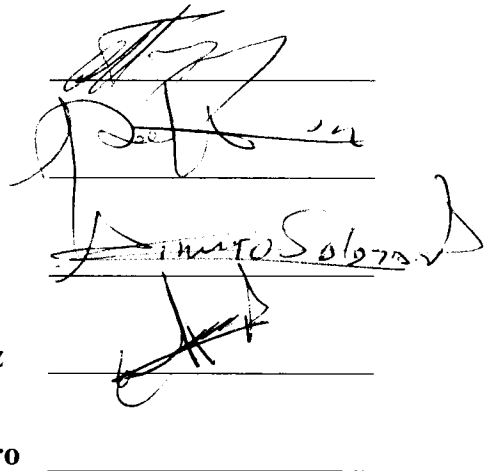
Presidente Dr. Carlos A. Torner Aguilar

Secretario Dr. Gabriel Roldán Roldán

Vocal Dr. Alberto Salazar Juarez

Vocal Dra. Elizabeth Hernandez Perez

Vocal Dra. Ma. Jesus Ferrara Guerrero



Handwritten signatures of the jury members, each written over a horizontal line. The signatures are: Carlos A. Torner Aguilar, Gabriel Roldán Roldán, Alberto Salazar Juarez, Elizabeth Hernandez Perez, and Ma. Jesus Ferrara Guerrero.

D e d i c a t ó r i a s

Con todo mi amor para ti Mami (†) y para ti Andrés, por quien cada día me esfuerzo para nunca dejar de ser su mejor amiga.

A mis queridos hermanos Rocy y Alejandro, y a mis sobrinos Rocie, Humberto, Ale y Florecita, pero sobre todo a nuestros nuevos angelitos Danielle y Samuel quienes han inyectado alegría y esperanzas a nuestra familia.

A Ricardo por que su compañía facilito el camino de este proyecto.

A g r a d e c i m i e n t o s

Al finalizar un trabajo arduo y lleno de tropiezos como el desarrollo de mi tesis doctoral es inevitable que me asalte un muy humano egocentrismo que me lleva a concentrar la mayor parte del mérito en lo que he hecho. Sin embargo, el análisis objetivo me muestra inmediatamente que lo que he hecho hubiese sido imposible sin la participación de personas e instituciones que han facilitado las cosas para que este trabajo llegue a un feliz término. Por ello, es para mí placentero utilizar este espacio para ser justa y expresar mi especial y sincero agradecimiento a mis Profesores los Doctores Carlos Torner, Gabriel Roldan y Gabriel Gutiérrez Ospina quienes aceptaron guiarme para realizar este trabajo. Su apoyo y confianza en mi trabajo, así como su capacidad para guiar mis ideas han sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como persona. Las ideas propias, siempre enmarcadas en su orientación y rigurosidad, han sido la clave del buen trabajo que hemos realizado juntos, el cual no se puede concebir sin su oportuna participación. Le agradezco también al Dr. Juan Fernández Ruiz el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis. Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a mis amigos Rosalinda Díaz y Gabriel Pérez Soto por su importante participación activa en el desarrollo de esta tesis. Debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad que hizo que nuestro trabajo redundara benéficamente tanto a nivel científico como personal. No

cabe duda que su participación ha enriquecido el trabajo realizado y, además, ha significado el surgimiento de una sólida amistad.

No quisiera dejar de dar mi más sincero agradecimiento a mis maestros el Dr. Alberto Salazar Juárez y la Dra. Elizabeth Hernández Pérez, quienes sin sus acertados comentarios sobre el manuscrito de esta tesis no hubiese sido posible la culminación de este trabajo.

RESUMEN

La rotenona (ROT) es el compuesto más potente una familia de citotóxicos naturales que se extraen de las raíces de algunas leguminosas como el barbasco (*Derris elliptica*). Tiene una vida media corta en el medio ambiente (2-3 días) y fácilmente se descompone con la luz solar. Por su origen natural la ROT ha sido ampliamente utilizada como insecticida para el control de plagas de áfidos y pulgones en la agricultura y en uso doméstico, así como para eliminar peces en lagos (Caboni y cols. 2004; Bove y cols. 2005).

La ROT es un compuesto de alta solubilidad en lípidos, lo que le brinda fácil acceso a todos los órganos; en el cerebro alcanza su máxima concentración después de 15 min. Una vez dentro, la ROT se acumula subcelularmente en las mitocondrias, donde se une a la enzima nicotinamida-adenín-dinucleótido-deshidrogenasa (NADH-deshidrogenasa) del complejo I de la cadena de transporte de electrones (Kilbourn y cols. 1997; Betarbet y cols. 2002; Keeney y cols. 2006). Por la unión de la ROT al complejo I mitocondrial, se utiliza experimentalmente como un potente inhibidor este complejo.

En los EU, algunas áreas agrícolas tratadas con ROT están bajo estricto control debido al aumento en la incidencia de síntomas de la enfermedad de Parkinson en la población, lo que se ha atribuido a la exposición ocupacional a la ROT, entre otros pesticidas (Ritz y cols. 2000). Hay estudios epidemiológicos que muestran una relación positiva entre la exposición a pesticidas y la enfermedad de Parkinson (Vanacore y cols. 2002; Wirdefeldt K y cols. 2011). Los datos sugieren que la ROT puede tener efectos neurotóxicos que predisponen al desarrollo de la enfermedad de Parkinson (Barlow y cols. 2004; Uversky y cols. 2004; Cory-Slechta y cols. 2005; Landrigan y cols. 2005).

El panorama en México sobre el riesgo que representa la exposición a estos pesticidas es más complejo, debido al escaso control de éstos. A pesar de que la ROT se utiliza ampliamente en el sureste y en las zonas camaroneras del norte del país, no se tienen registros sobre el uso de este u otros insecticidas.

Estudios realizados por Ranjita Betarbet en 2000 y 2002 en ratas adultas mostraron que la exposición a ROT induce disminución de las neuronas dopaminérgicas y aumento del número de neuronas positivas a α -sinucleína de la sustancia nigra, lo que condiciona trastornos motores tales como catalepsia y trastornos de coordinación.

En 1999 Langston y cols. propusieron que la exposición a sustancias neurotóxicas en edades tempranas puede reducir el número de neuronas en la sustancia nigra, a un nivel mínimo requerido para mantener la funcionalidad neuronal aparentemente normal. Pero a pesar de que las evidencias epidemiológicas y los datos obtenidos con modelos de la enfermedad de Parkinson en rata, apuntan a que la ROT es un factor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad, todavía se desconoce si la exposición a ROT de madres gestantes y/o lactantes puede afectar el desarrollo del sistema dopaminérgico nigroestriatal en sus crías, y producirles parkinsonismo o lesiones asociadas con la enfermedad de Parkinson en edades posteriores.

Por lo tanto se requiere generar información sobre los efectos tóxicos en la vía nigroestriada en desarrollo que contesten preguntas fundamentales ¿como la ROT durante el desarrollo embrionario puede inducir daños en las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales en desarrollo?, ¿los daños iniciados en el desarrollo embrionario pueden conducir al desarrollo del síndrome parkinsonico en los adultos jóvenes, o hacer más susceptibles a estas neuronas al daño después de varias exposiciones a ésta toxina o a otros xenobióticos?

Para tratar de contestar estas preguntas, ratas Wistar gestantes fueron tratadas con ROT in útero y durante la lactancia, así como tratadas únicamente in útero o la lactancia, con el fin de identificar la etapa de desarrollo en la que la ROT puede provocar mayor daño en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra en sus crías. Se consideraron tres diferentes edades en las crías: la postnatal, jóvenes adultas y ratas de 12 meses de edad en las que se cuantificaron tres de las principales características fisiopatológicas de la enfermedad de Parkinson: la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, la concentración de la proteína α -sinucleína en la sustancia nigra y el estriado, y la capacidad para ejecutar una prueba de actividad motora.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la exposición a ROT en etapas temprana del neurodesarrollo (la gestación y la lactancia) de las ratas produce daños en la sustancia nigra, no solo en las crías expuestas indirectamente a ella, sino también en las madres, originando la disminución del número de neuronas tirosina hidroxilasa positivas, aumento en el contenido de la proteína α -sinucleína, que resultó ligeramente mayor en la *sustancia nigra* que en el estriado, ambos parámetros guardan una estrecha relación con deficiencias motoras observadas, que dependen de la etapa del neurodesarrollo y de la dosis de ROT a la que las crías se exponen, los valores de los

parámetros evaluados se exacerbaban significativamente: 1) cuando la exposición a ROT se prolonga hasta la lactancia tras la administración de esta a las hembras gestantes, lo que sugiere el paso de la ROT a través de la placenta, la leche materna y la barrera hematoencefálica inmadura en las crías y 2) cuando ocurre una segunda exposición a ROT en la edad adulta, lo que pone de manifiesto la vulnerabilidad del sistema dopaminérgico nigroestriatal a daños que ocurren por posteriores exposiciones, observándose en las crías deficiencias motoras progresivas con el avance de la edad, disminución hasta del 75% de las neuronas dopaminérgicas TH-IR en la *sustancia nigra*, así como aumento en el número de neuronas de la *sustancia nigra* marcadas con el fluoróforo fluoroJade C, que tiene alta afinidad por las neuronas en proceso de neurodegeneración.

ABSTRACT

Rotenone (ROT) is the most potent compound of a family of natural cytotoxins extracted from the roots of some legumes such as barbasicum (*Derris elliptica*). It has a short half life in the environment (2-3 days) and easily decomposes with sunlight. For its natural origin the ROT has been widely used as domestic insecticide as well as in the control aphids in pests and agriculture, and for eliminate fish in lakes (Caboni et al. 2004, Bove et al. 2005).

The ROT has highly solubility in lipids; it gives easy access to all the organs, in the brain reaches its peak after 15 min. Inside of the cells, the ROT accumulates in the mitochondria, where it binds to the enzyme nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase (NADH dehydrogenase) of the complex I in the electron transport chain (Kilbourn et al. 1997; Betarbet and cols. 2002, Keeney et al. 2006). The ROT has widely used experimentally as a potent inhibitor mitochondrial complex I.

In the USA, some agricultural areas treated with ROT are under strict control because the increased in the incidence of symptoms of Parkinson's disease in the population, which has been attributed to occupational exposure to the ROT, among other pesticides (Ritz and cols. 2000). Epidemiological studies show a positive relationship between exposure to pesticides and Parkinson's disease (Vanacore et al. 2002; Wirdefeldt K et al. 2011). The data suggest that the ROT may have neurotoxic effects that influence the development of Parkinson's disease (Barlow et al. 2004, Uversky et al. 2004, Cory-Slechta et al. 2005, Landrigan et al. 2005).

The picture in Mexico on the risk by exposure to these pesticides is more complex, due to poor control of these. Although the ROT is used widely in agriculture areas in the southeast of the country and in the shrimp culture areas of northern, however there are no records of the use of this and other insecticides.

Studies by Ranjita Betarbet in adult rats showed that exposure to ROT induced decrease of dopaminergic neurons and increased numbers of neurons positive for α - synuclein in the *substantia nigra*, which affects motor disorders such as catalepsy and impaired coordination.

In 1999, Langston et al. suggested that exposure to neurotoxic substances at early age may reduce the number of neurons in the *substantia nigra*, in a minimum level required to maintain neuronal function appears normal. But although the epidemiological evidence and data obtained with models of Parkinson's disease in rats

suggest that the ROT is a risk factor for developing this disease, it is still unknown whether exposure to pregnant mothers ROT and /or nursing may affect the development of the nigrostriatal dopaminergic system in their offspring, and cause them injury associated with parkinsonism or Parkinson's disease later in life.

It is therefore necessary to generate information on the toxic effects in the nigrostriatal pathway in development to answer fundamental questions how do the ROT during embryonic development can induce damage in nigrostriatal dopaminergic neurons in development?, Will the damage initiated in embryonic development may lead to the development of the parkinsonian syndrome in young adults rats, or make these neurons more susceptible to damage after repeated exposure to this toxin or other xenobiotics?

To try to answer these questions, pregnant Wistar rats were treated with ROT *in utero* and during lactation, and treated only *in utero* or breastfeeding, in order to identify the developmental stage in which the ROT can cause more damage to the dopaminergic neurons of the *substantia nigra* in the offspring. We considered three different ages in the offspring: the postnatal, young adult rats and elderly rats of 12 months of age that were quantified in three major pathophysiological features of Parkinson's disease: loss of dopaminergic neurons in the *substantia nigra*, the concentration of α -synuclein protein in the *substantia nigra* and the striatum, and the ability to execute a test of motor activity.

The results obtained in this study suggest that exposure to early stage ROT neurodevelopment (gestation and lactation) rats produces damage in the *substantia nigra*, not only in pups exposed to it indirectly, but also on mothers causing the decreased number of tyrosine hydroxylase positive neurons, increased content of α -synuclein protein, which result slightly higher in the *substantia nigra* than in the striatum, both parameters are closely related with motor impairments observed, depending on neurodevelopment stage and ROT dose to which the pups are exposed, the values of the parameters evaluated was significantly exacerbated when: 1) exposure to ROT extends through lactation after administration of the pregnant females, suggesting the passage of the ROT through the placenta, breast milk and immature blood-brain barrier in the offspring and 2) when it occurs a second exposure to ROT in adulthood, which highlights the vulnerability of the dopaminergic system nigrostriatal damage that occur after exposure was observed in the offspring progressive motor deficits with advancing age, decreased to 75% of TH-IR dopaminergic neurons in the

substantia nigra and increased number of neurons in the *substantia nigra* labeled with the fluorescent dye Fluoro-Jade C that has high affinity for the neurons in the process of neurodegeneration.

INDICE

1	INTRODUCCION	1
2	ANTECEDENTES	
2.1	Los ganglios basales	3
2.1.1	La vía nigroestriada	4
2.1.2	Estriado	4
2.1.3	<i>Sustancia nigra</i>	5
2.1.4	Histogénesis de las neuronas dopaminérgicas de la <i>sustancia nigra</i>	5
2.2	Dopamina	7
2.2.1	Secuestro de la dopamina por vesículas sinápticas	9
2.2.2	Metabolismo de la dopamina	9
2.2.3	Dopamina y estrés oxidativo	10
2.3	Enfermedad de Parkinson	11
2.3.1	Epidemiología de la enfermedad de Parkinson en México	12
2.3.2	Enfermedad de Parkinson y síntesis y metabolismo de la dopamina	15
2.4	Estrés oxidativo	18
2.5	Cuerpos de Lewy y α -sinucleína	22
2.5.1	Expresión de la α -sinucleína en el neurodesarrollo.	22
2.5.2	Formación de los Cuerpos de Lewy	24
2.5.3	Cuerpos de Lewy y el sistema proteosómico de ubiquitina	26
2.6	Deterioro neuronal por daño en el proteosoma	27
2.7	Hipótesis ambiental de la enfermedad de Parkinson (Langston 1983)	28
2.8	Neurotoxicidad durante el desarrollo embrionario por sustancias químicas ambientales	33

2.8.1	Transporte placentario de sustancia neurotóxicas	34
2.8.2	Sensibilidad del Sistema Nervioso Central en Desarrollo a las Neurotóxicas	34
2.8.3	Neurotóxicas en animales de experimentación.	36
2.8.4	Comparación de estudios de neurotoxinas de los modelos animales a los humanos.	38
2.8.5	Sustancias con efectos neurotóxicas en humanos	39
2.9	Neurotóxicas ambientales en el desarrollo de modelos animales de la enfermedad de Parkinson	41
2.9.1	Mecanismo de acción de las 6-OHDA, MPTP y pesticidas	42
3	Características de la ROT y su uso en el modelo animal de la enfermedad de Parkinson	44
3.1	Características químicas de la ROT	45
3.2	Propiedades bioquímicas de la ROT	46
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	48
4	HIPOTESIS	49
5	OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS PARTICULARES	50
6	MATERIAL Y METODOS	51
6.1	Condiciones generales	51
6.1.1	Preparación y administración de la solución rotenona	51
6.1.2	Cuidado y manejo de animales	51
6.1.3	Preparación de tejido cerebral para inmunotinción	51
6.1.4	Procedimiento de inmunotinción para tirosina hidroxilasa	52
6.1.5	Análisis y cuantificación de las neuronas dopaminérgicas de la <i>sustancia nigra</i> TH-IR	53
6.1.6	Preparación del tejido para la extracción y cuantificación de α -sinucleína.	53
6.1.7	Histofluorescencia con FluoroJade C	53

6.1.8	Procedimiento para la prueba motora de la viga de equilibrio	54
6.2	Diseños experimentales	55
6.2.1	Curva dosis-respuesta con rotenona en hembras	55
6.2.2	Curva dosis-respuesta con rotenona en crías	56
6.2.3	Administración de ROT durante la gestación, lactancia y gestación/lactancia.	57
6.2.4	Exposición de las crías a ROT durante el neurodesarrollo y en edad adulta.	58
6.3	Análisis estadístico	60
7	RESULTADOS	61
7.1	Efecto de la ROT en hembras gestantes	
	Numero de neuronas TH-IR en la <i>sustancia nigra</i> y concentración de α -sinucleína en el estriado y la <i>sustancia nigra</i> de hembras tratadas con ROT	61
7.2	Efecto de la ROT en las crías	
	Sobrevivencia y peso corporal de las crías de ratas tratadas con ROT	64
	Número de neurona TH-IR en la <i>sustancia nigra</i> , evaluación la capacidad motora y concentración de α -sinucleína	66
7.3	Efecto de la exposición a ROT <i>in útero</i> o durante la lactancia en las crías	
	Número de neuronas TH-IR de la <i>sustancia nigra</i> , pruebas de capacidad motora y concentración de α -sinucleína	71
7.4	Efecto de la exposición repetida de ROT	
	Deficiencias motoras, número de neuronas TH-IR y detección de neurodegeneración con FluoroJade C en la <i>sustancia nigra</i>	75
8	DISCUSION	80
8.1	Efecto de la ROT en hembras gestantes	80
8.2	Efecto de la ROT en crías	81
8.3	Efecto de la exposición a ROT <i>in útero</i> y durante la lactancia	84
8.4	Efecto de la exposición a ROT en dos diferentes etapas	85

9	CONCLUSIONES	89
10	REFERENCIAS	90
11	PUBLICACIONES	101

1 INTRODUCCION

La rotenona (ROT) es el compuesto más potente de una familia de citotóxicos naturales que se extraen de las raíces de algunas leguminosas como el barbasco (*Derris elliptica*) y principalmente de la resina del cubé (*Lonchocarpus utilis*). La ROT tiene una vida media corta en el medio ambiente (2-3 días) y fácilmente se descompone con la luz solar (5-6 días). Por su origen natural la ROT ha sido ampliamente utilizada como insecticida para el control de plagas de áfidos y pulgones, en la agricultura y a nivel doméstico, así como piscicida para eliminar peces de lagos (Caboni y cols. 2004 revisado en Bove y cols. 2005).

En los Estados Unidos de América, las áreas agrícolas y lagos, particularmente de California que han sido tratados con ROT, están bajo estricto control debido al aumento en la incidencia de personas con síntomas de enfermedad de Parkinson en la población vecina, que se ha atribuido a la exposición ocupacional a la ROT y otros pesticidas. Estos síntomas parecen depender de la edad de los sujetos, el tiempo de exposición y la dosis (Ritz y col. 2000). De hecho, varias evidencias epidemiológicas muestran que existe una relación positiva, estadísticamente significativa, entre la exposición a pesticidas y la EP (Vanacore y col. 2002; Wirdefeldt y cols. 2011). Esta asociación es más fuerte si existe una combinación de herbicidas e insecticidas después de una exposición prolongada (Brown y col. 2006). El origen ambiental de la enfermedad de Parkinson se sustenta cada vez más con estudios epidemiológicos en poblaciones grandes de varios países (Vanacore y col. 2002; Wirdefeldt K. y cols. 2011). Los datos toxicológicos sugieren que la ROT y el paraquat pueden tener efectos neurotóxicos que potencialmente predispongan al desarrollo de la enfermedad de Parkinson (Barlow y col. 2004; Uversky y col. 2004; Cory-Slechta y col. 2005; Landrigan y col. 2005). De acuerdo con Brown y cols. para otros pesticidas los datos son aún más limitados (Brown y col. 2006); la evidencia epidemiológica y toxicológica acumulada hasta ahora tiene suficiente peso para concluir que existe una relación genérica entre la exposición a pesticidas y la enfermedad de Parkinson, pero esta evidencia no se considera de suficiente peso para establecer que ésta sea una relación causa-efecto o que exista tal relación para un pesticida en particular o una combinación de pesticidas y otros tóxicos en el ambiente.

Cabe mencionar que el panorama en México sobre el riesgo que representa la exposición a pesticidas es más complejo, principalmente debido al escaso control de estos tóxicos. A pesar de que la ROT se utiliza ampliamente en sureste y en las zonas camaroneras del norte del país, no se tienen registros sobre el control del uso de este y otros insecticidas incluso más tóxicos. La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) de México, sólo hace la recomendación de “usarse en mínimas cantidades para no disminuir la producción de miel” (<http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/apicola/>) sin especificar cuáles son los riesgos que tiene su uso para la salud humana o animal.

En 1999, Langston y cols. propusieron la hipótesis de que la exposición de los humanos a sustancias neurotóxicas en edades tempranas reduce el número de neuronas en áreas críticas del cerebro, como la *sustancia nigra*, a un nivel mínimo requerido para mantener la funcionalidad neuronal con el avance de la edad. Esta hipótesis, aunada a las evidencias acumuladas gracias al modelo experimental desarrollado en ratas por Betarbet y cols. en 2000; ha permitido entender algunos mecanismos que inducen el desarrollo de la enfermedad de Parkinson idiopática, sin embargo se requiere generar información sobre los efectos tóxicos de la ROT en la vía nigroestriatal durante el desarrollo para tratar de contestar preguntas fundamentales como si los efectos de la ROT durante la gestación sobre las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales son progresivos o permanentes; asimismo, si estos daños iniciados durante la gestación pudieran conducir al desarrollo de la sintomatología de la enfermedad de Parkinson en edades más tempranas y/o a una mayor susceptibilidad a exposiciones repetidas de esta neurotóxina en la edad adulta.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la exposición a ROT en etapas temprana del neurodesarrollo (la gestación y la lactancia) en las ratas produce daños en la *sustancia nigra* en donde causan disminución en el número de neuronas positivas a tirosina hidroxilasa, así como el aumento en el contenido de la proteína α -sinucleína, lo que se correlaciona con deficiencias en la capacidad motora que progresa con la edad; los valores de estos parámetros evaluados se exacerban significativamente: 1) cuando la exposición a ROT se prolonga hasta la lactancia tras la administración de ésta a las hembras y 2) cuando ocurre una segunda exposición a ROT en la edad adulta en las mismas crías que en edades tempranas del desarrollo recibieron ROT, y en las que se observan deficiencias motoras progresivas con el avance de la edad.

2 ANTECEDENTES

2.1 Los ganglios basales

Los ganglios basales consisten de varios núcleos subcorticales interconectados con proyecciones a la corteza, tálamo y ciertos núcleos del tallo cerebral. Los cuatro principales núcleos de los ganglios basales son: 1) estriado, 2) globo pálido, 3) sustancia nigra (reticular y compacta) y 4) el núcleo subtalamico. Un grupo similar de núcleos se encuentra en el cerebro de la rata y son: la *sustancia nigra*, el área ventral tegmental y el núcleo arqueado, cada uno de los tres sistemas sirven para funciones diferentes y generan diferentes efectos conductuales cuando se dañan.

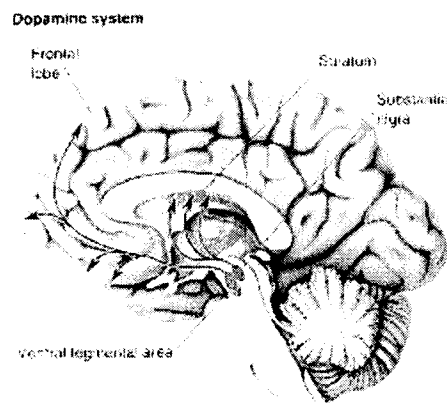


Figura 1 | Ganglios basales

El cuerpo estriado se forma de dos subdivisiones que son el caudado y el putamen, las cuales tienen un origen embrionario común y es la estructura receptora principal de las vías de entrada de los ganglios basales que provienen de la corteza, tálamo y tallo cerebral, sus neuronas proyectan al globo pálido y sustancia nigra.

El globo pálido se divide en segmento externo e interno, la porción interna se relaciona funcionalmente con la *sustancia nigra pars reticulada* cuyas células son gabaérgicas

La *sustancia nigra* se localiza en la parte ventral del mesencéfalo y proyecta eferencias principalmente al estriado, formando el sistema dopaminérgico nigroestriatal, las neuronas de la *sustancia nigra pars compacta* son dopaminérgicas, que es el principal

neurotransmisor liberado por dicho sistema; su color oscuro se deriva de la oxidación y de la dopamina. Si las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra* degeneran los niveles de dopamina en el estriado disminuyen, comprometido el control motor uno de los síntomas mas evidentes de la enfermedad de Parkinson.

2.1.1 La vía nigroestriatal

La vía nigroestriatal es la conexión entre la *sustancia nigra* y el estriado. En el cerebro existen tres vías dopaminérgicas, la vía nigroestriada es una de ellas. Se considera dopaminérgica porque para establecer conexiones con otras neuronas utiliza este neurotransmisor que facilita el movimiento. Los cuerpos neuronales dopaminérgicos de la *sustancia nigra* localizados en el mesencéfalo envían sus axones al estriado localizado en la parte baja del prosencéfalo.

2.1.2 Estriado

El estriado también conocido como el neoestriado o núcleo estriado, se localiza en la parte anterior del cerebro por debajo de la corteza. Es el primer sitio de entrada de estímulos a los ganglios basales. En los primates (incluyendo humanos), el cuerpo estriado está dividido por la cápsula interna en dos sectores llamados el núcleo caudado y putamen, el término cuerpo estriado se refiere a veces a la fusión del estriado con el globo pálido, estructura estrechamente relacionada con el putamen. El estriado recibe terminales de regiones de la corteza cerebral y estructuras límbicas como la amígdala y el hipocampo, tiene aferencias sensoriomotoras del tallo cerebral que llegan vía relevo del tálamo y aferencias modulatorias dopaminérgicas de la *sustancia nigra* y serotoninérgicas del núcleo del raphe (Voorn y cols., 1988).

Más del 90% de las neuronas estriatales son neuronas medianas espinosas gabaérgicas que proyectan fuera del estriado, y reciben sinapsis excitatorias de neuronas corticales. Otras neuronas del estriado que representan aproximadamente el 5-10% son interneuronas glutamatérgicas y colinérgicas. Las terminales dopaminérgicas y glutamatérgicas que inervan el estriado modulan la actividad de las neuronas medianas

espinosas, que pueden distinguirse de manera neuroquímica y en algunos casos por sus características farmacológicas (Tepper y Bolam, 2004.)

2.1.3 *Sustancia nigra*

Los tres principales núcleos dopaminérgicos en el cerebro de la rata es el área ventral tegmental, el núcleo arqueado y la *sustancia nigra*. Un grupo similar de núcleos existe en el cerebro de los primates. La *sustancia nigra* es una región del mesencéfalo con neuronas dopaminérgicas que proyectan al estriado (Lindvall y Bjorklund 1978). Esta región provee señales modulatorias importantes hacia otros núcleos de los ganglios basales y a estructuras externas como la corteza, la amígdala y la habenula. Un alto número de terminales dopaminérgicas de la *sustancia nigra* proyectan al estriado donde hacen contactos sinápticos con dendritas de mediano calibre e interneuronas (Sulzer y cols., 2005).

La *sustancia nigra* tiene interneuronas gabaérgicas que hacen contacto con neuronas dopaminérgicas cercanas (Omelchenko y Sesack 2006). Sus principales eferentes dopaminérgicas provienen del mesencéfalo y otros núcleos de los ganglios basales y del tallo cerebral (Kitai y cols., 1999, Comoli y cols., 2003), las conexiones aferentes provienen de la corteza frontal (Frankle y cols., 2006) y de la amígdala (Chesselet, 1990; Fudge y Haber 2000).

2.1.4 Histogénesis de las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra*

Estudios de la ontogenia de las células de la región mesencefálica ventral realizados en décadas pasadas (Hanaway y cols., 1971; Lauder y Bloom, 1974; Altman y Bayer, 1981; Sinclair y cols., 1999) usando marcadores de la división celular (ej.3H-timidina), tinciones histológicas (ej. Nissl) y/o marcadores del fenotipo (ej. tirosina hidroxilasa), sugieren que el pico de la neurogénesis de las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra* compacta en la rata ocurre en el día embrionario 14; trabajos más recientes indican que se generan en estadios mas tempranos del desarrollo. En ellos se muestra por inmunotinción para tirosina hidroxilasa en cortes de la región mesencefálica ventral de embriones, que no solo hay

neuronas dopaminérgicas inmunopositivas a los 12 días embrionarios sino que también existe un número importante de procesos neuronales bien desarrollados que se extiende cerca de 1 mm hacia el tallo cerebral ventral (Voorn y cols., 1988; Fricker-Gates y cols., 2004).

En 2006 Gates y cols. inyectaron embriones de rata de 11, 12, 13 y 14 días con bromodeoxiuridina (BrdU), un marcador de la fase S del ciclo celular, y encontraron el mayor porcentaje de neuronas dopaminérgicas doblemente marcadas con BrdU y TH en la región mesencefálica ventral en los embriones de 12 días (E12), este marcaje disminuye en los de embriones de 13 días (E13). Esta estirpe neuronal es incapaces de generar otro tipo neuronal en embriones de 14 días (E14), esto indica que a partir de E13 el fenotipo celular que originan a las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra* se encuentra comprometido y completamente diferenciado por lo que se ha propuesto que entre E11 a E12 es la etapa del desarrollo durante la cual las neuronas de esta región cerebral son más sensibles a cualquier daño provocado sobre ellas que puede ser devastador posteriormente en edades juveniles o aun en los adultos (Gates y cols., 2006).

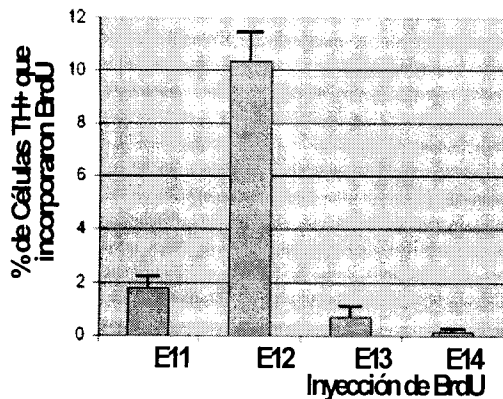


Figura 2 | Esta gráfica tomada de Gates y cols. muestra el porcentaje de neuronas de la *sustancia nigra*, positivas a TH y BrdU+ en embriones (E) de 11, 12, 13 y 14 días, después de un solo pulso de BrdU. Se muestra que el mayor porcentaje de células positivas a TH se encuentra E12, porque a esta edad las células se encuentran en la fase S del ciclo celular. Esto muestra que la génesis de las neuronas dopaminérgicas en esta edad es mayor en un 80% comparado con las otras edades.

2.2 Dopamina

La dopamina es un neurotransmisor del sistema nervioso central que se produce en invertebrados y vertebrados, en los que activa a cinco tipos de receptores de D₁ a D₅, y sus

variantes. Se produce en varias partes del sistema nervioso, especialmente en la *sustancia nigra*, el área ventral tegmental y el núcleo arqueado del hipotálamo.

La dopamina fue sintetizada artificialmente por primera vez en 1910 por George Barrer y James Ewens en los Laboratorios Wellcome en Londres, Inglaterra

La función de la dopamina como neurotransmisor fue puesta de manifiesto por Arvid Carlsson y Nils-Åke Hillarp del Laboratorio de Farmacología Química del Instituto Nacional Cardiología en Suecia, en 1952. Fue llamada *dopamina* porque es una monoamina, y su precursor sintético es la 3,4-dihidroxifenilalanina (levodopa o L-DOPA). A Carlsson le fue otorgado el Premio Nobel en Fisiología y Medicina en 2000 por probar que la dopamina (figura 3) no es solo un precursor de la adrenalina y de la noradrenalina sino también un neurotransmisor.

La dopamina es una monoamina biogénica, la producen las neuronas de *sustancia nigra* que proyectan al estriado. Las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra* reciben precisamente este nombre, porque es el principal neurotransmisor que sintetizan, además de ser sintetizada en una vía biosintética (figura 3) común a la norepinefrina y epinefrina, que se inicia por la hidroxilación de la L-tirosina a L-DOPA mediante la enzima tirosina hidroxilasa (TH), y después por la descarboxilación de la L-DOPA por la L-aminoácido aromático descarboxilasa (DOPA descarboxilasa). En condiciones normales no es posible aumentar la síntesis de dopamina incrementando los niveles de su precursor principal la L-tirosina, ya que la TH es la enzima limitante para la producción de dopamina, pero es posible su regulación fisiológica a través de la manipulación farmacológica.

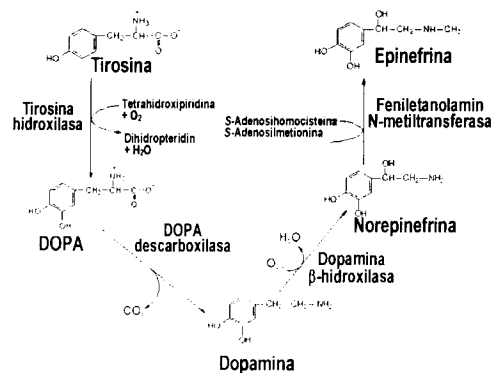


Figura 3 | Síntesis de dopamina.

Las terminales dopaminérgicas de la *sustancia nigra* localizadas en el estriado pueden liberar a la dopamina al espacio intersináptico o almacenarla en vesículas sinápticas. La liberación de dopamina por las terminales nerviosas depende de calcio (Ca^{+2}), lo cual ocurre después de que la terminal es invadida por un potencial de acción, esta liberación es función de la capacidad de disparo de la neurona y se modula por los autoreceptores de la presinapsis.

Las terminales dopaminérgicas poseen sitios de recaptura para dopamina, esta recaptura se lleva a cabo a través de un acarreador de membrana o transportador de dopamina que es capaz transportar a la dopamina dependiendo del gradiente de concentración existente. Este transportador, es responsable de la recaptura y reciclado de la dopamina en el espacio intersináptico, la activación de una bomba de protones hace posible el regreso de la dopamina a la terminal. El DNA que codifica para el transportador de dopamina de la rata se ha secuenciado y muestra semejanza con los transportadores de norepinefrina y el del ácido γ -aminobutírico (GABA). Es una proteína de 619 aminoácidos con 12 dominios transmembranales con un N-terminal y un C-terminal, ambos localizados al interior de la célula con varios sitios de glicosilación y uno para fosforilación. Numerosos estudios sugieren que el transportador de dopamina es mejor marcador de terminales nerviosas de neuronas dopaminérgicas que la tirosina hidroxilasa, sin embargo hay que ser cautelosos ya que no está claro cómo varía la expresión de dicho transportador dentro de grupos de neuronas dopaminérgicas durante el desarrollo embrionario y postnatal, ya que estas neuronas se marcan claramente con anticuerpos contra TH que con anticuerpos contra el transportador de dopamina.

Además de las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra* y del área ventral tegmental, el núcleo arqueado, en el adulto o durante el desarrollo, contiene numerosas neuronas que expresan enzimas que participan en la síntesis de dopamina, además de la TH, como la descarboxilasa, por lo que se ha propuesto que es a través de ellas que se da el mecanismo de compensación para la síntesis de dopamina en los pacientes con Parkinson (Ugrumov y cols., 2004; Ershov y cols., 2005).

2.2.1 Secuestro de la dopamina en vesículas sinápticas.

El secuestro de la dopamina por las vesículas sinápticas (figura 4), se lleva a cabo gracias al transportador vesicular de monoaminas, que es el responsable de llevar a la dopamina y otras monoaminas como la serotonina, norepinefrina e histamina, del citoplasma a las vesículas sinápticas siguiendo un gradiente electroquímico. Existen dos formas de transportador el 1 y el 2, ambos se expresan ampliamente durante el desarrollo embrionario, el transportador vesicular de monoaminas tipo 2 se encuentra en las neuronas dopaminérgicas del sistema nervioso central de humanos y roedores, mientras que el tipo 1 se encuentra principalmente en células neuroendocrinas como las cromafines de la médula adrenal y células enterocromafines del tracto intestinal.

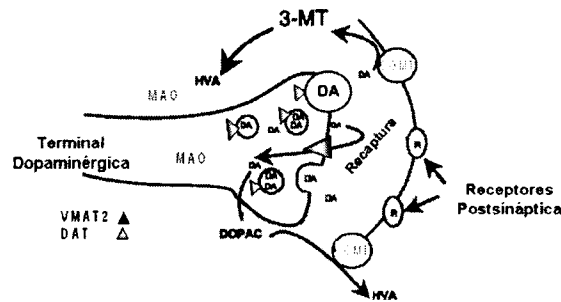


Figura 4 | Transporte de dopamina en la terminal presináptica por el transportador de dopamina y el transportador vesicular de monoaminas tipo 2.

2.2.2 Metabolismo de la dopamina

La desaminación de la dopamina por la monoaminoxidasa (MAO), se acompaña de la reducción de moléculas de oxígeno a un producto tóxico, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El mantenimiento de bajas concentraciones citoplásmicas del neurotransmisor por su captura dentro de vesículas sinápticas disminuye su inevitable oxidación, lo que la excluye del metabolismo y de su toxicidad, además de reducir la demanda de su síntesis. En el sistema nervioso central, el transportador vesicular de monoaminas tipo 2 es el único transportador que mueve a la dopamina del citoplasma a las vesículas para su almacenamiento y posterior liberación por exocitosis.

A pesar de la existencia de este mecanismo, el metabolismo normal de la dopamina produce H_2O_2 y la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), ambas contribuyen a la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson, por lo tanto, el aumento del secuestro de dopamina por el transportador vesicular de monoaminas tipo 2 previene la oxidación de dopamina en el citoplasma y genera neuroprotección (Zheng y cols., 2006).

La dopamina recapturada es convertida por la enzima monoamino-oxidasa, en particular por la forma A (MAO-A), presente en el interior de la terminal nerviosa, en ácido 3,4,dihidroxiacetilacético (DOPAC) el cual es liberado al exterior de la terminal para ser convertido en ácido homovanílico (HVA) por la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT). La dopamina no capturada por la terminal dopaminérgica es metabolizada en HVA por la acción secuencial de las enzimas COMT y MAO-A. En el cerebro de la rata el principal metabolito es el DOPAC, mientras que en el humano y otros primates es el ácido homovanílico (figura 5).

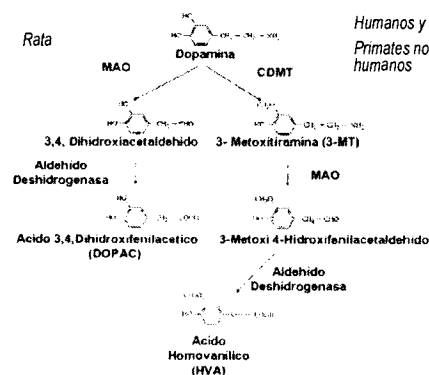


Figura 5 | Metabolismo de damina

2.2.3 Dopamina y estrés oxidativo

La hipótesis del estrés oxidativo, es una inferencia que se hace a partir del desbalance causado por el exceso en la producción de agentes oxidantes como el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y los radicales libres aniónico hidroxilo (OH^-) y superóxido (O^{2-}) cuyo origen está en el metabolismo de la dopamina, y el inadecuado funcionamiento de los sistemas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa, cuya principal función es proteger al organismo del efecto degradante del las especies reactivas de oxígeno(ROS) (figura 6).

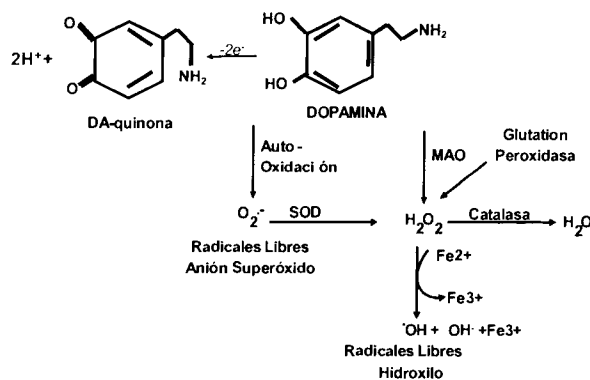


Figura 6 | Formación de radicales superóxido e hidroxilo por el metabolismo de la dopamina y la participación de sistemas antioxidantes (superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa)

El metabolismo de la dopamina, en condiciones de homeostasis es en sí mismo oxidativo. La MAO oxida la vía catabólica primaria de la dopamina a DOPAC generando peróxido de hidrogeno. En presencia de ion ferroso, que es relativamente abundante en la *substancia nigra*, se generan radicales libres hidroxilo ($OH\cdot$). Sin embargo, en un equilibrio redox, los radicales libres son contrarrestados por sistemas antioxidantes cerebrales como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa; cuando estos mecanismos protectores antioxidantes son insuficientes y no alcanzan a contrarrestar el incremento de los radicales libres, se produce el estado de estrés oxidativo, el cual induce daño y muerte de las neuronas dopaminérgicas.

2.3 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa que se produce por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la *substancia nigra*, lo que provoca la disminución de la liberación de dopamina en el estriado. Clínicamente la deficiencia de dopamina en el estriado se manifiesta por la disminución de los movimientos voluntarios (acinesia o hipocinesia), temblor descontrolado durante el reposo que se han asociado a la aparición de oscilaciones en los circuitos neuronales del tálamo; rigidez que es un tipo de hipertonía muscular caracterizada porque al mover pasivamente una

articulación existe una resistencia que es continua durante todo el movimiento y disminuye al final de este, y se diferencia de la hipertonia de las lesiones de la vía piramidal, porque en esta la resistencia de las articulaciones al movimiento es continua. La pérdida de dopamina estriatal que ocurre en la enfermedad de Parkinson provoca diversas respuestas que permiten compensar la deficiencia de dopamina que involucran cambios en la organización neuronal del estriado en las neuronas espinosas medianas que son el blanco principal de los axones dopaminérgicos provenientes de la *sustancia nigra*. Entre estos cambios están la disminución de longitud de las dendritas y en la densidad de sus espinas con lo que las neuronas espinosas medianas atenúan el efecto del exceso de glutamato corticoestriatal que es secundario a la pérdida de dopamina (Deutch A.Y., 2006)

Los signos patológicos y síntomas observados en la enfermedad de Parkinson se enlistan en la tabla 1 de la siguiente página.

2.3.1 Epidemiología de la enfermedad de Parkinson en México

La Academia Mexicana de Neurología analizó el impacto de la enfermedad de Parkinson en la sociedad mexicana, ya que esta representa la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente en el país. Con base en las cifras del Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI), se calcula que podrían existir alrededor de 140 000 individuos con esta afección en México, y de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, existen cerca de 40 millones de personas afectadas por la enfermedad de Parkinson en el mundo; asimismo se estima que existe un 30% de personas sin diagnosticar y adicionalmente se reporta que esta enfermedad es más frecuente en hombres que en mujeres.

Se considera como factor de riesgo a toda circunstancia que aumenta las probabilidades de una persona de contraer una enfermedad, la edad avanzada es un claro factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Parkinson, cuyo promedio de inicio puede ser a los 60 años. Sin embargo, entre el 4-7% de las personas diagnosticadas con enfermedad de Parkinson tiene un “inicio temprano” que es antes de los 50 años de edad, que se ha asociado con mutaciones genéticas específicas; las personas con familiares con enfermedad de Parkinson asociada a un mutación genética conocida, tienen un riesgo para desarrollar la enfermedad del 2-5%, y

se estima que solo entre el 15-25% de las personas que desarrollan la enfermedad saben que tienen antecedentes familiares de la misma.

Tabla 1 | Signos patológicos y síntomas clínicos observados en los pacientes con enfermedad de Parkinson.

-
- 1 Degeneración progresiva de neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra*
 - 2 Formación de inclusiones fibrilares citoplásmicas–Cuerpos de Lewy
 - a. con ubiquitina
 - b. con agregados de α -sinucleína
 - 3 Reducción en el contenido de dopamina en el caudado con aumento en el recambio de la dopamina (ácido homovanílico/dopamina)
 - a. reducción en el contenido de serotonina.
 - 4 Neuroinflamación
 - a. activación de microglía
 - b. astrocitosis
 - c. incremento en las citocinas como TNF- α y IL-1 β
 - 5 Estrés oxidativo
 - a. formación y acumulación de numerosas especies reactivas de oxígeno
 - b. presencia de proteínas oxidadas
 - c. presencia de lípidos oxidados
 - d. presencia de DNA oxidado
 - 6 Cambios degenerativos en otras áreas del cerebro
 - a. locus coeruleus
 - b. núcleo dorsal motor del vago
 - c. reducción en el contenido de dopamina en varias áreas corticales
 - 7 Déficit conductual
 - a. déficit motor
 - b. desórdenes cognitivos
 - c. distonía
 - d. bradicinesia
 - 8 Numerosos problemas periférico
 - a. constipación
 - b. fluctuaciones en la presión sanguínea
-

Tomado de Carvey y cols. 2006.

Los síntomas parkinsonianos que aparecen alrededor de los 20 años son muy escasos, y se asocia con mutaciones en el gen de la parkina y al consumo de drogas, es frecuente en Japón, y se conocen como “parkinsonismo juvenil”. Generalmente este tipo de parkinsonismo comienza con distonía (son trastornos del movimiento en el que las

contracciones musculares sostenidas causan torceduras y movimientos repetitivos o posturas anormales) y bradicinecia (dificultad para iniciar y completar movimientos nuevos). Estos movimientos, que son involuntarios y a veces dolorosos, pueden afectar a un solo músculo, a un grupo de músculos como los de los brazos, las piernas o el cuello, o incluso al cuerpo entero (Giasson y Lee; 2001), los síntomas a menudo mejoran con la medicación con L-3-4 dehidroxifenilalanina (levodopa o L-DOPA), que es el precursor metabólico de la dopamina, sus efectos resultan de la descarboxilación y se administrará de esta forma por su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica.

Recientemente se le ha dado gran importancia a las interacciones gen-medio ambiente en la etiología y la patogénesis de la enfermedad de Parkinson, sin embargo es poco probable que pueda ser causada *únicamente* por la exposición ambiental o por la mutación de genes, más bien parece ser que la combinación de ambos es lo que conduce al desarrollo de dicha enfermedad. Por ello se considera que la mayoría de los casos son causados por interacción entre la susceptibilidad individual determinada genéticamente exposición a *múltiples factores ambientales*, que convergen en un momento, espacio y vía bioquímica común en la que participan: *i*) la disfunción mitocondrial, *ii*) el estrés oxidativo, *iii*) el inadecuado secuestro de la dopamina y *iv*) la ineficiente degradación de proteínas mal codificadas o mal plegadas (ej. α -sinucleína) por el proteosoma.

Las evidencias acumuladas hasta ahora indican que entre los factores ambientales de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Parkinson está la exposición a pesticidas (Brown y cols. 2006; Vanacore y cols. 2002; Barlow y cols. 2004), a metales como el plomo (Grandjean y cols. 1991,1997), a fungicidas, a herbicidas (Barlow y cols. 2004) y a insecticidas tales como la *rotenona* (ROT) (Betarbet y cols. 2000; Brown y cols. 2006).

Estudios neuropatológicos y en modelos animales muestran que la exposición ambiental a sustancias neurotóxicas provoca daño progresivo en las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra* varios años antes de que aparezcan las manifestaciones clínicas del parkinsonismo. En consecuencia, la enfermedad de Parkinson como otras enfermedades neurológicas relacionadas con el envejecimiento, probablemente están determinadas por la exposición a compuestos químicos presentes en el medio ambiente durante las etapas tempranas de la vida, o aún mas, en etapas tan tempranas como

el desarrollo embrionario. Sin embargo, los estudios epidemiológicos se han enfocado básicamente sobre la posible participación de factores ambientales de riesgo presentes durante la vida adulta o el envejecimiento, aun cuando existen evidencias de que estos factores de riesgo pueden afectar el desarrollo del sistema nervioso central durante la gestación y por su larga latencia (Eskenazi y cols. 2008) o efecto lento pueden ser importantes para el desarrollo tardío de la enfermedad de Parkinson.

Varios genes se han asociado con la enfermedad de Parkinson (ver tabla 2 de la siguiente página) en algunos de los cuales se han identificado los locus; todos los casos bajo esta condición representan aproximadamente el 5% del total de los pacientes que presentan esta enfermedad, sin embargo en ellos el proceso que va de la mutación genética a la neurodegeneración no ha sido esclarecido a la fecha.

2.3.2 Enfermedad de Parkinson y, la síntesis y metabolismo de la dopamina

La forma idiopática de la enfermedad de Parkinson, representa la mayoría de los casos y se ha asociado con la constitución genética del individuo y la influencia ambiental multifactorial, como ya se mencionó. En los pacientes que carecen de una clara carga genética los mecanismos patogénicos de la enfermedad son aún más difíciles de entender, en comparación con los que tienen una carga familiar, debido a la variedad de factores que pueden estar participando en el proceso neurodegenerativo, entre los que encontramos toxinas ambientales, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, así como la interacción entre ellos (Betarbet y cols. 2002).

Tanto en el parkinsonismo familiar como la forma idiopática, la degeneración neuroanatómica provee un importante indicio para aclarar los mecanismos fisiopatológicos que llevan a la pérdida de las neuronas de la *substancia nigra*, sin embargo la ruta final común es la muerte de estas neuronas.

En condiciones fisiológicas de pH normal (pH = 7.4), las neuronas dopaminérgicas se exponen a estrés oxidativo por el catabolismo propio de la dopamina, se ha reportado que la dopamina puede formar por una vía secundaria metabolitos reactivos considerados

Tabla 2 | Genes ligados a la enfermedad de Parkinson.

LOCUS	LOCALIZACIÓN	GEN	FUNCIÓN	TIPO DE HERENCIA	REFERENCIAS
PARK1,4	4q21	α -sinucleína	Componente de CL	AD	Polymeropoulos, 1997 Ibanez y cols., 2004 Chartier-Harlin, 2004
PARK2	6q25,2-q27	Parkin	Ubiquitina E3 Ligasa	AR	Kitada y cols., 1998
PARK3	2p13	Desconocido	Desconocida	AD	Gasser y cols., 1998
PARK5	4p14	UCHL1	Hidrolasa C-terminal de ubiquitina	AD	Leroy y cols., 1998
PARK6	1p35-36	PINK	Cinasa mitocondrial	AR	Valente y cols., 2004
PARK7	1p36	DJ-1	Antioxidante	AR	Bonifati y cols., 2003
PARK8	12q12	LRRK2	Cinasa y GTPasa	AD	Zimprich y cols., 2004
PARK9	1p36	ATP13A2	Probable transportador catiónico ATPasa	AR	Paisán-Ruiz y cols., 2004
PARK10	1p32	Desconocido	Desconocida	AD	Li y cols., 2007
PARK11	2q36-37	GIGYF2	Regulación de la señalización de receptores tirosina quinasa	AD	Lautier y cols., 2008
PARK12	Xq21-25	Desconocido	Desconocida	Cromosoma X	Pankratz y cols., 2002
PARK13	2p13	OMI/HTRA2	Serín Proteasa	AD	Strauss y cols., 2005; Ross y cols., 2008
PARK14	22q13.1	PLA2G6	Fosfolipasa A2	Desconocida	Paisán-Ruiz y cols., 2009
PARK15	22q12-13	FBXO7	Ubiquitina E3 Ligasa	AR	Shojaee y cols., 2008; Di Fonzo y cols., 2009
PARK16	1q32	Desconocido	Desconocida	Desconocida	Satake y cols., 2009

AD: autosómica dominante AR: autosómica recesiva, NC No conocida. PARK4 fue eliminado porque se debe a una triplicación del gen PARK1 y PARK 9 ya que no es un locus de la enfermedad de Parkinson.

neurotóxicas endógenas. La naturaleza inestable del anillo fenólico de la dopamina al ser oxidado genera constantemente moléculas de dopamina-quinona (DA-quinona). En general las quinonas son productos de la oxidación de alcoholes (-OH), una característica de las quinonas es que en condiciones de redox tienen deficiencias de electrones, por lo tanto sufren reacciones de transferencia electrónica reversible. En estado de estrés oxidativo durante la enfermedad de Parkinson se produce una alta auto-oxidación de la dopamina y

la generación radicales libres ($O_2^{\cdot-}$ y OH^{\cdot}) y peróxido de hidrogeno, como se ilustra en conjunto en la figura 7, adicionalmente la reducción de la actividad de los sistemas antioxidantes (SOD, catalasa y glutatión peroxidasa) no permite el equilibrio oxido-reducción en las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra*.

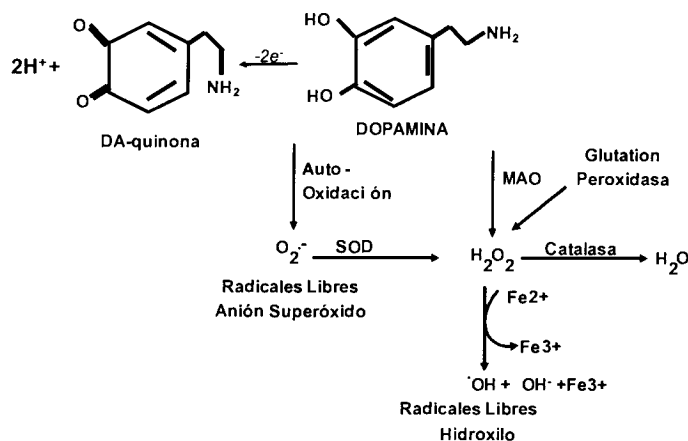


Figura 7 | Generación de estrés oxidativo por la dopamina, y su participación en el proceso neurodegenerativo. En las neuronas dopaminérgicas el metabolismo de la dopamina puede ocurrir espontáneamente por auto-oxidación o puede ser catalizada por la monoaminoxidasa (MAO), ambas reacciones generan peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 por sí solo no daña a la neurona, aunque induce citotoxicidad al formar radicales libres hidroxilo. A su vez, la dopamina-quinona y los radicales superóxido también son citotóxicos

Las especies reactivas de oxígeno generadas por el metabolismo de la dopamina originan alteraciones en las funciones de las proteínas, del DNA, y de algunos lípidos de la neurona. Una consecuencia inmediata del daño en los lípidos es la pérdida de la integridad membranal, lo que modifica la permeabilidad iónica, lo cual puede perturbar las propiedades eléctricas de la membrana, facilitando la toxicidad (Halliwell, 1992).

Por todo lo anteriormente expuesto es necesario que la dopamina sea inocua para la neurona, y esto se logra almacenándola rápidamente dentro de las vesículas sinápticas, donde gracias al pH bajo y la ausencia de la MAO se tienen las condiciones adecuadas para mantener estable a la dopamina. El secuestro de la dopamina en las vesículas es el principal mecanismo por el cual las neuronas de la *sustancia nigra* se protegen de los efectos dañinos de su oxidación (figura 8).

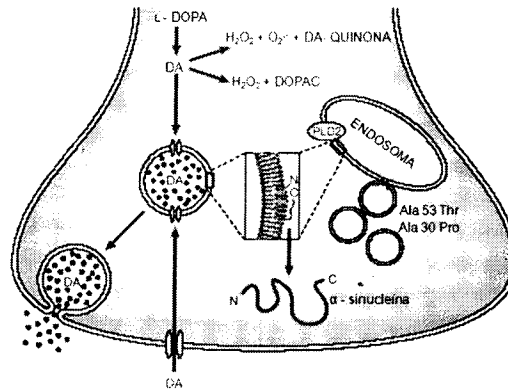


Figura 8 | α -sinucleína y el almacenaje intravesicular de dopamina en las terminales presináptica. Esquema de la terminal presináptica de una neurona dopaminérgica, en la que es posible observar la función de la α -sinucleína en el almacenaje de la dopamina (DA). Una vez sintetizada, la dopamina es secuestrada a las vesículas. En los casos en los que es deficiente el secuestro, la dopamina se oxida y forma en el citoplasma peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y dopamina-quinona, que son productos altamente citotóxicos. El 50% de la α -sinucleína se encuentra asociada a la membrana presináptica, y el resto se une a la membrana fosfolipídica de las vesículas donde modifica su estructura secundaria en α -hélice.

2.4 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es una condición dañina para las neuronas dopaminérgicas, y resulta de la eliminación deficiente de las especies reactivas de oxígeno que se generan por las reacciones relacionadas con el metabolismo de la dopamina (figuras 6 y 7).

Normalmente las especies reactivas son eliminadas por sistemas antioxidantes intracelulares, sin embargo, como resultado del proceso normal de envejecimiento o por alguna alteración patológica, estos mecanismos se encuentran dañados. En los organismos senescentes la actividad del glutatión se encuentra reducida (Sohal y cols. 1996), lo que aumenta los carbonilos de las proteínas en todos los tejidos, incluyendo al cerebro; adicionalmente, el daño oxidativo del DNA mitocondrial aumenta más de 15 veces en comparación con el DNA nuclear, lo que se atribuye a fallas en la capacidad del glutatión para eliminar los radicales libres, condición que aumenta proporcionalmente con la edad.

En la enfermedad de Parkinson las células de la *sustancia nigra* están en un elevado estado de estrés oxidativo, lo que se deduce por el aumento en los productos de la

oxidación de lípidos, proteínas y DNA (ver referencia tabla 3); sin embargo, es posible que este aumento sea compensado por el incremento en la actividad de los sistemas antioxidantes.

La tabla 3 compara el porcentaje de Fe^{+2} , la actividad de la superóxido dismutasa, peroxidación de lípidos y, oxidación de proteínas y DNA en la *sustancia nigra* y la corteza, encontrada en estudios postmortem en pacientes con enfermedad de Parkinson y sujetos sanos.

En estudios postmortem de pacientes parkinsonianos, es posible detectar en la *sustancia nigra* las alteraciones oxidativas utilizando diferentes marcadores como el malondialdehído, el cual se encuentra aumentado hasta diez veces de su valor normal. La concentración de 4-hidroxinonenal (que indica la oxidación de lípidos), se encuentra incrementada en un 58% de las neuronas sobrevivientes en comparación con el 9% encontrado en individuos sanos. La 8-hidroxi-guanosin (producto de la oxidación de RNA y DNA) se encuentra marcadamente aumentada en las neuronas, y los niveles de carbonilos de proteínas (utilizados para detectar oxidación de proteínas) se encuentran incrementados en la *sustancia nigra* en comparación con la corteza y cerebelo (tabla 3 de la siguiente página).

Adicionalmente, el glutatión (co-sustrato para la detoxificación del peróxido de hidrógeno por las enzimas glutatión peroxidasa y catalasa) se encuentra marcadamente disminuido en la enfermedad de Parkinson (Schul y cols. 2000), mientras que la actividad de la superóxido dismutasa se incrementa (Marttila y cols. 1988). Finalmente, la concentración de Fe^{2+} que en condiciones normales es alto en las neuronas de la *sustancia nigra* en comparación con otras regiones de cerebro, se encuentra aún más elevada. A la fecha se desconoce el motivo por el cual el Fe^{2+} se encuentra elevado en la *sustancia nigra* de pacientes con Parkinson, sin embargo se ha atribuido al aumento en el número de transportadores DMT1 (Salazar y cols. 2008; Hirsch E.C., 2009).

Tabla 3

Evidencia de daño por estrés oxidativo en la enfermedad de Parkinson

<i>Índice evaluado</i>	<i>Región cerebral</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Referencia</i>
Concentración total de hierro	Sustancia nigra	129%	Jenner, 1998
	Corteza	100%	
Superóxido dismutasa	Sustancia nigra	133%	Sofic, 1988
	Cerebelo	95%	
Peroxidación de lípidos	Sustancia nigra	135%	Saggu y cols. 1989
	Corteza	94%	
Oxidación de proteínas	Sustancia nigra	220%	Dexter y cols. 1989
	Corteza prefrontal	100%	
Oxidación de DNA	Sustancia nigra	238%	Floor y Wetzel, 1998
	Cerebelo	110%	

Las anomalías genéticas y la exposición a toxinas ambientales favorecen el estrés oxidativo, lo que puede dañar específicamente a las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra*. En condiciones experimentales en ratas, se ha probado que el eliminar antioxidantes como la vitamina E de la dieta se induce la pérdida del 33% de las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra*, mientras que otras regiones cerebrales permanecen sin alteraciones (Dexter y cols. 1994). Adicionalmente, el alto potencial de oxidación del propio metabolismo de la noradrenalina y la serotonina aumentan el estrés oxidativo en los pacientes afectados por la enfermedad de Parkinson, lo que explica el daño asociado en el locus coeruleus y los núcleos del rafe, regiones en donde se sintetizan estos neurotransmisores, respectivamente (Dexter y cols. 1994).

Una evidencia que muestra la participación del estrés oxidativo es pérdida de neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra*, proviene del estudio en el que se administró a ratas 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), neurotóxina que provoca síntomas similares a los de la enfermedad de Parkinson (Przedborskin y cols.

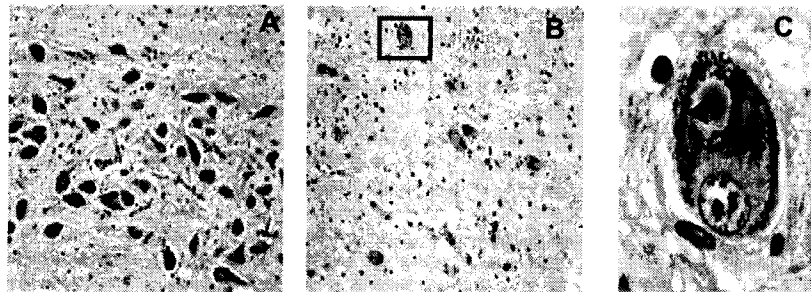
1998). El metabolito del MPTP, el 1-metil-4-fenilpiridio (MPP^+), penetra a la terminal dopaminérgica a través del transportador de dopamina de la membrana plasmática, bloquea el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, y posteriormente se une con alta afinidad al transportador vesicular 2 de monoaminas (Del Zompo y cols. 1991), de modo que dentro de estas células reduce el ATP de las pozas intracelulares (Krueger y cols. 1990), redistribuye a la dopamina en el citoplasma, y promueve el estrés oxidativo dependiente de dopamina. Algunos compuestos antioxidantes como las vitaminas E y C, así como los carotenos y el retinol, pueden rescatar a las neuronas dopaminérgicas de los efectos tóxicos del MPP^+ y disminuir la muerte celular, sugiriendo que el mecanismo principal por el que el MPP^+ induce tal muerte es por estrés oxidativo. Las anfetaminas que son transportadas por el transportador de dopamina (Jones y cols. 1998) también favorecen la acumulación de dopamina en las terminales, porque inhiben la fuerza protónica necesaria para capturar la dopamina en las vesículas. Al igual que el MPP^+ , las anfetaminas y sus derivados producen degeneración de las neuronas dopaminérgicas *in vivo* (Sonsalla y cols. 1996), aunque su toxicidad podría atenuarse al inducir la liberación de dopamina de las vesículas sinápticas, o por el tratamiento con antioxidantes (Schmidth y cols. 1985).

Los pesticidas como la rotenona (Betarbet y cols. 2000; Gómez-Chavarín y cols. 2012) o el paraquat (Fukushima y cols. 1993; McCormack y cols. 2002) producen degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra* en roedores; algunos estudios han encontrado una asociación positiva entre la exposición a pesticidas y la enfermedad de Parkinson. La rotenona, el MPP^+ y el paraquat se caracterizan por inhibir el complejo I de la cadena de transporte de electrones (Betarbet y cols. 2000; Gómez-Chavarín y cols. 2012; Fukushima y cols. 1993). El paraquat y el MPP^+ son transportados por el transportador vesicular 2 de monoaminas, por lo que ambas neurotoxinas alteran el almacenamiento de la dopamina en las vesículas sinápticas, y consecuentemente aumentan la concentración de dopamina en el citoplasma (Fukushima y cols. 1993), mientras que la alta liposolubilidad de la rotenona le permite cruzar libremente la membrana celular y provocar sus efectos neurotóxicos.

2.5 Cuerpos de Lewy y α -sinucleína

Los cuerpos de Lewy son estructuras típicamente circulares eosinofílicas (figura 9) que se encuentran en el citoplasma de las neuronas de pacientes con enfermedad de Parkinson y en enfermos con demencia con cuerpos de Lewy. También se encuentran en el 10% de los cerebros de personas mayores de 60 años de edad clínicamente normales; en estos individuos se conocen como cuerpos de Lewy incidentales y se consideran un marcador presintomático de la enfermedad de Parkinson (DelleDonne y cols. 2008).

Cuerpos de Lewy en la sustancia nigra



Paciente normal Paciente con enfermedad de Parkinson

Figura 9 | Microfotografías de *sustancia nigra* con Cuerpos de Lewy. En A se muestra la *sustancia nigra* de un paciente sin cuerpos de Lewy, B) de un paciente con enfermedad de Parkinson y C) ampliación de una neuronas de *sustancia nigra* que muestra una masa eosinofílica (punta de flecha) con un alto contenido de α -sinucleína y otras proteínas.

En los cuerpos de Lewy se han encontrado aproximadamente 70 diferentes tipos de moléculas, pero su principal componente son filamentos, aunque también podemos encontrar proteínas de choque térmico (Auluck y cols. 2002), neurofilamentos (Galvin y cols. 1997) y subunidades del proteosoma como las enzimas parkina y la ubiquitina ligasa E₃ (li y cols.l, 1997).

2.5.1 Expresión de la α -sinucleína en el neurodesarrollo

La α -sinucleína es una proteína ácida de 140 aminoácidos, su expresión se ha asociado con enfermedades neurodegenerativas; así como durante el proceso de diferenciación y desarrollo del sistema nervioso central. Originalmente fue aislada de las placas amiloides (depósitos de material extracelular amiloideo que es de naturaleza

proteica, insoluble y resistente a la proteólisis) de cerebros de pacientes con Alzheimer. Esta proteína pertenece a una familia de proteínas codificadas por varios genes y estructuralmente relacionados, que se expresan en diferentes regiones del cerebro y cuya expresión es diferencial durante el desarrollo neuronal y madurez cerebral.

La α -sinucleína es una proteína de localización presináptica y de función desconocida que juega un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson, sin embargo se ha observado que la reducción en su expresión reduce la densidad de vesículas en las sinapsis cerebrales, acompañado de una reducción del área de la terminal sináptica, pero sólo en regiones donde la proteína se expresa en grandes cantidades, lo que sugiere su participación en la regulación del tráfico vesicular y mantenimiento de la membrana en el botón sináptico, pero sin que tenga una regulación directa sobre el contenido del neurotransmisor. En ratones mutantes la ausencia de α -sinucleína protege parcialmente a las neuronas dopaminérgicas de la activación de la apoptosis mediada por la proteína cinasa C, esto sugiere que la α -sinucleína, además de desempeñar funciones relacionadas con el mantenimiento sináptico, puede interactuar y regular la función de proteínas implicadas en procesos apoptóticos mediados por la proteína cinasa C (Milán M., 2007)

La α -sinucleína se localiza por inmunotinción en el sistema nervioso central en: neocorteza, hipocampo, giro dentado, bulbo olfativo, tálamo, cerebelo, amígdala y núcleo acumbens particularmente en el citoplasma y en membranas de las vesículas sinápticas cercanas a las terminales presináptica (Li y cols. 2002; Monti y cols. 2010). Galvín y cols, (2001) localizaron a la α -sinucleína en el soma de las neuronas de la *sustancia nigra* durante el desarrollo embrionario en el humano, entre las semanas 15-18 de gestación y posteriormente en los procesos neuronales entre la semana 18 de gestación y los 9 meses de edad, lo que sugiere la participación de esta proteína durante la diferenciación y conectividad en el neurodesarrollo y madurez del sistema nervioso central; en donde se ha propuesto regula el tráfico vesicular y el mantenimiento de las membranas en el botón sináptico.

Por inmunotinción se ha demostrado que la proteína α -sinucleína tiene una expresión morfológica diferencial durante el desarrollo del sistema nervioso central en los

roedores, teniendo un alto nivel de expresión en los cuerpos neuronales de la *sustancia nigra* durante la primer semana posterior al nacimiento; el número de neuronas con inmunoreactividad positiva a esta proteína decae progresivamente entre los 14 y 21 días postnatales, hasta que alrededor de día postnatal 28 alcanza el nivel de expresión encontrado en la edad adulta (Jakowec y cols. 2001; Li JY y cols. 2002).

La α -sinucleína es abundante en las terminales presinápticas de las neuronas dopaminérgicas, el 50% de ella se encuentra asociada a la membrana presináptica y el resto es citosólica. Por su interacción con la fosfolipasa D² se ha propuesto que una de sus funciones más importantes en la presinápsis es regular la formación de vesículas sinápticas a partir de endosomas, aunque se han sugerido otras funciones, como su participación en la excitotoxicidad y la formación del citoesqueleto.

2.5.2 Formación de los cuerpos de Lewy

Los cuerpos de Lewy son inclusiones que se encuentran entre las células de la *sustancia nigra* considerados marcadores patológicos de la enfermedad de Parkinson, pero fueron desestimados al encontrarse en otras áreas cerebrales por el envejecimiento normal, además de en cerebros de pacientes con enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y la demencia con cuerpos de Lewy (Goedert, 2001; Spillantini y cols. 1997). Un componente importante de los cuerpos de Lewy son los filamentos de α -sinucleína, que es una de proteína de la que hasta ahora no se tienen bien definidas sus funciones.

El principal componente de los cuerpos de Lewy son filamentos de α -sinucleína que tienen 200-600 nm de largo y 5-10 nm de diámetro (Goedert M, 2001; Wakabayashi y cols. 2007), aunque también contienen otras proteínas como la ubiquitina (Kuzuhara y cols., 1988), subunidades del proteosoma (Ii y cols. 1997), proteínas de choque térmico (Auluck y cols. 2002) y neurofilamentos (Galvin y cols. 1997).

En condiciones fisiológicas la α -sinucleína se encuentra en su forma nativa como láminas β llamadas protofibrillas, en la figura 10A se muestra de manera esquemática la forma en la que se organizan los monómeros, al sedimentarse las láminas β de la α -sinucleína (oligómeros de la α -sinucleína) forman fibras amiloideas que es su forma

patogénica como se muestra en la figura 10B y C, sin embargo a la fecha no ha sido posible detectar estas protofibrillas en las fases tempranas del proceso neurodegenerativo en los enfermos con Parkinson.

Las mutaciones Ala53Thr y Ala30Pro en el gen *PARK1* aumentan la tendencia de la α -sinucleína para formar protofibrillas (Conway y cols. 2000) las cuales generan toxicidad celular (Bucciantini y cols. 2002), indicando que los cuerpos de Lewy son estructuras dañinas para las neuronas (Golberg y cols. 2002; Lee y cols.2002; Gosavi y cols. 2002; Tompkins y cols. 1997; Hurtig y cols. 2000).

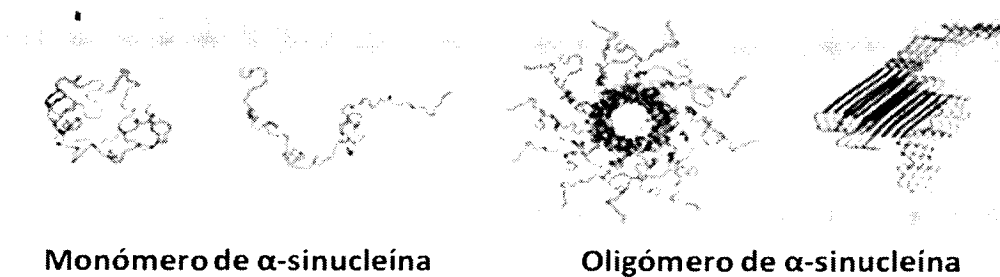


Figura 10 | Esquema de A) la forma nativa en monómeros no plegados y B) la forma oligomérica plegada de la α -sinucleína la cual forma placas β

Sin embargo, se ha propuesto que las neuronas que presentan cuerpos de Lewy son aquellas que tratan de evadir el mecanismo tóxico involucrado en las enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson. La habilidad de los cuerpos de Lewy para secuestrar proteínas que han adoptado formas fibrilares potencialmente citotóxicas podría ser inicialmente benéfica para las neuronas dopaminérgicas, pero es difícil imaginar que estas inclusiones no contribuyan a la pérdida de funciones celulares una vez que hayan aumentado su volumen dentro del soma. El aumento en la concentración de α -sinucleína también incrementa la probabilidad de la formación de fibrillas hasta generar un colapso de estas proteínas, alterando sus funciones y generando toxicidad (Shtilerman y cols. 2002).

La formación de moléculas de dopamina-quinona por la auto-oxidación de la dopamina provoca el cambio de la estructura protofibrilar de la α -sinucleína, que junto con el aumento de la concentración de dopamina en el citoplasma exacerban el daño celular (Conway y cols. 2001). Adicionalmente, los filamentos de α -sinucleína alteran la

integridad de la membrana de las vesículas sinápticas en donde forman poros. La formación de estos poros se favorece por las mutaciones Ala53Thr y Ala30Pro en el gen *PARK1* (Volles y cols., 2001, 2002; Lashuel y cols., 2002) y el estrés oxidativo estimula tanto el plegamiento como la agregación de la α -sinucleína en el citoplasma; ambos eventos aumentan la salida de la dopamina de las vesículas (Lashuel y cols. 2002). De esta manera la α -sinucleína mutada produce directamente la acumulación de dopamina en el citoplasma.

2.5.3 Cuerpos de Lewy y el sistema proteosómico de ubiquitina

Tres genes han sido asociados con la enfermedad de Parkinson e implicados en la formación de los cuerpos de Lewy: *PARK1* que codifica para la síntesis de α -sinucleína (Polymeropoulos y cols. 1997; Krüger y cols. 1998), *PARK2* para la ubiquitina ligasa E3 o parkina (Kitada y cols. 1998) y *PARK5* para la hidrolasa C-terminal de ubiquitina L1 (UCHL1) (Giasson y Lee. 2001), las dos últimas proteínas participan en el sistema proteosómico de la ubiquitina encargado de regular la concentración de las proteínas en las células (figura 11).

El proteosoma es una estructura esencial para la degradación y eliminación de proteínas mutadas, mal plegadas o dañadas (ej. α -sinucleína). Esto se logra a través de una serie de reacciones enzimáticas que primeramente deben identificar y unir covalentemente proteínas anormales con moléculas de ubiquitina como señal de degradación. La activación de la ubiquitina por la enzima E1 dependiente de ATP se transfiere a la enzima conjugadora de ubiquitina E2 que la une a un residuo de lisina de la proteína en una reacción catalizada por diferentes ligasas de ubiquitina (E3) que junto con enzimas específicas asegura selectivamente que la proteína dañada sea degradada. Los conjugados ubiquitina-proteína son subsecuentemente reconocidos y degradados por el proteosoma 26S que son proteasas localizadas en citoplasma, regiones polinucleares y el núcleo. Los productos de la degradación del proteosoma 26S son pequeños péptidos y aminoácidos que se reciclan para formar nuevas proteínas. Simultáneamente la cadena de ubiquitinas se libera de las proteínas marcadas, y son desensambladas por la hidrolasa C-terminal de ubiquitina L1 (UCHL1)

para producir monómeros de ubiquitina que inician nuevamente su unión a la enzima activadora, y de esta manera contribuir a la eliminación de proteínas anormales.

En la enfermedad de Parkinson hereditaria es posible que existan deficiencias en la ubiquitina ligasa (E3) y en la ubiquitina C-terminal hidrolasa (UCHL1), componentes del sistema proteosómico de ubiquitina; estas alteraciones son importantes en el desarrollo de los procesos neurodegenerativos, e indican que el deterioro en la eliminación adecuada de las proteínas dañadas es determinante en el progreso de la enfermedad.

La figura 11 muestra de manera esquemática, como mutaciones en varias enzimas en el sistema proteosómico de ubiquitina altera la degradación de proteínas mutadas o mal plegadas.

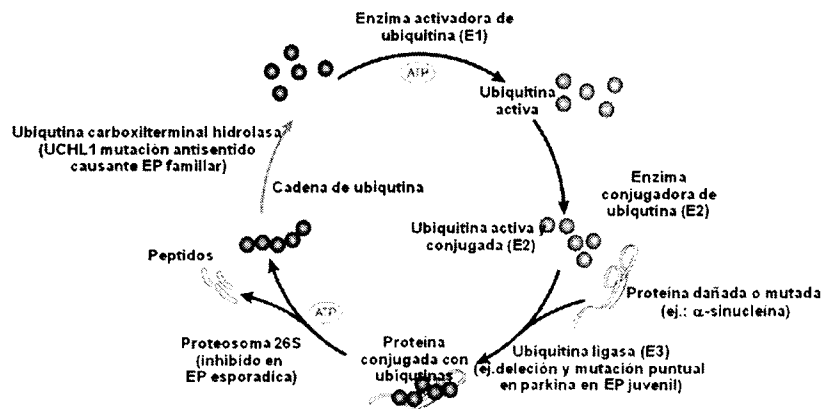


Figura 11 | Degradación de α -sinucleína por la vía proteosómica de ubiquitina.

2.6 Deterioro neuronal por daño en el proteosoma

Una explicación breve de la secuencia de eventos es que la reducción en el funcionamiento del proteosoma afecta la degradación de proteínas, por lo tanto la inadecuada eliminación de protofibrillas disfuncionales de α -sinucleína aumenta su concentración y rompe la homeostasis de la dopamina, induciendo neurotoxicidad por el incremento del estrés oxidativo en las células de la *sustancia nigra*.

En todas las formas de la enfermedad de Parkinson la muerte de las neuronas dopaminérgicas es el mecanismo clave en el que coinciden el estrés oxidativo inducido por

la dopamina, así como la desorganización del proceso de plegado y eliminación de la proteína α -sinucleína.

2.7 Hipótesis ambiental de la enfermedad de Parkinson (Langston 1983).

Existen numerosos estudios dirigidos exclusivamente hacia la inducción o prevención de la pérdida de neuronas dopaminérgicas después o durante la exposición aguda a neurotóxicas como el 1MPTP, la 6-OHDA, el lipopolisacárido que es una endotoxina bacteriana, los pesticidas y herbicidas. El descubrimiento de los efectos del MPTP por Langston en 1983 lo llevó a proponer lo que eventualmente comenzó a conocerse como la *hipótesis ambiental de la enfermedad de Parkinson* (Langston y cols., 1983, 1999; Cory-Slechta y cols. 2005a, 2005b; Barlow B.K., 2007) Esta hipótesis se ha reforzado por los numerosos reportes subsecuentes en donde se ha demostrado que los agentes ambientales son causantes de la pérdida de neuronas dopaminérgicas en animales; la tabla 4 compara las características de la enfermedad de Parkinson con las características observadas en modelos animales en los que se utilizan toxinas como 6-OHDA, MPTP, pesticidas y lipopolisacárido (Ling y cols., 2002, 2004a, 2004b; Barlow y cols. 2004, 2006; Lloyd y cols., 2006).

Originalmente Donald Calne y Bill Langston en 1983 desarrollaron la hipótesis que propone la disminución de las neuronas dopaminérgicas con el avance de la edad, es decir que el envejecimiento por sí mismo es un factor de riesgo importante para el desarrollo de la enfermedad de Parkinson; sin embargo la exposición a toxinas ambientales aumenta el riesgo de la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *sustancia nigra*, que eventualmente puede llevar a los individuos al umbral de los síntomas de la enfermedad de Parkinson idiopática en edades más tempranas (figura 12).

Actualmente se sabe que el patrón de pérdida de las neuronas dopaminérgicas producidas por el envejecimiento es heterogéneo en el mesencéfalo e inconsistente con la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *sustancia nigra* lateral y en la región ventral; zonas en las que se ha observado la pérdida de neuronas en los cerebros de pacientes con parkinsonismo.

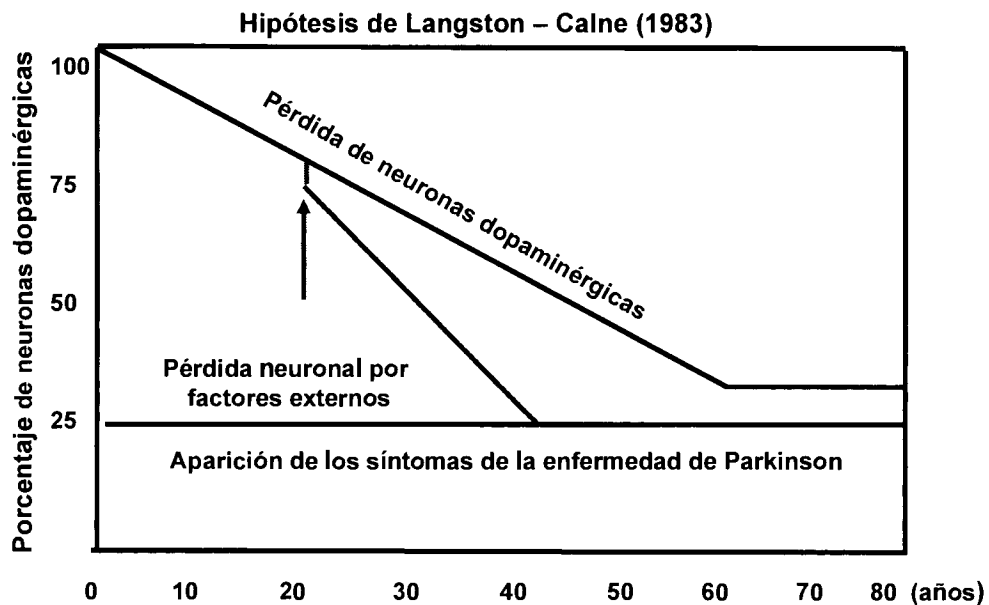


Figura 12 | Ilustración de la hipótesis de Calne-Langston. La grafica muestra la hipótesis de Langston y Calne sobre la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson idiopática (**línea continua negra**), en ella se incluye el impacto de un factor ambiental (**flecha roja**) que puede ocurrir en cualquier momento a lo largo de la vida, que induce la pérdida de estas neuronas (**línea azul**) y favorecen la expresión temprana de los síntomas de la enfermedad de Parkinson. (Tomado de Cory-Slechta D. 2005).

El modelo sugiere que *la tasa de pérdida de neuronas dopaminérgicas en los pacientes con enfermedad de Parkinson es lineal*, sin embargo se sabe que los sujetos inician la sintomatología alrededor de 7 años antes de que se presente el síndrome parkinsonico y a partir de este momento *la pérdida de neuronas dopaminérgicas es exponencial*.

Tabla 4 | Comparación de las características de la enfermedad de Parkinson en humanos con modelos animales.

Características	Modelos animales				
	6-OHDA	MPTP	Pesticidas	LPS Prenatal	Modelos Genéticos
Progresión	no	no	no	no	si
Cuerpos de Lewy con inclusiones	no	no	?	si	si
Cambios en la dopamina estriatal	si	si	si	si	limitada
Neuroinflamación	si	si	si	si	si
Radicales libres	si	si	si	si	si
Cambios conductuales	limitados	si	si	limitados	limitados
Pérdida en otras áreas del cerebro	LC	nd	nd	LC, serotonina	nd
Características periféricas	nd	nd	nd	nd	nd

LPS= lipopolisacrido endotoxico bacteriano; LC= locus ceruleus; nd no determinado

Aun cuando para tratar de explicar el proceso de pérdida neuronal se han desarrollado modelos animales utilizando diferentes neurotóxicas (tabla 4) que inducen varias de las características de la enfermedad de Parkinson, a la fecha no existen evidencias de cómo se da la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas.

La hipótesis propuesta de Langston y cols. (1983), aunque en su momento fue un gran aporte, nos lleva a cuestionarnos sobre la posibilidad de que el envejecimiento normal por sí mismo sea un factor determinante para que la pérdida de neuronas dopaminérgicas origine la enfermedad de Parkinson, o si un evento o varios eventos como la exposición a algún factor ambiental de riesgo junto con el envejecimiento origine la pérdida de estas neuronas. Adicionalmente esta hipótesis no incluye la influencia de los factores genéticos ni considera la posibilidad de que la exposición indirecta a factores ambientales a través de la madre durante periodos tempranos del desarrollo del sistema nervioso central como la gestación y la lactancia o la exposición directa durante infancia o adolescencia permanezcan de manera “silente” y generen un daño latente y/o progresivo lento que

culmine con la pérdida neuronal, originando que los síntomas de la enfermedad de Parkinson aparezcan en edades más tempranas.

En la figura 13 se muestra algunas modificaciones propuestas por Barlow (2007) a la hipótesis original de Langston y Calne sobre la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson idiopática, en ella se incluye el impacto de varios factores ambientales; y su interacción secuencial o simultánea a lo largo de la vida mismos que inducen la pérdida de estas neuronas y favorecen la expresión temprana de los síntomas. A lo largo de la vida los individuos pierden de manera gradual neuronas dopaminérgicas; al inicio esta pérdida puede ser lenta y progresiva (**línea negra continua**) y posteriormente 7 años antes de que se presente el síndrome parkinsonico la pérdida se acelera y (**curva negra discontinua**) hasta alcanzar el umbral de los síntomas de la enfermedad de Parkinson cerca o después de los 60 años de edad. Sin embargo, después de la exposición a uno o varios factores ambientales, ya sea de manera indirecta o directa, en diferentes etapas de la vida como la gestación, lactancia, infancia, adolescencia o adultez joven (**flechas rojas**); se produce una abrupta pérdida de neuronas dopaminérgicas (**línea azul**), que en la mayoría de las veces ocurre sin notarse y progresa hasta que alcanza el umbral de los síntomas de enfermedad de Parkinson (**curva azul discontinua**) que se manifiestan antes de los 60 años.

La mayoría de los trabajos de investigación sobre la enfermedad de Parkinson, se han enfocado en el periodo de la pérdida rápida de neuronas dopaminérgicas (figura 13; **curva azul discontinua**), y los modelos animales utilizan solo un factor de riesgo (figura 13; **flechas rojas**) para intentar reproducir este escenario.

La interacción secuencial o simultánea de más de un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Parkinson se concentran en figura 13, e incluyen: exposición a toxinas, envejecimiento y otros factores desconocidos potencialmente dañinos. Sabemos desde hace dos décadas, que el sistema dopaminérgico nigroestriado posee un mecanismo compensatorio que mantiene las funciones motoras “normales” aun después de

Hipótesis de Múltiples Impactos Ambientales para el desarrollo de la enfermedad de Parkinson

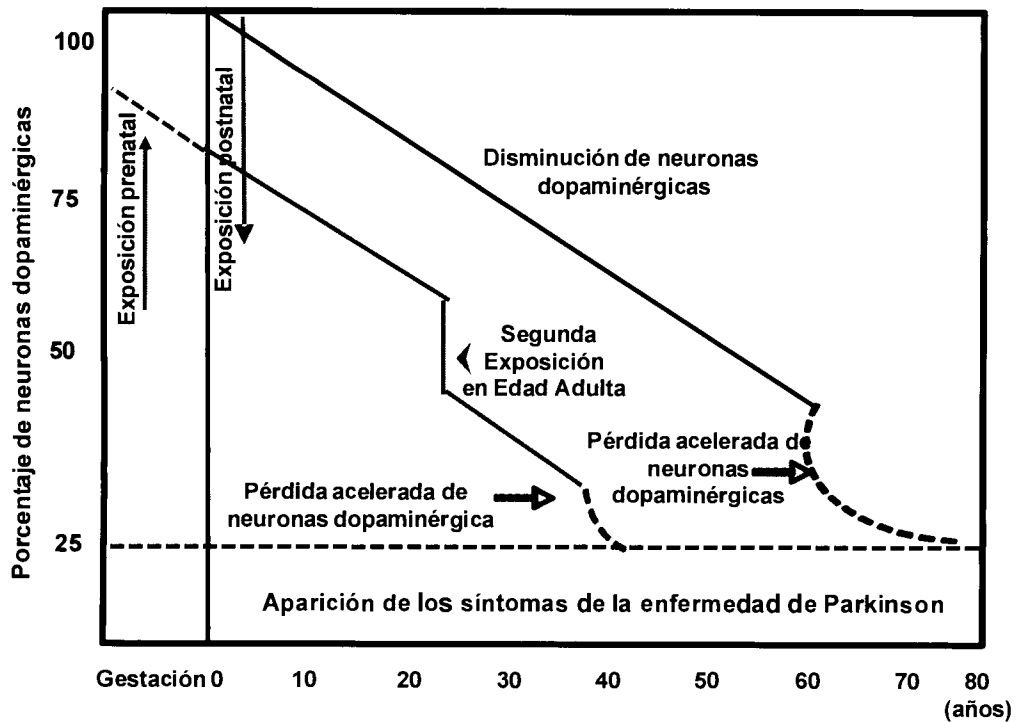


Figura 13 | Ilustración de la hipótesis de múltiples impactos ambientales para el desarrollo de la enfermedad de Parkinson. La pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson idiopática (**línea continua negra**), en ella se incluye la pérdida acelerada de estas neuronas (**curva discontinua negra, flechas verdes**) antes de que se presente los síntomas de la enfermedad de Parkinson. Múltiples impactos de factores ambientales (**flechas rojas**) que pueden ocurrir en cualquier momento de la vida, induce la pérdida acelerada de estas neuronas (**líneas continuas azules, flechas verdes**) y favorece la expresión temprana de los síntomas de la enfermedad de Parkinson. (Modificado de Barlow BK., 2007)

haber perdido un número importante de neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra*, en respuesta a la regulación anómala glutamatérgica en el estriado por las neuronas espinosas medianas (Smith y cols. 2009; Villalba y Smith 2010). Este mecanismo compensatorio no supera los daños de la exposición repetida a toxinas o los defectos genéticos en los animales. Conceptualmente, si las neuronas dopaminérgicas fueran dañadas por más de una toxina que actúa a través de diferentes mecanismos, el mecanismo compensatorio posiblemente se reduzca, y producir la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas. Deborah Cory-Slechta (2005) sugiere que cuando hay múltiples factores de riesgo, a largo

plazo el sistema no puede “homeostáticamente re-regularse por sí mismo” lo que provoca el daño.

2.8 Neurotoxicidad durante el desarrollo embrionario por sustancias químicas ambientales.

Existen múltiples factores ambientales que pueden provocar efectos tóxicos en el organismo. Diversos estudios muestran que la exposición a xenobioticos como metales pesados (Fearnley y Lees, 1991), pesticidas entre los que se incluye la ROT (Barlow y cols., 2004; Betarbet, 2000), fungicidas y herbicidas como el maneb y paraquat (Feng, and Maguire-Zeiss, 2011; Ferrante y cols., 1997), entre otros, pueden generar daños en el sistema nervioso central (Heikkila y cols., 1985). Grandjean y Landrigan (2006) encontraron que la exposición de fetos humanos a sustancias químicas industriales provocaba daños en el cerebro durante el proceso de neurodesarrollo, los que podían predisponer a diversas enfermedades neurológicas o psiquiátricas a largo plazo

Como resultado de la exposición de las madres durante la gestación y la lactancia a sustancias tóxicas durante el desarrollo embrionario, la neurotoxicidad provoca alteraciones en la conducta, neurocitológicas, neuroquímicas, neurofisiológicas y/o cambios morfológicos gruesos en el *sustancia nigra* de las crías.

Para que las sustancias químicas lleguen al feto deben cruzar la barrera placentaria, el uso de este término, lleva a la concepción errónea de que la placenta actúa como una barrera protectora del feto contra sustancias potencialmente tóxicas, sin embargo, la placenta debe ser vista como una interface dinámica y cambiante que permite el transporte de compuestos esenciales y nutrimentos, sin embargo algunos xenobioticos también pueden cruzar esta barrera. Se ha documentado que sustancias neuroactivas o drogas (ejemplo; alcohol, cocaína y heroína) tienen efectos neurotóxicos en los fetos humanos (Stanton y Spear, 1990), no obstante el riesgo por la exposición ambiental a sustancias químicas durante la gestación es mayor, pero ha sido menos investigado.

2.8.1 Transporte placentario de sustancia neurotóxicas.

El paso de sustancia neurotóxicas por la barrera hemato-placentaria puede llevarse a cabo de diferentes formas: por transporte activo, transporte facilitado y difusión pasiva. La selectividad de este paso depende principalmente del transporte activo con el que la placenta transfiere sustancias hacia el feto en contra del gradiente de concentración, y cuya principal función es asegurar la concentración adecuada de sustancias para el crecimiento fetal (Salama y cols., 1993).

Algunos compuestos dañinos pueden ser transportados por mecanismos existentes en la placenta. Por ejemplo; algunos metales iónicos tóxicos pueden transportarse a través canales iónicos y de esta manera atravesar fácilmente las membranas. La permeabilidad de ciertas sustancias químicas esta determinada por las características físicas de la placenta como: grosor, área, sistemas de acarreo, contenido de lípidos y proteínas, etc. y por sus características químicas del compuesto como el grado de ionización, solubilidad a lípidos, unión a proteínas y peso molecular. La permeabilidad, el flujo sanguíneo y metabolismo de la placenta, también afecta la transferencia de sustancias químicas, dado que la placenta no es estática y se modifica al avanzar la gestación (Slikker y cols., 1994).

En los adultos las neurotóxicas que cruzan la barrera hematoencefálica ejercen sus efectos al solubilizarse en los lípidos (Watanabe y cols., 1990). Por lo tanto muchos compuestos identificados como neurotóxicas en el cerebro adulto pueden cruzar potencialmente la placenta fácilmente y llegar la circulación fetal después de la exposición de la madre. Sin embargo para conocer la forma en que un compuesto neurotóxico constituye particularmente un riesgo para el feto se debe conocer la cinética específica de su paso por la placenta.

2.8.2 Sensibilidad del Sistema Nervioso Central en Desarrollo a las Neurotóxicas

La sensibilidad del sistema nervioso central en desarrollo a sustancias neurotóxicas se define por varios factores toxicocinéticos, que incluyen diferencias en el metabolismo enzimático, en la tasa de excreción, en la afinidad específica de unión a proteínas y en la falta de madurez de la barrera hematoencefálica en el feto. En el feto humano el desarrollo

de la barrera hematoencefalica se inicia en la gestación y se termina hasta el primer año de vida (Rodier, 1995). La falta de madurez de la barrera hematoencefálica durante el periodo pre- y postnatal permite el paso de agentes como el cadmio cuya probabilidad de penetrar al cerebro maduro es baja, pero puede cruzar mas fácilmente al cerebro durante el desarrollo (Levin y Miller, 1980). Datos recientes han demostrado que en ratas; *diferentes pesticidas* son capaces de modificar las características de la barrera hematoencefálica cuando se administran durante el periodo del desarrollo de la misma y este efecto persiste aún después de que ha cesado la exposición. (Gupta y cols., 1999). Por lo tanto las modificaciones que originan *los pesticidas en la barrea hematoencefálica hace más vulnerable o sensibiliza al sistema nervioso central a los daños ocasionados por neurotóxicas*; que de otra manera no podrían pasar esta barrera.

El sistema nervioso central en desarrollo es altamente sensible a las neurotóxicas ambientales si éstas interrumpen procesos esenciales durante periodos específicos de diferenciación y madurez al cruzar la barrera hematoencefálica, estas neurotóxicas inducen disfunción neurológica, aunque el sistema nervioso central en desarrollo tiene la capacidad de adaptarse y con ello compensar las perturbaciones o daños ocurridos tempranamente. Es claro que durante el desarrollo el sistema nervioso central es más vulnerable a los daños inducidos por agentes químicos que el sistema nervioso adulto (Tilson y Kodavanti, 1997, 1998). Durante la transición de neuroblasto a neuronas maduras, las células transitoriamente tienen cierto grado de plasticidad fenotípica, y para que funcione esta plasticidad, es necesario que el microambiente en el cual se encuentran inmersas las células se encuentre en óptimas condiciones durante los estadios en los que se definen su función con precisión; por ejemplo los sistemas sensoriales son altamente sensibles a cambios en el microambiente (Kentroti, 1997; Ahlbom y cols., 1995). La tasa máxima de neurogénesis en las diferentes regiones del cerebro se lleva a cabo en diferentes estadios del neurodesarrollo (Rodier 1980); sin embargo la neurogénesis ocurre únicamente durante la embriogénesis cuando transcurren procesos como la migración neuronal, del desarrollo de receptores y de sistemas de transmisión; y la mielinización. Por ello las neuronas dañadas durante la embriogénesis por la exposición a sustancias neurotóxicas pueden perder su

limitada capacidad de regeneración o plasticidad neuronal originando daños neuronales permanentes, sin que por ello se comprometa el crecimiento y la viabilidad del feto.

En muchas especies de mamíferos, ocurre un *crecimiento acelerado del cerebro*; en el ratón y la rata, este periodo abarca de la 3^a a la 4^a semana de vida, durante el cual ocurre la lactancia. Durante este periodo el cerebro se encuentra sometido a varias fases fundamentales del desarrollo como el crecimiento de axones y dendritas, establecimiento de conexiones neuronales, sinaptogénesis, multiplicación de las células gliales que acompaña a la mielinización (Dencker y Eriksson, 1998), por lo que en durante periodos críticos del desarrollo las neurotóxicas pueden afectar importantemente el desarrollo de la *sustancia nigra* durante la gestación. (Eriksson, 1997). En el humano, el crecimiento acelerado del cerebro se inicia durante el primer trimestre de la gestación y continúa hasta el primer año de vida.

Existen muy pocos estudios experimentales *in útero* durante periodos específicos de alta vulnerabilidad de la *sustancia nigra* a sustancias neurotóxicas, por lo que para llevarse a cabo deben considerarse las diferencias que existen en el desarrollo y la madurez del sistema nervioso, para poder valorar los riesgos de la toxina utilizada.

2.8.3 Neurotóxicas en animales de experimentación

Utilizando altas dosis de diversas neurotóxicas en modelos animales, se ha encontrado que causan mortalidad, malformación y/o crecimiento anormal de las crías de las hembras expuestas. Gran variedad de compuestos (tabla 5) afectan el desarrollo del sistema nervioso, y *se ha sugerido que los daños crónicos que ocurren son mayores cuando se utilizan dosis bajas por largos periodos de tiempo*; que aquellos daños ocasionados por exposición dosis agudas altas (Vorhees, 1997).

Se han identificado varias neurotóxicas como: pesticidas, solventes, metales, compuestos organometálicos y sustancias industriales que afectan el neurodesarrollo, además de las drogas de abuso. En los mamíferos estos compuestos son capaces de generar mayor daño en la progenie que en las madres (tabla 5), así como los identificados por Goldey y cols. (1994) como "*neurotoxinas específicas del desarrollo*". Sin embargo en el humano no se han analizado exhaustivamente estas neurotóxicas por lo tanto no existen

evidencias de peso sobre sus efectos. Las pruebas más convincentes son aquellas realizadas en animales de experimentación en los que la exposición a bajas concentraciones de neurotoxinas durante desarrollo induce alteraciones funcionales permanentes en el cerebro.

Debido a que los procesos biológicos implicados en la neurogénesis y la maduración del sistema nervioso son similares en los mamíferos (humanos y animales), se pueden esperar efectos análogos de las neurotoxinas, por que los compuestos pueden llegar al cerebro humano en periodos críticos del desarrollo de manera y concentración similar, y tener también efectos similares.

TABLA 5 | Toxinas que experimentalmente inducen daño neuronal en las crías expuestas pre- o postnatalmente*

Pesticidas y compuestos relacionados	Solventes orgánicos y químicos industriales	Metales y compuestos con metales.
Clordecón	Acetaldehido	Aluminio
CordimeformPes	Acrylamidopamina	Arsénico
Clorpirifos	Monóxido de carbono	Cadmio
2,4-D	Disulfuro de carbono	Plomo
Deltametrín	Dietilhexilftalato	Mercurio
Dilor	Etano	Metilmercurio
Dinoseb	Etilenglicol	Trietileno de plomo
Disulfotán	Metoxietanol	Trimetil de plomo
Endrín	Metano	Trietileno
Etilentiourea	Metil etil cetono	Trimetileno
Óxido de etileno	N-Metilprolindopaminano	
Fenitotrín	n-Hexano	
Fenvalerato	PCB	
Lindopaminano	PBB	
Nicotina	Estireno	
Permetrina	Dióxido de sulfuro	
Triclorfon	Tolueno	
Toxafen	111-Tricloroetano	
Simazina	Tricloroetileno	
	Xyleno	

*Tomada de Andersen, 2000

2.8.4 Comparación de estudios de neurotoxinas de los modelos animales a los humanos.

Se deben considerar varios aspectos respecto al comparar los estudios de neurotoxinas entre las diferentes especies animales y humanos. Como mencionamos la placenta no es estática porque cambia a lo largo de la gestación; en los seres humanos al inicio de la gestación (13-80 días de gestación) se presenta el saco vitelino al que posteriormente se sobrepone el desarrollo de la placenta corioalantoidea (del día 21 al término de la gestación) (Slikker y Miller, 1994). Los estudios experimentales sobre la transferencia placentaria, (el paso de moléculas de la circulación materna a la fetal o viceversa), han sido cuestionados debido a las diferencias estructurales de la membrana, principalmente por el número de capas celulares que la constituyen y que separan la sangre materna de la sangre fetal, lo que implica que el paso de sustancias esenciales es altamente selectivo, sin embargo también es posible el paso de sustancia neurotóxicas (Salama y cols. 1993; Slikker y Miller, 1994).

Diferentes métodos *in vitro* se han desarrollado con tejido placentario de animales o de humanos para investigar el transporte de sustancias químicas por la placenta (Slikker and Miller, 1994). Una de sus limitantes es que solo se pueden realizar estudios con sustancias que atraviesan la placenta por difusión pasiva (Tuntland y cols., 1999), sin embargo ha sido útil para estudiar la transferencia de fármacos a través de la placenta por exposición ocupacional o ambiental.

Los modelos farmacocinéticos facilitan la explicación de la transferencia placentaria en animales y humanos (Kim y cols., 1996), sin perder de vista los factores que limitan su aplicación en las evaluaciones de riesgo, como es la diferente unión de las sustancias químicas a las proteínas del suero que puede modificarse durante la gestación entre la madre y el feto; por ejemplo si una sustancia es metabolizada a una forma polar por el feto, la tasa de retorno a la circulación materna del compuesto original disminuye. Adicionalmente, al evaluar el transporte debe considerarse que la placenta es un sitio de almacenaje y de biotransformación (Slikker and Miller, 1994). Las sustancias pueden ser detoxificadas o metabolizadas a sustancias más tóxicas por enzimas de la placenta (por

ejemplo: las enzimas del citocromo P450). En el feto el desarrollo de los sistemas enzimáticos metabólicos varía entre las especies y en humanos no están completamente desarrollados durante el periodo embrionario-fetal. (Cresteil, 1998), por lo que se sugiere el uso de cobayos en modelos animales, porque en esta especie el desarrollo del cerebro es más parecido al de los humanos.

Considerando que la duración del desarrollo del sistema nervioso central es diferente entre las especies, el uso de modelos experimentales con roedores puede no ser el adecuado, pues algunos sitios de unión para las neurotoxinas se desarrollan postnatalmente mientras en los humanos es prenatal. Se sabe que agentes como el plomo, metilmercurio y PCB en bajas concentraciones son altamente neurotóxicos durante el desarrollo en los humanos y en animales de laboratorio generan déficit motor o cognitivo, aunque las comparaciones cuantitativas solo se pueden establecer al utilizar curvas dosis-respuesta (Stanton y Spear, 1990; Tilson y Kodovant, 1998).

2.8.5 Sustancias con efectos neurotóxicos en humanos.

Se considera que los estudios clínicos y epidemiológicos subvalúan la neurotoxicidad que ocurre durante el desarrollo. Se estima que de 138 sustancias químicas industriales que son neurotóxicas en los humanos, 56 son pesticidas y compuestos relacionados, 24 son solventes y 18 son metales o compuestos organometálicos, y las neurotóxicas restantes se utilizan principalmente en la industria química y causan signos y síntomas clínicos como: adicción, ataxia, coma, delirio, alucinaciones, fasciculaciones musculares (son causadas por contracciones musculares menores incontrolables de un grupo muscular abastecido por una sola fibra nerviosa motora, si son menores a menudo pasan inadvertidas, mientras que otras son signos de un trastorno neurológico), narcosis, síndrome psicótico orgánico, (es un trastorno mental mayor, de origen emocional u orgánico, que produce deterioro de la capacidad de pensar, de responder emocionalmente, de recordar, de comunicar y de interpretar la realidad), parálisis, parestesia, (sensación anormal de los sentidos o de la sensibilidad general que se traduce por una sensación de hormigueo, adormecimiento, ahorcamiento, etc.), parkinsonismo, neuropatía periférica y temblores (Kimbrough y cols., 1989; Grandjean y cols., 1991, 1997).

El número actual de sustancias identificadas como neurotóxicas para el humano es muy bajo, pero la mayoría se originan en la industria o son utilizadas en zonas agrícolas, sin embargo, puede considerarse que el número es mayor que lo que se tiene registrado y va en aumento. Existe muy poca información y además controvertida sobre los riesgos y los daños que provocan en el feto y el paso transplacentario de sustancias consideradas neurotóxicas; sin embargo es fácil suponer que la mayoría de estas son capaces de cruzar la placenta.

Las evidencias más convincentes sobre la neurotoxicidad prenatal en humanos se restringen únicamente al plomo, metilmercurio y bisfenoles clorados que se utilizan en la fabricación de envases plásticos de alimentos y bebidas (Chen y cols. 1992; Tilson y Kodavanti, 1997; Banks y cols. 1996; Grandjean y cols., 1997).

Los estudios realizados hasta ahora en humanos son insuficientes, tienen graves limitaciones y carecen de bases científicas para evaluar la relación existente entre la exposición a neurotoxinas durante el desarrollo pre- y postnatal y los riesgos para desarrollar alguna enfermedad neurológica.

La exposición a neurotoxinas ambientales durante el desarrollo temprano tiene consecuencias serias en los niños de la sociedad moderna (Bank y cols., 1996), y se dispone de muy poca evidencia de los efectos que pueden tener sobre el sistema nervioso. Solo para el plomo, el metilmercurio y policlorobisfenoles (PCBs) existen evidencias epidemiológicas convincentes (Chen y cols., 1992; Banks y cols., 1996; Grandjean y cols., 1997), al menos otras 135 sustancias químicas industriales causan toxicidad en humanos, que al ser probados experimentalmente en animales causan neurotoxicidad. La falta de una evaluación científica de los efectos que causan las toxinas ambientales durante el neurodesarrollo en humanos impide prevenir la neurotoxicidad generada por ciertos productos químicos, por ello los esfuerzos deben dirigirse a la prevención de la exposición a toxinas no solo durante el desarrollo sino a lo largo de la vida.

Considerando el difícil acceso a datos epidemiológicos, es necesario dirigir los esfuerzos para realizar estudios experimentales que lleven al conocimiento de la capacidad de los compuestos para cruzar la placenta humana y de su tasa de transferencia en diferentes estadios durante la gestación; estos estudios pueden ser de gran valor para

determinar el daño potencial por la exposición en diversas etapas del desarrollo fetal del cerebro.

El estudio de la estructura y de la manera en que las sustancias potencialmente neurotóxicas penetran la barrera placentaria, la hematoencefálica y otras durante el desarrollo embrionario puede ser relevante, pues permitirá generar productos químicos con una baja capacidad para penetrar estas membranas biológicas.

Es necesario dirigir estudios experimentales sobre neurotoxicidad durante el desarrollo, utilizando modelos animales en roedores expuestos a dosis bajas y repetidas durante la etapa pre- y post-natal, que permitan analizar en cortos periodos de tiempo los efectos neurotóxicos graves e irreversibles que pueden permanecer sin ser detectados. Por lo tanto, es necesario implementar modelos experimentales capaces de detectar los efectos durante la gestación y el período neonatal, estos modelos deberán desarrollarse dependiendo de las condiciones en las que los humanos se exponen e incluir exposiciones crónicas y agudas durante los periodos más vulnerables del neurodesarrollo pre- y postnatal.

2.9 Neurotoxinas ambientales en el desarrollo de modelos animales de la enfermedad de Parkinson.

A partir de la *hipótesis ambiental de la enfermedad de Parkinson* desarrollada por Langston (1983), han surgido numerosos reportes que sugieren que las sustancias ambientales pueden producir la pérdida de neuronas dopaminérgicas en animales. Herbicidas y pesticidas como la ROT (Singer y Ramsay, 1994; Betarbet y cols. 2000), el paraquat (Liou y cols. 1996), el maneb (Tiruchelvam y cols. 2000), el dieldrin (Kanthamy cols. 2005) y los insecticidas organoclorados (Corrigan y cols. 2000) han mostrado su capacidad para producir la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra* en animales. Asimismo, algunas de estas neurotóxicas se han detectado en los cerebros de pacientes con enfermedades neurodegenerativas.

El mayor atractivo de las sustancias antes mencionadas es su potencial uso para diseñar modelos animales como la enfermedad de Parkinson idiopática porque los humanos se exponen a ellas en el medio ambiente y es fácil asumir que contribuyen a la patogénesis

de esta enfermedad. Sin embargo, es difícil determinar cómo moléculas naturales como la ROT y numerosos compuestos naturales y sintéticos que contienen piridio, (una estructura similar al MPTP y al paraquat) han contribuido al desarrollo de la enfermedad de Parkinson durante el siglo XX.

La 6-hidroxidopamina (6-OHDA), el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) y la ROT son neurotoxinas dopaminérgicas que producen muchas características de la enfermedad de Parkinson por lo que son muy útiles en el estudio de la neurodegeneración. En particular la ROT es la primera toxina que se ha observado produce la formación de cuerpos de Lewy, además de pérdida de neuronas dopaminérgicas, las disminución de dopamina en el estriado, neuroinflamación y alteraciones locomotoras (Uversky, V.N., 2004; Cannon y Greenamyre, 2010) (Tabla 3).

A pesar de la gran contribución que estos modelos animales hacen para explicar la enfermedad de Parkinson aún tenemos un gran camino por recorrer. Las investigaciones realizadas a la fecha, han sido altamente *dopaminocéntricas*, es decir enfocadas casi exclusivamente sobre la pérdida aguda de las neuronas dopaminérgicas, aunque estos estudios tiene aportaciones importantes para el desarrollo de nuevos fármacos, terapias y tratamiento, *no aportan conocimiento sobre el proceso de la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas*. Desde el punto de vista clínico también, se sabe muy poco sobre el mecanismo de la pérdida neuronal progresiva, por lo tanto, debemos enfocarnos en el desarrollo de terapias que detengan la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas.

Se ha sugerido que se requiere de la administración de más de una dosis de una toxina para producir el efecto sinérgico entre múltiples administraciones de diferentes toxinas para provocar la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas, para originar un efecto que semeje a lo que se observa en la enfermedad de Parkinson. El entender el mecanismo responsable del efecto sinérgico y la pérdida progresiva, proporcionará una visión más crítica y cercana de cómo se altera el mecanismo compensatorio en el sistema nigroestriado. La lógica dicta que los seres humanos no solo se exponen a un solo factor de riesgo, sino a la combinación de varios factores en diversas ocasiones durante la vida, por

lo tanto el desarrollo de modelos animales con múltiples exposiciones parecen ser la evolución lógica de los modelos animales de la enfermedad de Parkinson.

2.9.1 Mecanismos de acción de 6-OHD, MPTP y ROT.

Los mecanismos intracelulares de las neurotoxinas que se aplican en modelos animales de la enfermedad de Parkinson convergen en algún momento como se muestra en la figura 14.

El MPTP atraviesa la barrera hematoencefálica después de la administración sistémica y dentro de los astrocitos y por acción de la monoaminoxidasa-B se convierte en su forma activa MPP⁺ que se libera al espacio extracelular para ser transportado por el transportador de dopamina, una vez dentro de la neuronas dopaminérgica el MPP⁺ puede: *i*) concentrarse en la mitocondria donde inhibe el complejo I de la cadena respiratoria o *ii*) ser secuestrado por las vesículas sinápticas vía el transportador vesicular (figura 14). La 6-OHDA se administra estereotáxicamente en: la *sustancia nigra*, el trayecto nigroesriatal o en el estriado por el transportador de dopamina; una vez dentro de la neurona se acumula en la mitocondria y al igual que el MPP⁺ inhibe el complejo I de la cadena respiratoria de la mitocondria (figura 10).

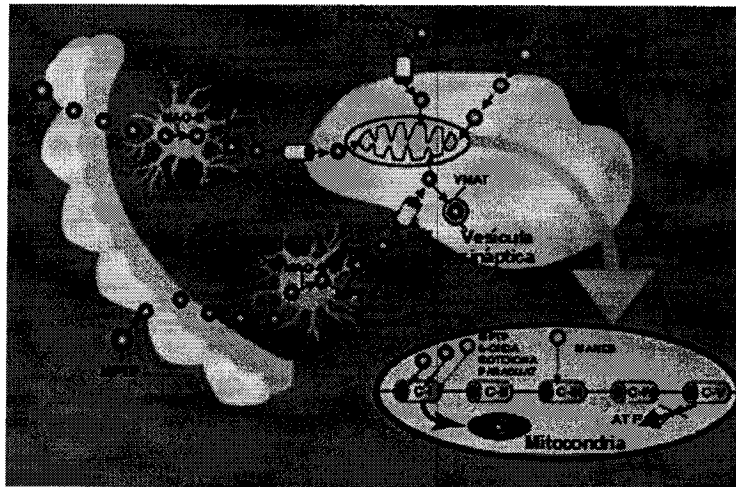


Figura 14 | Vías intracelulares de neurotoxinas dopaminérgicas aplicadas en modelos animales de la enfermedad de Parkinson. El esquema muestra la interacción neurotóxicas MPTP, 6-OHDA y ROT con la cadena respiratoria de la mitocondria.

Las toxinas agrícolas como los pesticidas y herbicidas (ej. ROT, paraquat y maneb) por su liposolubilidad penetran la membrana de las neuronas dopaminérgicas de manera inespecífica y se acumulan en la mitocondria donde inhibe el complejo I mitocondrial.

Una vez dentro de la mitocondria, el MPP+, la 6-OHDA y la ROT interfieren con el transporte de electrones de la mitocondria que consiste de 5 complejos (I al V). El MPP+, la 6-OHDA, la ROT y el paraquat afectan directamente al complejo I (C-1) y generan especies reactivas de oxígeno (C-III). En general todos estas neurotoxinas aumentan la producción de radicales libres y disminuyen la síntesis de ATP en la mitocondria (recuadro figura 10).

3. Características de la ROT y su uso en el modelo animal de la enfermedad de Parkinson

El uso de los plaguicidas botánicos se remonta probablemente a nuestros ancestros cavernícolas quienes seguramente aprendieron la técnica de quemar las hojas de cierto arbusto con el fin de ahuyentar los insectos molestos. Tal ha sido el comienzo de la fumigación. También hay evidencia que en el antiguo Egipto ya se conocía el uso de un polvo misterioso que protegía los cultivos y los granos almacenados del ataque de insectos. Muchos siglos después en el Medio Oriente, dicho polvo misterioso era conocido como el polvo de Persia.

Los aborígenes de la Amazonía utilizan las raíces del *cubé* o *barbasco* para pescar, en un macerado que arrojan a los ríos; luego de un rato aparecen los pescados flotando y son consumidos como base de su alimentación.

La cocción de las raíces del cubé también permiten obtener un tóxico útil en el envenenamiento de las puntas de las flechas, debido a que el compuesto es muy tóxico por vía endovenosa para los animales, sin que produzca el mismo efecto por vía digestiva siempre y cuando no existan heridas ni úlceras por donde el veneno pudiera ingresar.

La acción pesticida de este **rotenoide** se conoció desde 1884 en Singapur, donde los agricultores lo utilizaban en forma de infusiones de derris (*Derris elliptica*). En 1902 el

químico hindú Nagal aisló el principio activo de una planta de la India Oriental y Malaya que se conoce como "*roten*" o "*derris*" por lo que le puso el nombre de **Rotenona**.

La palabra "*cube*" es un término peruano que antiguamente se entendía como "planta venenosa", específicamente para la especie *Lonchocarpus utiles* A. C Smith que se utiliza para pescar. En termino "*barbasco*" que se usó en España y otros países europeos para designar a una planta venenosa conocida como "*barbascum*", que también se utilizó en la pesca de donde se deriva el término *embarbasco* que significa pescar con venenos. Además "*barbasco*" en el Perú se denomina a cualquier planta que se usa como veneno para la pesca, entre las cuales se incluye a las plantas de género *Throsia toxicaria* y la del género *Serjania*. En las zonas de Junín, Huánuco, Huancayo y partes del Sur se le conoce como "*cube*", en Loreto como "conapi" o "pacal", y "kumu" en el Cuzco. En Brasil se le denomina "timbo" pero incluye también a otras plantas que tienen las mismas propiedades. En 1930 Killip y Smith describieron al "cube" o "barbasco" como *Lonchocarpus utilis*.

3.1 Características químicas de la ROT

Nombres comunes:

Barbasco, cube, haiari, nekoe, timbo, conapi, pacai y kumo.

Química:

1,2,12a-tetrahidro-8,9-dimetoxi-2 (-metiletenil-(1)benzopirán-6(6H) -ONE
 $C_{23} H_{22} O_6$

Composición:

Carbono.....70.40%
 Hidrógeno.....5.62%
 Oxígeno.....24.34%

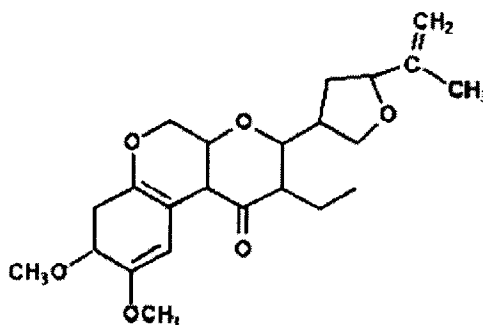


Figura 15 | Estructura molecular de la ROT

Características físico-químicas

- Polvo cristalino blanco
- Insoluble en el agua
- Soluble en alcohol, acetona, cloruro de carbono, cloroformo, éter y otros solventes orgánicos.

3.2 Propiedades bioquímicas de la ROT

La ROT es una citotoxina con alta solubilidad en los lípidos, lo que le permite fácil acceso a todos los órganos, en particular en el cerebro, en donde alcanza su máxima concentración después de 15 min de ser administrada y disminuye a la mitad en menos de 2 h. Una vez que cruza libremente las membranas celulares, la ROT puede acumularse subcelularmente en la mitocondria, donde se une a la enzima nicotinamida adeninucleótido deshidrogenasa (NADH-deshidrogenasa) del complejo I (NADH-ubiquinona óxido reductasa) de la cadena de transporte de electrones que se muestra en la figura 16 (Kilbourn y cols. 1997; Betarbet y cols. 2002; Keeney y cols. 2006). Por este efecto la ROT es usada ampliamente como un potente inhibidor del complejo I mitocondrial (figura 11).

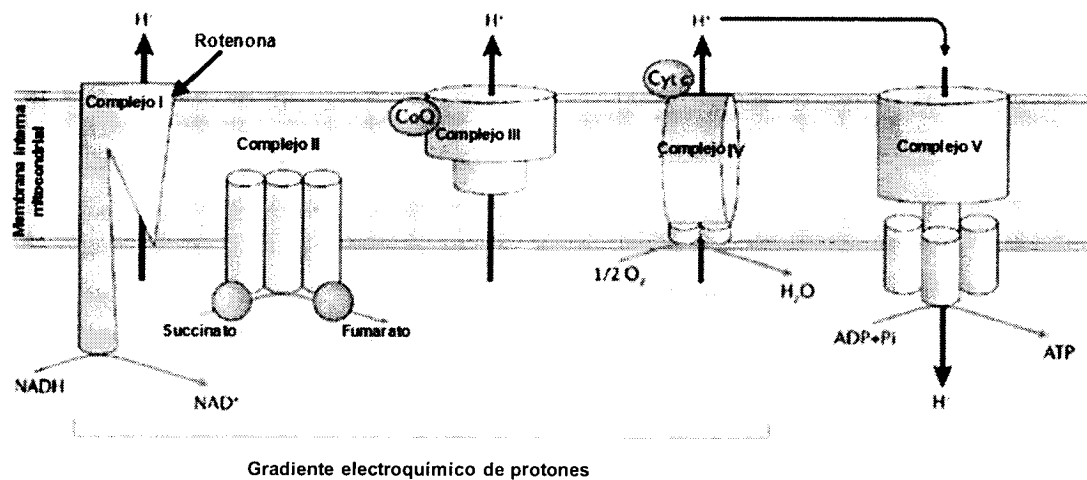


Figura 16 | Representación esquemática del transporte de electrones en la cadena respiratoria y el sitio de unión en donde la ROT lo inhibe.

La administración de ROT por diferentes vías en roedores genera diversos tipos de lesiones en el sistema nervioso central. La administración oral causa neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas, déficit motor y la presencia de α -sinucleína (Inden y cols., 2007). La administración sistémica causa toxicidad relacionada directamente con la dosis o puede ser letal. La inyección estereotáxica en el tallo cerebral de la rata, vacía el contenido de dopamina y serotonina del estriado. Las ratas tratadas por una semana con 10-18

mg/kg/día en una infusión intravenosa causa lesión bilateral en el estriado y globo pálido caracterizada por la pérdida neuronal y gliosis, sin que se afecte la *sustancia nigra* (Ferrante y cols. 1997).

En ratones la inyección única subcutánea de 15 mg/kg y de 1.5 mg/kg en repetidas ocasiones de ROT, no afecta el contenido de dopamina estriatal (Thiffault y cols. 2000), contrariamente Betarbet y cols. en 2000, encontraron que la inyección intravenosa y la infusión subcutánea de 2-3 mg/kg/día de ROT por 3 semanas a ratas produce neurodegeneración dopaminérgica nigroestriada. El análisis cuantitativo del número de las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra* se reducen cerca del 30% en comparación con las ratas tratadas con el vehículo. Este estudio también muestra que el número de neuronas dopaminérgicas mesolímbicas, cuyos cuerpos celulares se encuentran adyacentes a las de la *sustancia nigra* en el área ventral tegmental no manifiestan cambios por la administración de ROT, mientras en el estriado la pérdida de las fibras dopaminérgicas es, en promedio, del 55%, similar a lo que ocurre en la enfermedad de Parkinson.

En contraste con el modelo de 6-OHDA y el de MPTP, las ratas tratadas con ROT, algunas de las neuronas dopaminérgicas sobrevivientes de la *sustancia nigra* contienen inclusiones proteicas de α -sinucleína como ocurre en la enfermedad de Parkinson (Betarbet y cols. 2000; Sherer y cols. 2003).

El uso de modelos animales para el estudio de patologías humanas como la enfermedad de Parkinson son herramientas invaluable en varios sentidos, ya que con ellos ha sido posible reconstruir muchos aspectos de las enfermedades en humanos como la neuropatofisiología de las enfermedades neurológicas como el Parkinson. Estos modelos han sido fuente abundante de información sobre los mecanismos celulares, neuroquímicos, genéticos, etc. además de aportar información sobre posibles tratamientos terapéuticos. Aún cuando la mayoría de las enfermedades neurológicas no se entienden en su totalidad, se sigue generando información sobre su posible tratamiento, por lo tanto los modelos animales parecen seguir proporcionando información en la dirección correcta.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de que las evidencias epidemiológicas acumuladas y que los datos obtenidos de modelos en rata de la enfermedad de Parkinson con ROT apuntan a que la ROT es un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Parkinson, se desconoce si la exposición a ROT de madres gestantes y lactantes, afecta el desarrollo del sistema dopaminérgico nigroestriatal en sus crías produciendo parkinsonismo, o lesiones asociadas con la enfermedad de Parkinson.

Por lo tanto se requiere generar información sobre los efectos tóxicos en la vía nigroestriada en desarrollo tratando de contestar preguntas fundamentales de como la ROT durante el desarrollo embrionario puede inducir daños progresivos y/o permanentes en las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales en desarrollo, y si los daños iniciados en el desarrollo embrionario pueden conducir al desarrollo del síndrome parkinsonico en los adultos jóvenes o hacer más susceptibles a estas neuronas a los daño después de varias exposiciones a esta toxina o a otros xenobioticos.

4 H I P O T E S I S

1. La ROT administrada en ratas gestantes y lactantes reduce el número de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales tanto en sus críos como en ellas mismas.
2. La exposición *in útero* y durante la lactancia a ROT aumento la concentración de la proteína α -sinucleína en la *sustancia nigra* y el estriado.
3. La exposición *in útero* y durante la lactancia a ROT altera el sistema nigroestriatal lo que se manifiesta como deficiencias motoras en las crías.
4. La exposición *in útero* y durante la lactancia a ROT sensibiliza el sistema dopaminérgico nigroestriatal de modo que lo hace más susceptible a exposiciones posteriores en la edad adulta.

5 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos de la exposición a ROT *in útero* y durante la lactancia sobre el desarrollo del sistema dopaminérgico nigroestriado de la rata y establecer su posible relación con:

- 1) Cambios en las neuronas dopaminérgicas en la *sustancia nigra*
- 2) Variación en la concentración de α -sinucleína
- 3) Alteraciones motoras a largo plazo (permanentes)
- 4) Mayor sensibilidad del sistema a exposiciones subsecuente

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- 5.1.1 Determinar la dosis subcutánea diaria de ROT a administrar en ratas adultas que asegure su supervivencia durante la gestación y la lactancia, y que esta dosis permita tener la mayor tasa de sobrevivencia de las crías en la etapa neonatal.
- 5.1.2 Determinar los efectos del tratamiento con diferentes dosis subcutáneas de ROT en las ratas gestantes y lactantes sobre el número de neuronas TH-IR (dopaminérgicas).
- 5.1.3 Cuantificar en las crías expuestas a ROT *in útero* y durante la lactancia los efectos sobre el número de neuronas dopaminérgicas TH-IR de la vía nigroestriadas después del desarrollo postnatal (30 y 60 días postnatales).
- 5.1.4 Cuantificar la concentración de la proteína α -sinucleína en la *sustancia nigra* y estriado de las madres tratadas con ROT y de sus crías.
- 5.1.5 Evaluar la capacidad motora de las crías en diferentes edades después de ser tratadas con ROT y sus cambios después de haber sido expuesta por una segunda ocasión al neurotóxico en edad adulta.
- 5.1.6 Evaluar con Fluoro-Jade C, el proceso neurodegenerativo de la *sustancia nigra*, sin importar el mecanismo específico de muerte celular.

6 MATERIAL Y METODOS

6.1 Condiciones generales

6.1.1 Preparación y administración de la solución de ROT.

La solución de ROT (Sigma, St Louis, MO), se prepara en una mezcla 1:1 de polietilenglicol y dimetilsulfóxido (PEG:DMSO, o vehículo). La ROT o el vehículo se preparó diariamente para administrarse por vía subcutánea en las ratas gestantes bajo las diferentes condiciones experimentales. La ROT o el vehículo se administraron levantando la piel del lomo de las hembras después de confirmar su preñez por la presencia del tapón vaginal.

6.1.2 Cuidado y manejo de los animales

Los animales así como todos los procedimientos se manejaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) la cual cumple con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicada en 1996 por el Instituto Nacional de Salud de U. S. A.

Se utilizaron ratas Wistar hembra de 250 g, obtenidas del Biotério de la Facultad de Medicina se colocaron dos hembras con un macho sexualmente experto. Después de 48 h se verificó mediante el tapón vaginal que las hembras estuvieran preñadas, lo que determinó el inicio del tratamiento con ROT. Las hembras preñadas se colocaron en cajas individuales y se mantuvieron en condiciones estándar con un ciclo invertido de luz-obscuridad de 12-12 horas (las luces se apagaban a las 7 AM.), a temperatura (21 ± 1.0 °C) y humedad ($55 \pm 5\%$) constantes y con agua y alimento *ad libitum*.

La ROT se administro inyectando por vía s.c. 100 µl de la mezcla de PEG:DMSO (1:1) en la que se diluyo la concentración correspondiente de ROT de acuerdo al protocolo a seguir.

6.1.3 Preparación del tejido cerebral para inmunotinción.

Las ratas hembras y sus crías fueron anestesiadas con una sobredosis de pentobarbital sódico, 1 o 0.5 ml respectivamente (Pfizer, México, DF, México) y se perfundieron transcárdialmente con 200 ml de una solución PBS (solución salina en buffer

de fosfatos: 0,1 M, pH 7.4, NaCl 130 mM, Na₂HPO₄ 7mM y NaH₂PO₄ 3 mM), y posteriormente fueron fijadas con 250 ml de paraformaldehido al 4% disuelto en la solución PBS. Los cerebros se extrajeron y se postfijaron en la misma solución durante 12 h, y posteriormente se colocaron en una solución crioprotectora consistente en sacarosa al 30% disuelta en solución PBS a 4° C.

6.1.4 Procedimiento de inmunotinción para tirosina hidroxilasa

De la porción del cerebro correspondiente a la *sustancia nigra*, de acuerdo a las coordenadas al atlas estereotáxico del cerebro de la rata (Paxinos y Watson, 1997), se obtuvieron cortes de 40 µm de grosor en un micrótopo de congelación a -20°C (Cryo-Cut American Optical).

Para la inmunohistoquímica de TH, las rebanadas de cerebro se colocaron en libre flotación en cajas multipozos y se lavaron tres veces con PBS durante 10 min (PBS 3X10 min); se incubaron por una hora a 4° C en una solución PBS con 3% de Triton X-100 (Sigma) y 0.01% de albumina bovina (BSA; Sigma). Posteriormente, las secciones fueron incubadas 12 horas en una solución de PBS que contenía el anticuerpo policlonal de conejo contra TH (1:1000; Biotecnología Santa Cruz); esta incubación se mantuvo en condiciones de agitación leve y a 4° C. Al día siguiente, después de lavarse en PBS 3X10 min, los cortes fueron incubados en solución PBS con un anticuerpo secundario biotinilado (IgG de conejo biotinilado diluido a 1:250; ABC Vector Burlingame, CA USA) durante 2 h a temperatura ambiente; al término de este tiempo los cortes fueron lavados con PBS 3X10 min. Para visualizar la reacción de la unión antígeno-anticuerpo, las secciones se incubaron 2 h en una solución de avidina-biotina conjugada con peroxidasa (ABC VectaStain Elite Kit Vector, Burlingame, CA, USA). Después de lavarse 3X10 min con una solución Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4, las secciones fueron incubadas 5 min con 0.1% de diaminobencidina (Sigma), y luego se agregó peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 0.24% para revelar la localización de la reacción antígeno-anticuerpo para TH. La reacción fue monitoreada con un microscopio, y cuando era claramente visible se detuvo mediante lavados con PBS 3X5 min. Finalmente, las secciones reveladas fueron colocadas sobre portaobjetos, se deshidrataron con alcoholes y xilol, para finalmente cubrirse con Cytoseal XYL (Richard Allan-científico) y un cubreobjetos.

6.1.5 Análisis y cuantificación de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra TH-IR

Para cuantificar a las neuronas TH-IR, los límites de la SN se establecieron de acuerdo con el atlas estereotáxico del cerebro de rata (Paxinos y Watson, 1997) iniciando en -5,20 y terminando a -6,30 mm de Bregma (aproximadamente 800 μm de la SN fueron evaluadas). Las imágenes fueron capturadas por una cámara (Evolution VF Cooled Color Camera Medica Cybernetics) adaptada a un microscopio (Olympus IX-71, Japón) con un aumento 4X y 20X, aumento con el cual se hace el análisis, una vez adquiridas las imágenes, con el programa Image ProPlus 6.0. Las neuronas TH-IR fueron contadas manualmente en un área de 0.075 μm^2 . El criterio para considerar a una neurona dopaminérgica TH-IR fue encontrar el citoplasma completamente marcado, y el núcleo perfectamente definido y sin marca. Se analizaron veinte cortes del cerebro de cada uno de los 10 animales. Con estos datos se calculó el promedio de las neuronas TH-IR por cada animal.

6.1.6 Preparación de los tejidos para la extracción y cuantificación de α -sinucleína.

Para cuantificar el contenido de α -sinucleína nativa las hembras y/o sus crías se sacrifican por decapitación. El estriado y la *sustancia nigra* se disectaron y se mantuvieron a -70°C hasta ser procesadas no más de un mes. La extracción de α -syn se llevó a cabo de acuerdo al método de Campbell et al. (2000), y para la cuantificación de la α -sinucleína se procedió de acuerdo a las instrucciones del proveedor del kit de ELISA (Biotrak ELISA System, α -synuclein, Amersham Biosciences, UK).

6.1.7 Histofluorescencia con FluoroJade C

El Fluoro-Jade C así como su precursor, el Fluoro-Jade B marca neuronas en proceso de degeneración sin importar el origen del daño provocado en las neuronas ni el mecanismo específico de muerte celular. El Fluoro-Jade C es un fluoróforo resistentes a decoloración, con alta resolución, buen contraste y alta afinidad por las neuronas en proceso de degeneración; permite localizar cuerpos de degeneración, dendritas y axones.

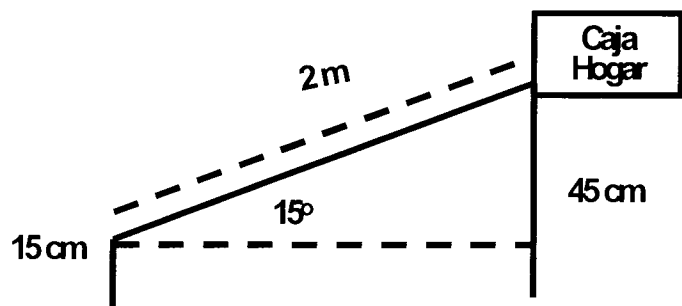
El procedimiento para marcar neuronas con FluoroJade C se llevó a cabo de acuerdo al método de Schmued y cols. (1997), y consiste en colocar los cortes de tejido sobre

portaobjetos gelatinizados, se secan a temperatura ambiente, se sumergen 3 min en etanol al 100%, 1 min en etanol al 70%, 1 min en agua, 15 min con agitación ligera en una solución 0.06% de permanganato de potasio, se lava 1 min en agua. Las preparaciones se sumergen en una solución al 0.0001% de FluoroJade C disuelto en 0.1% de ácido acético por 30 min en la obscuridad. Al término de este tiempo las preparaciones se lavan sumergiendo 3 veces por 1 min en agua, se colocan horizontalmente en obscuridad y se secan bajo un ventilador. Finalmente se sumergen 3 veces por 2 min en xileno y se cubren de DPX

6.1.8 Procedimiento para la prueba motora de la viga de equilibrio.

La prueba fue diseñada y validada por Drucker y García (1991), específicamente para evaluar la conducta motora de ratas con daño en la vía nigroestriada. Este dispositivo (figura 17) consiste en una viga de madera de 2 m de largo, colocada con una inclinación de 15° , para que la rata la escale. En el extremo superior de la viga se coloca su caja-hogar como estímulo para que ejecute la prueba. Inicialmente, las ratas se entrenan a subir sobre una viga de 24 mm de ancho durante 5 días antes de realizar la prueba; la prueba inicia cambiando el grosor de la viga en anchos de 9, 6 y 3 mm. La rata se coloca en la parte baja de la viga y se le permite caminar hasta alcanzar el extremo superior registrando el tiempo en el que llega a su caja-hogar. Se emplea un límite máximo de 120 seg, al término del cual si la rata no ha alcanzado su caja-hogar se remueve manualmente y coloca en su caja y recibe una calificación de 120 seg en caso de no efectuar la prueba. Los resultados se expresaron como el promedio del tiempo total (seg) que tarda cada animal (10 sujetos en cada condición experimental) para efectuar la prueba.

Figura 17 | Ilustración del dispositivo para la prueba motora en la viga de inclinada. La inclinación de 15° se logra con la altura de los pedestales de 42.5 y 100 cm, respectivamente, que soportan las vigas de madera de 3,



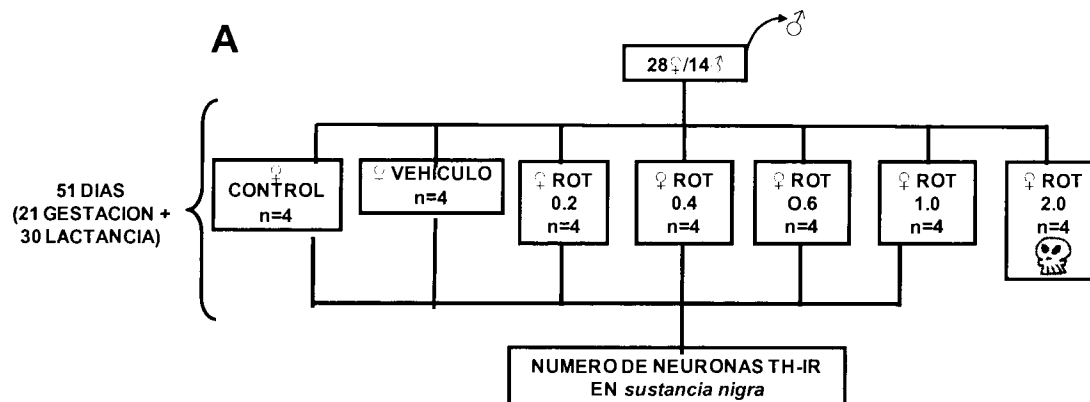
6.2 Diseños experimentales

Los diseños experimentales se dirigieron para resolver preguntas específicas y son:

1. Curva dosis respuesta con ROT en hembra
2. Curva dosis-respuesta con ROT en crías
3. Administración de ROT durante la gestación, lactancia y gestación/lactancia
4. Exposición de las crías a ROT durante el neurodesarrollo y en edad adulta.

6.2.1 Curva dosis-respuesta con ROT en hembras

El primer diseño consistió en realizar una curva dosis-respuesta de ROT que permitiera determinar la dosis óptima para obtener el mayor índice de sobrevivencia de las ratas gestantes (figura 18A) y la obtención del mayor número de crías viables las cuales se utilizaron en el diseño experimental posterior (figura 19). El diseño experimental de la figura 18B se determinó una vez obtenidos los resultados de la curva dosis-respuesta.



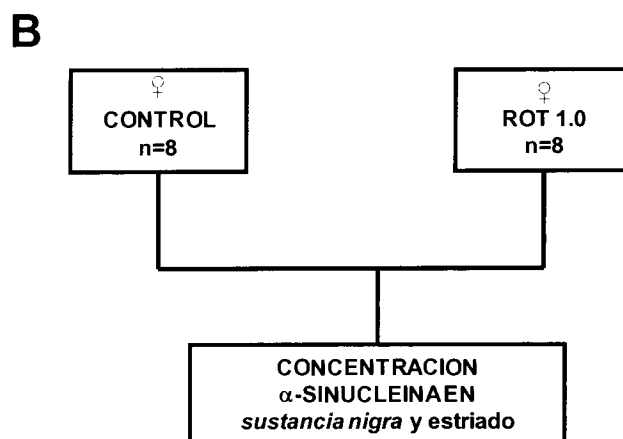


Figura 18 | Curva dosis-respuesta de ROT en las hembras gestantes y lactantes. A) Este diseño nos permitió definir la dosis con la cual encontramos daños en la *sustancia nigra*, así como obtener la mayor tasa de sobrevivencia de hembras y crías, en el inciso B) el diseño que permitió cuantificar la concentración de α -sinucleína en la *sustancia nigra* y el estriado en hembras expuestas a ROT.

Una vez confirmada la preñez de las ratas, se organizaron en seis grupos: Control o intactas, Vehículo y administradas con 0.2, 0.4, 0.6 y 1.0 mg/kg de ROT. El tratamiento vía subcutánea (s.c.) se inició el primer día de la gestación y se mantuvo por 51 días, que corresponden 21 a la gestación y 30 a la lactancia. El cerebro de las hembras así como el de sus crías a los 30 y 60 días postnatales se extrajeron para ser procesados por inmunotinción para cuantificar el número de neuronas con inmunoreactividad positiva a tirosina hidroxilasa (TH-IR) en la *sustancia nigra* o para cuantificar por ELISA el contenido de α -sin en la *sustancia nigra* y el estriado.

6.2.2 Curva dosis-respuesta con ROT en crías

EL diseño de la figura 19A y B se construyó a partir de las crías de las ratas gestantes tratadas con las diferentes dosis de ROT (curva dosis-respuesta), con la finalidad de determinar la dosis con la que se obtendría el mayor número de crías viables, observar sus efectos en la sobrevivencia, el peso corporal, cuantificar el número de neuronas TH-IR de la

sustancia nigra, la concentración de α -sinucleína y obtener los datos preliminares sobre los efectos de la ROT en la capacidad motora de las crías.

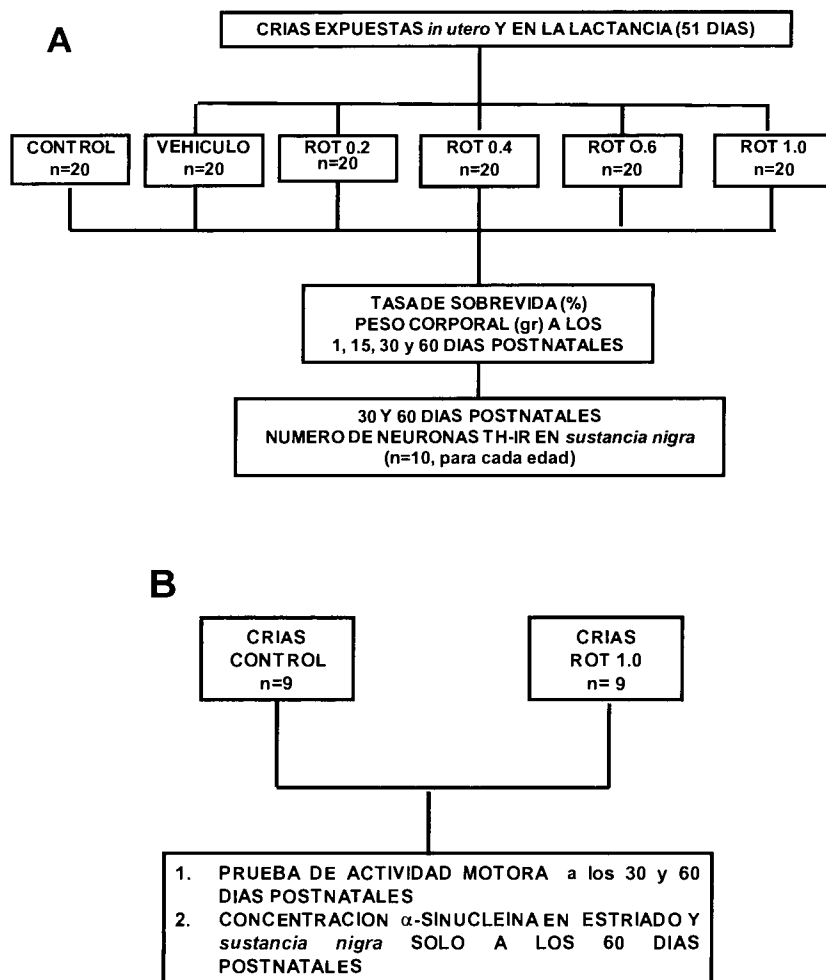


Figura 19 | Curva dosis-respuesta de la exposición *in útero* y durante la lactancia a ROT en las crías en A) para cuantificar el número de neuronas TH-IR de la *sustancia nigra* y en B) para cuantificar la concentración de α -sinucleína en estriado y *sustancia nigra*.

6.2.3 Administración de ROT durante la gestación, lactancia y gestación/lactancia

Una vez determinada la dosis de ROT con la que se obtiene el mayor índice de supervivencia de las madres y sus crías, fue necesario determinar el estadio del desarrollo

durante el cual la ROT provocó mayor daño en el sistema dopaminérgico nigroestriatal en desarrollo (figura 20).

Ratas Wistar preñadas se dividieron en cuatro grupos: el CONTROL que recibieron diariamente una inyección s.c. con el vehículo (sin ROT) desde la gestación hasta la lactancia; el grupo (GEST/LACT) que recibió diariamente una inyección con 1.0 mg/kg de ROT desde el inicio de la gestación hasta el término de la lactancia (51 días). Un tercer grupo (GEST) de ratas gestantes que recibió diariamente vía s.c. 1.0 mg/kg ROT desde la gestación y justo después del nacimiento sus crías fueron intercambiadas por las crías de un grupo control (ratas sin ROT), con el fin de que sus crías se expusieran a ROT solo durante la gestación y que fueran amamantadas por una hembra control. El cuarto grupo (LACT) son las crías de hembras control que después del nacimiento son intercambiadas por crías de hembras tratadas con ROT, con el fin de que fueran expuestas a ROT solo durante la lactancia. Las crías se sacrificaron a los 60 días y su cerebro se procesó para inmunotinción para TH en la *sustancia nigra*, evaluar su capacidad motora y cuantificar por el método de ELISA el contenido de α -sinucleína en la *sustancia nigra* y el estriado.

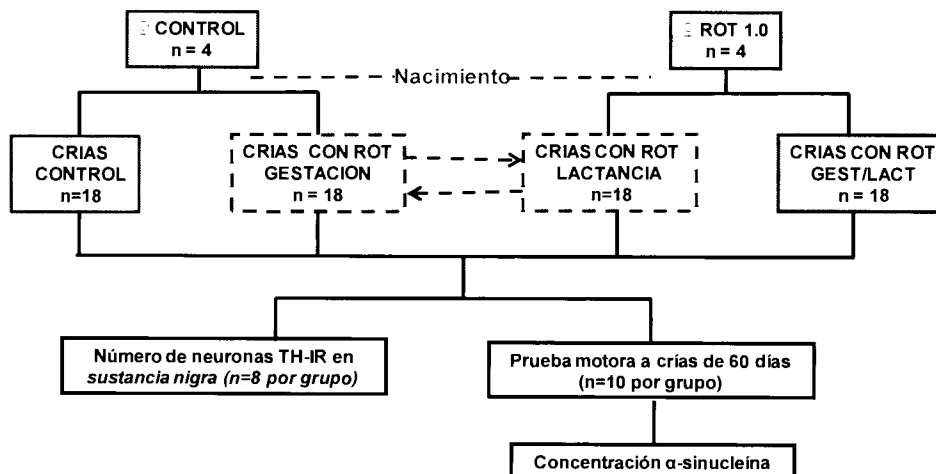


Figura 20 | Exposición a ROT durante diferentes estadios del desarrollo en crías.

6.2.4 Exposición de las crías a ROT durante el neurodesarrollo y en edad adulta.

El diseño experimental de la figura 21 consistió en evaluar el efectos en la capacidad motora en diferentes edades en las crías expuestas a ROT *in útero* y durante la

lactancia, y posteriormente en la edad adulta, así como evaluar si las crías expuestas en edades tempranas del desarrollo, eran más susceptibles a los daños ocasionados por una segunda exposición a ROT en la edad adulta.

Ratas Wistar preñadas se dividieron en dos grupos: el CONTROL que se mantuvo intacto y un grupo ROT que recibió diariamente via s.c 1.0 mg/kg de ROT durante la gestación y la lactancia (51 días). La coordinación motora de las crías se evaluó con la prueba motora diseñada y validada por Drucker y García (1991) al mes y a los dos meses de edad para posteriormente ser tratadas a los 4 meses de edad con 1.0 mg/kg de ROT; así como un grupo de ratas intactas adulta de 4 meses que solo a esta edad estuvieron expuestas a 1 mg/kg de ROT, el incluir este grupo permitió evaluar los daños motores en las ratas expuestas a ROT solo durante la edad adulta, todos los grupos fueron evaluados nuevamente la prueba de coordinación motora a los 6, 9 y 12 meses de edad.

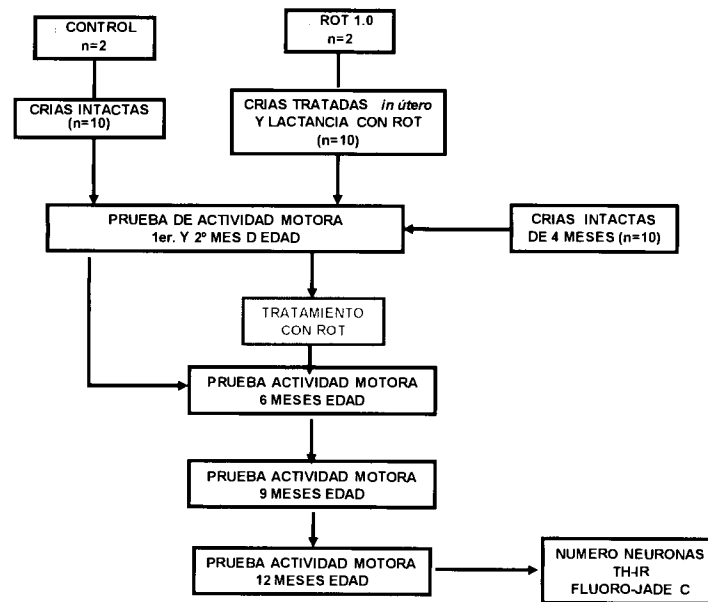


Figura 21 | Efecto de la exposición a ROT *in útero*, durante la lactancia y en edad adulta sobre la actividad motora.

Con este diseño experimental se cuantificó el número de neuronas TH-IR en la *sustancia nigra*, y se realizó un experimento piloto en el cual se marcaron las células con Fluoro-Jade C, fluoroforo que permite identificar neuronas en proceso de degeneración sin importar el origen ni el mecanismo de muerte celular por el que ocurre daño (figura 21).

6.3 Análisis estadístico.

Los resultados se expresan en todos los casos como el promedio \pm el error estándar de la media. Dependiendo del caso se realizaron los análisis estadísticos: para la tasa de sobrevivencia de la crías se aplicó una prueba X^2 , una prueba de t de Student para la concentración de α -sinucleína en las hembras y en las crías, una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Tukey de comparaciones múltiples para: el número de neuronas TH-IR en las hembras y crías, así como para las pruebas motoras; una probabilidad de 0.05 se consideró como estadísticamente significativa.

7 RESULTADOS

7.1 Efecto de la ROT en hembras gestantes

Número de neuronas TH-IR en la *sustancia nigra* y concentración de α -sinucleína en el estriado y la *sustancia nigra*

Nuestro primer reto fue determinar la dosis de ROT que pudiese ser administrada en las ratas preñadas desde el primer día de gestación hasta el término de la lactancia (51 días). Los estudios reportados utilizaban dosis entre 2 a 3 mg/kg de ROT para inducir la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra* en ratas macho adultas, administrándola durante 2 horas, o hasta por 5 semanas (Betarbet y cols., 2000,2006; Sherer y cols., 2003; Cannon y cols., 2006). De acuerdo con esto hicimos una curva dosis-respuesta para explorar el efecto de la ROT en la díada madre-críos, ya que se desconocía el efecto de la ROT tanto en los críos como en las hembras gestantes.

Las ratas Wistar preñadas fueron tratadas con 0.2, 0.4, 0.6 1.0 y 2.0 mg/kg/día de ROT, para medir el efecto de la ROT mediante la cuantificación del número de neuronas dopaminérgicas TH-IR en la *sustancia nigra*, y relacionar este efecto con los cambios en la concentración de α -sinucleína en el estriado y la *sustancia nigra*. La dosis de 2.0 mg/kg de ROT fue la primera que se probó por ser la más frecuentemente reportada. Encontramos que esta dosis de ROT causaba la muerte de todas las ratas antes del parto, por lo que fue eliminada de los experimentos subsecuentes en apego NOM-062-ZOO-1999 con lo que se evitó el sufrimiento y la muerte innecesaria de los animales.

Las siguientes dosis de ROT a probar fueron: 0.2, 0.4, 0.6, y 1.0 mg/kg. El efecto encontrado en las hembras-madres fue un menor número de neuronas dopaminérgicas. La figura 22 muestra imágenes representativas de la *sustancia nigra* en donde se observa una disminución de las neuronas TH-IR, la cual parecía ser proporcional al aumento de la dosis de ROT. La media del número de neuronas TH-IR por campo en las hembras sin tratamiento (control) fue 200.5 ± 19.92 , y en las tratadas con el vehículo fue 160.5 ± 22.39 ; las hembras tratadas con ROT tuvieron valores promedio de 219.5 ± 26.49 , 171.5 ± 20.83 , 128.5 ± 10.50 y 41.75 ± 5.96 neuronas TH-IR por campo, que corresponden al efecto de las dosis de 0.2, 0.4, 0.6, y 1.0 mg/kg de ROT, respectivamente (figura 23). Además, el análisis

de varianza de una vía (ANOVA) reveló significancia para el efecto del tratamiento con ROT ($F_{(5,18)} = 11.04$; $p < 0.0001$). Sin embargo, la prueba *post hoc* de comparaciones múltiples de Tukey mostró que sólo el grupo de animales tratados con la dosis mayor de ROT (1 mg/kg) tuvo diferencias significativas al compararse con los grupos control, vehículo, y los tratados con las otras dosis de ROT ($p < 0.001$).

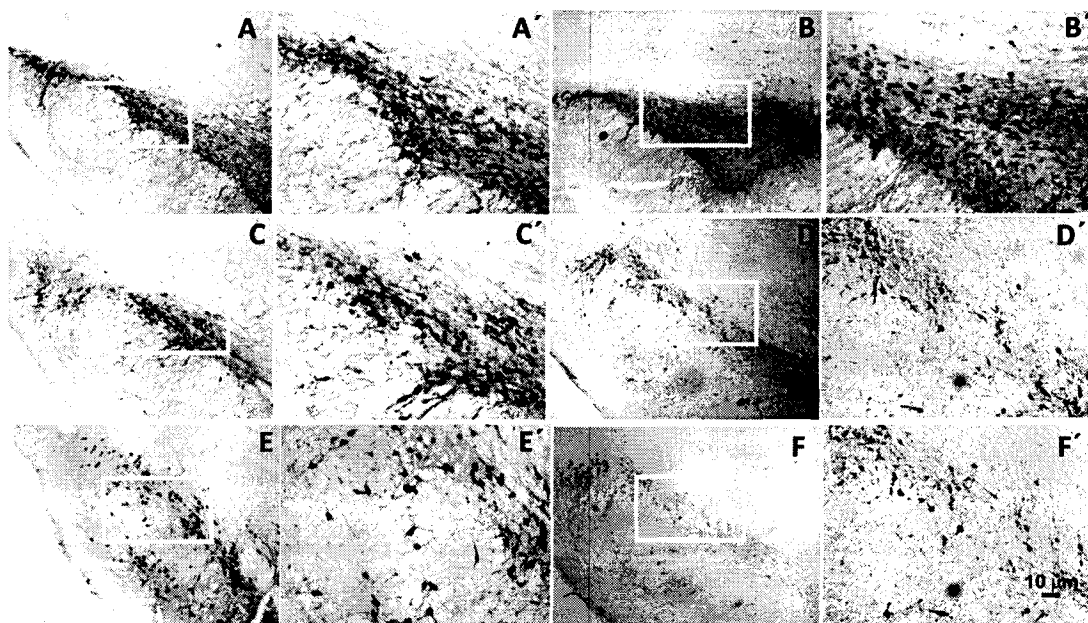


Figura 22 | Fotografías representativas de la *sustancia nigra* de las madres A y A' en condiciones control, B y B' tratadas con el vehículo de la ROT (DMSO:PEG; 1:1), C y C' a F y F' tratadas con 0.2, 0.4, 0.6 y 1.0 mg de ROT respectivamente, a la izquierda se presentan micrográficas con un aumento 4X y a la derecha marcadas con el apostrofe con un aumento 20X. Se puede observar una menor densidad de neuronas TH-IR conforme se incrementa la dosis de ROT. La barra muestra una escala de 10 μm

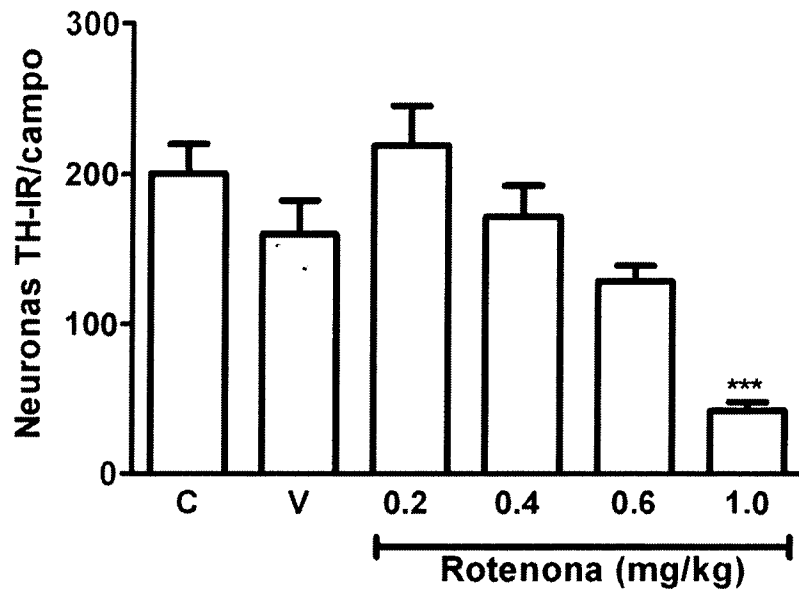


Figura 23 | Número de neuronas TH-IR de la *sustancia nigra* en las ratas adultas. Esta gráfica representa el número de neuronas TH-1R en relación a las diferentes dosis de ROT por 51 días en éstas ratas. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar del número de neuronas TH-IR por campo, obtenido a partir de 20 cortes por sujeto de cada grupo ($n = 4$). El grupo tratado con 1.0 mg/kg de ROT muestra diferencias estadísticamente significativas con $p < 0.0001$. C = grupo control; V = vehículo; la barra con el rótulo Rotenona representa las diferentes dosis a las que las hembras fueron tratadas con diferentes dosis de ésta.

Se valoró el efecto de la administración de 1 mg/kg de ROT sobre la concentración de α -sinucleína en las neuronas del estriado y de la *sustancia nigra* de las madres. La figura 24 muestra los resultados de la concentración de α -sinucleína en el estriado (A) y en la *sustancia nigra* (B), en ella se puede observar un incremento de α -sinucleína, comparado con los datos de las hembras control. Este incremento fue mayor en la *sustancia nigra* que en el estriado. La prueba t de Student no pareada reveló diferencias significativas entre los grupos: para el estriado, $t = 196.5$, $df = 14$, $p < 0.0001$, y para la *sustancia nigra* $t = 1542$, $df = 14$, $p < 0.0001$.

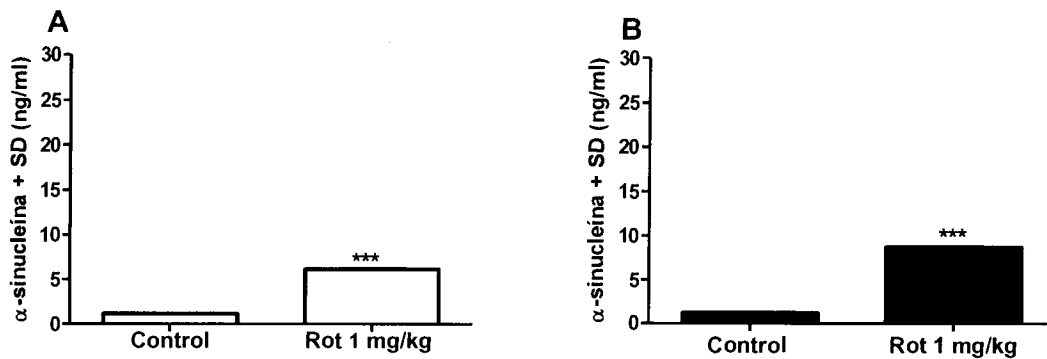


Figura 24 | Concentración de α -sinucleína A) en el estriado y B) la *sustancia nigra* de hembras. Las hembras en condiciones control y tratadas con 1 mg/kg de ROT. Las barras representen el promedio de la concentración \pm el error estándar. $p < 0.0001$.

Este experimento mostro que la dosis de 2 mg/kg/día de ROT provocó alta toxicidad en los animales, motivo por el cual no fue considerada para subsecuentes evaluaciones. Las hembras preñadas tratadas con 1 mg/kg/día de ROT tuvieron una pérdida significativa de neuronas TH-IR en la *sustancia nigra* que replicaba la reportada con el doble de la dosis en machos adultos. Este efecto se acompañó del incremento de la concentración de α -sinucleína en el estriado y la *sustancia nigra*.

7.2 Efecto de la ROT en las crías

Sobrevida y peso corporal de las crías de ratas tratadas con ROT.

Se evaluaron los cambios en el peso en las crías de las hembras tratadas con las diferentes dosis de ROT y su sobrevida.

La tabla 5 muestra la tasa de sobrevida (%) y el peso corporal (g) de las crías al nacimiento, a los 15, 30 y 60 días de edad. Se encontró una respuesta inversamente proporcional a la dosis: conforme se administraban dosis más altas de ROT disminuyo la tasa de sobrevida de las crías, de un 84% a un 40%. Como se esperaba, no hubo mortalidad en las crías del grupo control, sin embargo, en el grupo tratado con vehículo la mortalidad fue similar a la observada en los grupos tratados con 0.2 y 0.4 mg/kg de

ROT. La tasa de sobrevivencia en las crías de las hembras tratadas con las dosis mayores a 0.6 mg/kg de ROT fue significativamente menor que en los grupos control y del vehículo. La dosis de 2 mg/kg de ROT indujo una mortalidad del 100%, razón por la cual fue descartada en los experimentos subsecuentes. Se observó también que el tratamiento con ROT disminuyó el peso corporal de las crías, el cual fue determinado al nacimiento, a los 15, 30 y 60 días de edad de las crías, las dosis de 0.4, 0.6 y 1.0 mg/kg de ROT provocaron reducciones significativas del peso desde el primer día de nacimiento. (Tabla 5).

Tabla 5 | Tasa de sobrevivencia (%) y peso corporal (g) en crías de diferentes edades

Grupo	Tasa de Sobrevivencia (%) ¹	Peso corporal (gr)			
		1 DPN	15 DPN	30 DPN	60 DPN
Control	0	5.13±0.2	28.4±0.9	84.2±1.2	213.0 ± 2.5
Vehículo	84	4.75±0.4	27.3±1.6	75.6±1.1	218.1 ± 3.0
Rotenona					
0.2 mg/kg	84	4.70±0.2	27.5±1.4	74.6±2.0	209.9 ± 2.3
0.4 mg/kg	81 [†]	4.07±0.1*(14%)	23.8±0.4*(13%)	66.7±2.1*(11%)	190.7±2.3*** (12%)
0.6 mg/kg	68 [†]	3.41±0.2*(28%)	20.6±0.3*(24%)	57.0±1.0**(24%)	174.7±0.9*** (19%)
1.0 mg/kg	40 [†]	3.15±0.2**(33%)	14.5±0.8**(46%)	52.04±0.5**(31%)	161.6±6.9*** (25%)
2.0 mg/kg	0	ND	ND	ND	ND

¹Los valores representan el porcentaje de sobrevivencia, una prueba de X² o Exacta de Fisher da un valor de 92.60, p < 0.0001. Los valores en los paréntesis representan el porcentaje del decremento en el peso corporal al compararse con el grupo control a la misma edad una ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Tukey mostró diferencias significativas *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001 ND = no determinado

La figura 25 muestra una fotografía en la que se observa la diferencia entre la talla y el peso de dos crías en el primer día de nacidos, una proveniente de una hembra control y la otra de una madre tratada con 1 mg/kg de ROT, es evidente que las crías expuesta a ROT durante el desarrollo embrionario tuvieron menor talla y peso, además de rigidez corporal y cianosis. Sin embargo, no se observaron malformaciones ni cambios teratógenos en las crías expuesta a la ROT.

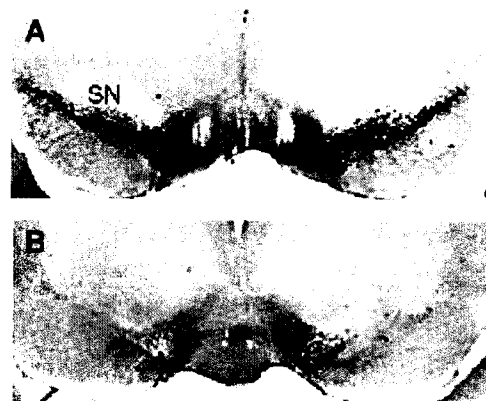
Figura 25 | Relación peso-talla en las crías. Se muestra la diferencia de peso y talla entre dos crías al nacimiento. La cría control proviene de una rata madre sin tratamiento durante la gestación (grupo control). La otra cría proviene de una madre que recibió durante la gestación 1 mg/kg de ROT, claramente se observa en esta cría un menor peso y una menor talla, además de rigidez de cuerpo, sobre todo en patas y cola, el color de la piel presenta cambios de rosa a violáceo lo que sugiere cianosis.



Número de neurona TH-IR en la *sustancia nigra*, evaluación de la capacidad motora y concentración de α -sinucleína

La figura 26 muestra microfotografías a bajo aumento (4X) representativas de la región correspondiente a la *sustancia nigra* de crías de 60 días de edad descendientes de ratas control (figura 25A) y de ratas tratadas con 1 mg/kg de ROT durante 51 días (figura 25B); en esta última podemos observar una reducción importante de la inmunotinción TH-IR en la *sustancia nigra*, lo que sugiere una menor población de neuronas dopaminérgicas TH-IR.

Figura 26 | Región correspondiente a la *sustancia nigra*. Fotomicrografía de la *sustancia nigra* de ratas de 60 días. A, ratas control y B, ratas tratadas con 1 mg/kg de ROT. Se observa una inmunotinción TH-IR débil en la *sustancia nigra* de la rata tratada con ROT. SN = *sustancia nigra*.



El análisis al microscopio con aumentos de 4X y 20X de la zona correspondiente a la *sustancia nigra*, en las crías, reveló que el número de neuronas TH-IR tuvo un patrón similar al de sus madres tratadas directamente con ROT. En los paneles A, C, E, G, I y K de la figura 27 se muestran una serie de fotomicrografías de esta zona en las crías de 30 días que estuvieron expuestas durante 51 días (*in útero* y la lactancia) a diferentes dosis de ROT. Un efecto similar pero ligeramente más pronunciado se observa en los paneles B, D, F, H, J y L de la misma figura 27, que corresponde a las crías de 60 días, las cuales tuvieron los mismos 51 días de exposición, pero luego de 1 mes, posteriores al destete, estuvieron sin exposición al xenobiotico.

Los valores promedio del conteo del número de neuronas TH-IR por campo se muestran en la figura 28. En los animales de 30 días de nacimiento, en condiciones control y vehículo los valores promedio fueron 190.7 ± 1.38 y 161.7 ± 1.90 , mientras que en los grupos tratados con las diferentes dosis de ROT fueron de 135 ± 1.40 , 102.9 ± 2.05 , 75.18 ± 0.81 y 56.5 ± 0.55 , respectivamente (figura 28A). El análisis de varianza (ANOVA) de una vía mostró diferencias significativas del tratamiento ($F_{(5,54)} = 1268$; $p < 0.0001$). La prueba *post hoc* de comparaciones múltiples de Tukey reveló que los grupos control y vehículo tuvieron diferencias significativas contra todos los grupos tratados con ROT ($p < 0.001$). La número de neuronas TH-IR también disminuyó en las crías de 60 días postnatales; los valores promedio del conteo del número de neuronas TH-IR por campo en condiciones control y vehículo fueron 191 ± 5.85 y 165 ± 1.90 respectivamente, y en los grupos tratados con las diferentes dosis de ROT fueron de 106.8 ± 1.31 , 65.35 ± 5.84 , 56.38 ± 0.83 y 32.52 ± 1.21 , respectivamente (figura 28B). El ANOVA de una vía mostró diferencias significativas por el tratamiento ($F_{(5,54)} = 344,1$; $p < 0.0001$), y la prueba *post hoc* de Tukey reveló diferencias entre los grupos control y vehículo, contra todos los grupos tratados con ROT ($p < 0.001$).

Al no observar diferencias significativa entre el vehículo (DMSO:PEG) y el grupo control intacto, se decidió utilizar animales intactos como controles de la dosis de ROT de 1.0 mg/kg porque es con la que tanto las ratas adultas como sus crías muestran daños en la *sustancia nigra*.

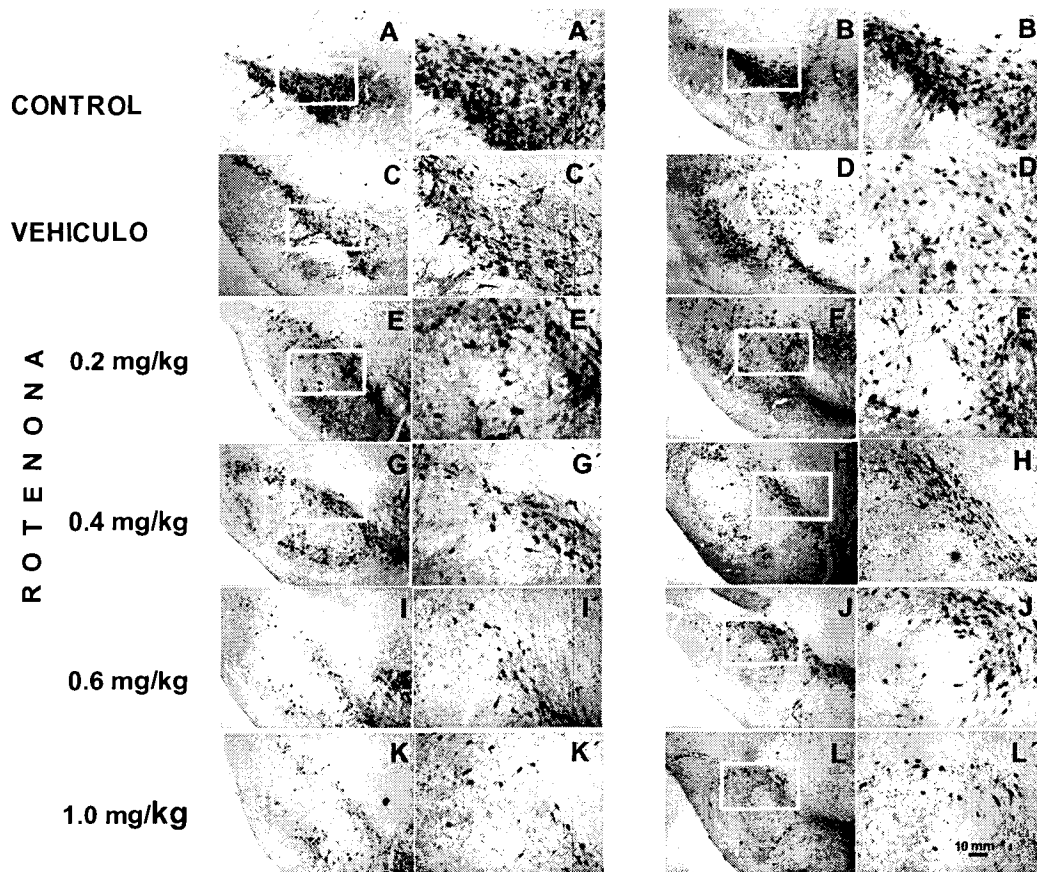


Figure 27 | Fotomicrografías representativas de neuronas TH-IR de la *sustancia nigra*. En la zona correspondiente a la *sustancia nigra* de las crías de 30 y 60 días postnatales en condiciones control (A, A' y B, B'), crías tratadas con el solvente de la ROT (C, C' y D, D') y crías que recibieron dosis de 0.2, 0.4, 0.6 y 1.0 mg/kg de ROT (E, E' a L, L'). Se observa pérdida progresiva de células TH-IR directamente proporcional al aumento de la dosis de ROT (Escala de la barra = 10 µm).

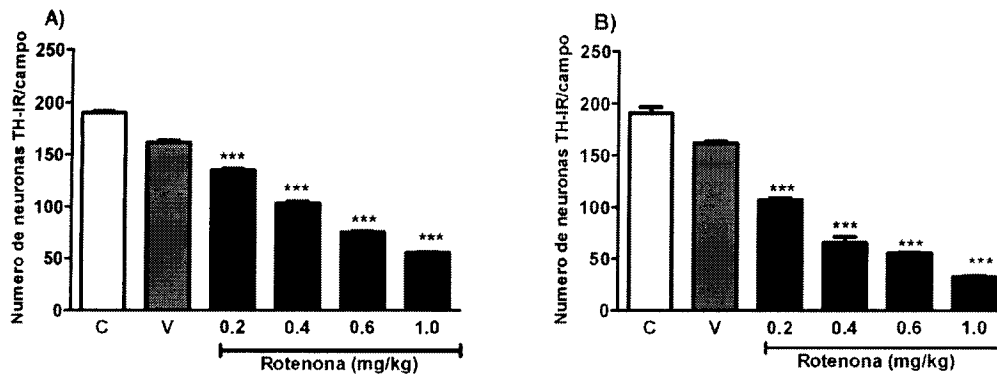


Figura 28 | Número de neuronas TH-IR en la *substancia nigra* en crías expuestas a las diferentes dosis de la curva dosis-respuesta de ROT. A, efecto de la exposición a ROT *in útero* y durante la lactancia en crías de 30 días. B, en crías de 60 días. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar del número de neuronas por campo, [20 cortes x sujeto x grupo (n=10)], $p < 0.0001$, C = grupo control, V = grupo vehículo.

Evaluación la capacidad motora en las crías

Se evaluó el daño en el sistema dopaminérgico nigroestriado inducido por la ROT en las crías y su impacto sobre la actividad motora. Dos grupos de crías fueron elegidas para ser evaluadas a los 30 y 60 días de edad en la prueba de la viga inclinada: un grupo que comprendió a las crías de hembras control y otro a las crías de una hembra expuesta durante 51 días a la dosis de 1 mg/kg de ROT. La prueba de la viga inclinada permite evaluar las deficiencias motoras relacionándolas directamente con el incremento en el tiempo que tardan los animales en ejecutar la prueba.

Las crías expuestas a 1 mg/kg de ROT requirieron más tiempo para ejecutar la prueba motora. El panel A de la figura 29 muestra que en las crías de un mes de edad aumentó el tiempo total para ejecutar la prueba a medida que disminuye el grosor de la barra de 9 a 6 y a 3 mm. En el panel B de la figura 29 se muestran los resultados de las mismas crías a los dos meses de edad, evaluadas un mes después de haber estado expuestas a la ROT sin ninguna exposición posterior, se observó un ligero aumento en el tiempo en la ejecución de la prueba

El análisis de varianza de dos vías mostró un efecto significativo del tratamiento con ROT ($F_{(11,99)} = 482.16$; $p < 0.0001$), el tratamiento representa el 97.72% de la varianza total, por lo que efectos se considera altamente significativo.

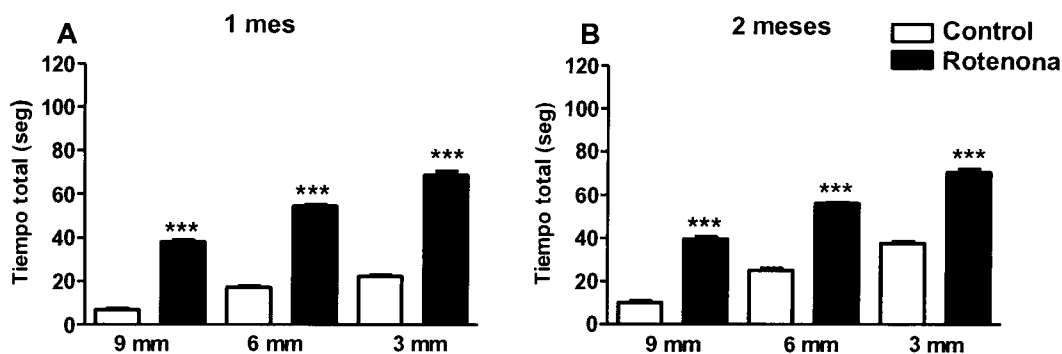


Figura 29 | Tiempo empleado contra el grosor de la viga para ejecutar la prueba de la viga inclinada. El panel A corresponde a las crías evaluadas a los 30 días de edad y el panel B corresponde a las mismas crías evaluadas a los dos meses de edad. Las crías expuesta a 1 mg/kg de ROT, emplearon significativamente más tiempo en ejecutar la prueba, ($p < 0.0001$; $n = 10$).

En general los resultados mostraron que el aumento en el tiempo para ejecutar la prueba motora fue directamente proporcional al daño producido por la ROT en la *sustancia nigra* de las crías.

Para corroborar el daño inducido por la ROT, se cuantificó la concentración de α -sinucleína en el estriado y la *sustancia nigra* en las crías de los grupos control y el tratado con 1 mg/kg de ROT a los 60 días de edad (figura 30) a los que previamente se les evaluó su capacidad motora. La concentración de α -sinucleína promedio en el estriado de los animales control fue de 1.15 ± 0.0007 ng/ml y en las crías de los animales tratados con ROT fue de 22.82 ± 0.03 ng/ml (figura 30A). La prueba de t Student mostró diferencias significativas ($F_{(8,15)} = 496.4$, $p < 0.0001$). En la *sustancia nigra* el promedio en la concentración de α -sinucleína en las crías control fue de 1.15 ± 0.0007 ng/ml y en los animales tratados con ROT fue de 26.36 ± 0.07 ng/ml (figura 30B), la prueba de t Student revela diferencias significativas ($F_{(8,14)} = 244.6$; $p < 0.0001$).

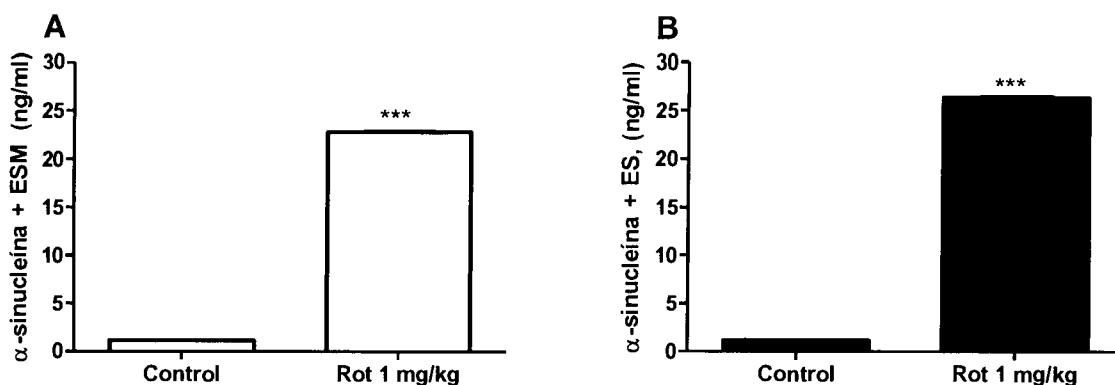


Figura 30 | Efecto de la ROT en la concentración de α -sinucleína en el estriado y sustancia nigra de las crías.

La gráfica muestra el promedio en el incremento de la concentración de α -sinucleína en las crías de 60 días en condiciones control y tratadas *in útero* y durante la lactancia con ROT (1 mg/kg), $p < 0.001$

La disminución en el número de neuronas dopaminérgicas TH-IR en la *sustancia nigra* de las crías siguieron un patrón semejante que en las ratas adultas, sin embargo en las crías este daño se observó en todas las dosis utilizadas en la curva-dosis respuestas, siendo más pronunciado en las crías de 60 días que en las de 30 días, aún cuando dejaron de recibir ROT a los 30 días posteriores al término de la lactancia. La concentración de la α -sinucleína aumentó en las crías al doble de la concentración encontrada en las ratas adultas, siendo ligeramente mayor el aumento en la *sustancia nigra* que en el estriado, al igual que en las hembras adultas.

7.3 Efecto de la exposición a ROT en la gestación, la lactancia y en la gestación/lactancia en las crías

Número de neuronas TH-IR en la *sustancia nigra*

Una vez determinada la dosis efectiva de ROT que indujo en las madres y las crías la pérdida de neuronas dopaminérgicas TH-IR, aumento en la concentración de α -sinucleína y deficiencias motoras; el siguiente aspecto fue determinar la etapa del desarrollo en la cual el sistema dopaminérgico es más vulnerable a los daños inducidos por la ROT.

La figura 31 muestra una serie de fotomicrografías tomadas a un aumento 20X, correspondiente a la *sustancia nigra* de crías de 60 días en condiciones control expuestas con 1 mg/kg de ROT durante la gestación, la lactancia o ambos periodos. Se puede observar mayor disminución de la neuronas dopaminérgicas TH-IR de la *sustancia nigra* en las crías expuestas a ROT durante la gestación y la lactancia.

La grafica de la figura 32, compara el promedio en el número total de neuronas TH-IR de la *sustancia nigra* para cada condición; el grupo GEST/LACT tiene una pérdida de neuronas TH-IR del 91% (684.3 ± 44.5), el grupo GEST tuvo una pérdida de 79% (1684 ± 125.5), y el grupo LACT tuvo una pérdida del 49% (4163 ± 272.4), comparadas contra el grupo CONTROL el cual se consideró sin de pérdida de neuronas (8176 ± 526.1). Un ANOVA arrojó un valor de $F_{(3, 28)} = 120.8$, $p < 0.0001$ entre los grupos y la prueba *post hoc* de Tukey mostró diferencias significativas entre el grupo control y todos los grupos de crías expuestas a ROT en los dos diferentes estadios del desarrollo evaluados así, como entre el grupo LACT y los grupos GEST/LACT y GEST, mientras no se observan diferencias significativas entre los grupos GEST/LACT y GEST ($p < 0.0001$).

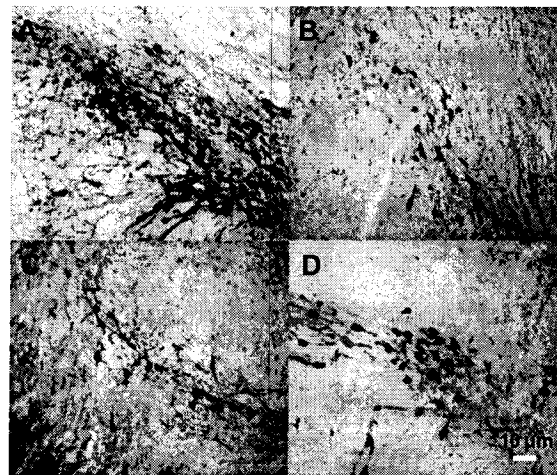


Figura 31 | Fotomicrografías representativas donde se muestra las neuronas TH-IR en la *sustancia nigra*. El panel A corresponde a la *sustancia nigra* de una cría de 60 días de edad en condiciones control, B tratada con ROT en la gestación/lactancia, C durante la gestación y D durante la lactancia. Se observa un menor número de neuronas TH-IR marcadas por el tratamiento con ROT que varía de acuerdo al estadio de desarrollo en el cual fueron expuestas a ROT. Barra = 20 μm .

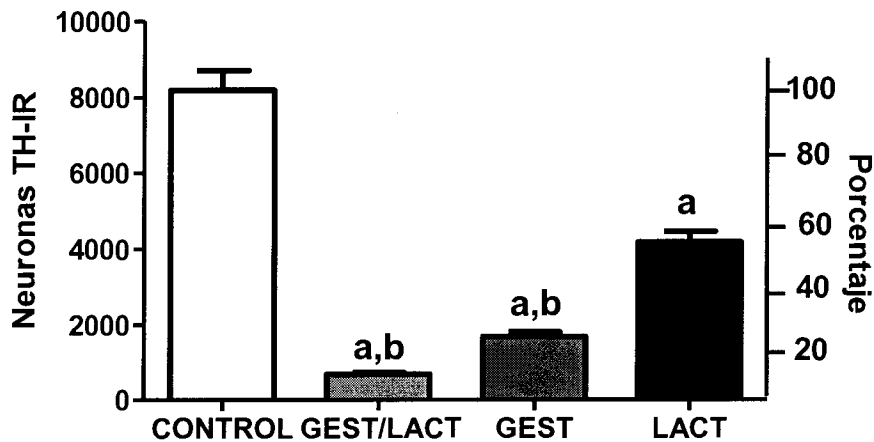


Figura 32 | Número y porcentaje de neuronas TH-IR en los diferentes estados de desarrollo de las crías. La gráfica muestra el número de neuronas TH-IR de las crías CONTROL o expuestas a ROT durante la gestación y la lactancia (GEST/LACT), la gestación (GEST) y la lactancia (LACT). Las barras representan la media \pm el ESM, la prueba *post hoc* de Tukey mostro diferencia entre el CONTROL y todos los grupos tratas (^a $p < 0.00001$) y entre los grupos GEST/LACT y GEST y el grupo LACT (^b $p < 0.00001$), $n = 8$ por grupo.

Pruebas de capacidad motora

Las crías de los grupos descritos anteriormente fueron evaluadas en su capacidad motora a los dos meses de edad; los resultados del tiempo que emplearon para ejecutar la prueba motora se muestran en la figura 34. Un ANOVA de la varianza del tiempo total que emplea cada grupo de crías en la viga de 9 mm (figura 33A), muestra diferencias significativas al compararse con el control con un valor de $F_{(3,36)} = 368.5$, $p < 0.0001$; en la viga de 6 mm (figura 33B) muestra un valor de $F_{(3,36)} = 408.9$, $p < 0.0001$; y en la viga de 3 mm (figura 33C) el valor de $F_{(3,36)} = 102.3$ siendo $p < 0.0001$; la prueba *post hoc* de Tukey mostró diferencias significativas entre los grupos tratados con ROT en los tres diferentes grosores de las vigas $p < 0.05$; excepto para la viga de 9 mm en el grupo LACT que no reveló diferencias significativas al compararse con el grupo control, pero sí al compararse con el grupo GEST y GEST/LACT.

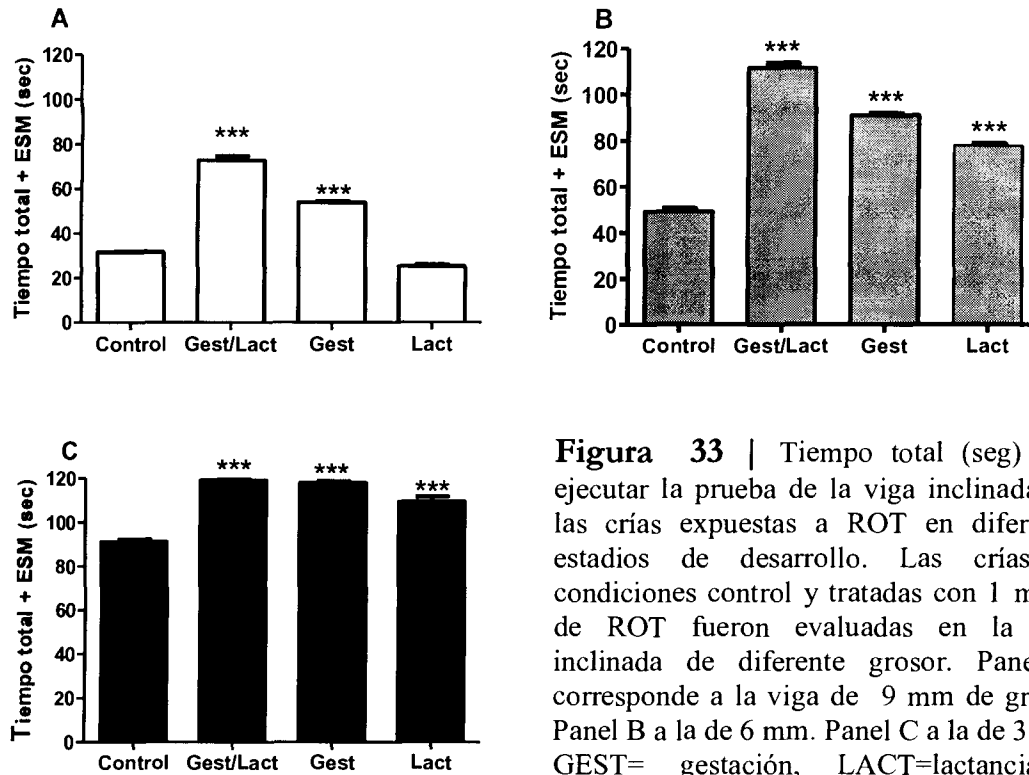


Figura 33 | Tiempo total (seg) para ejecutar la prueba de la viga inclinada por las crías expuestas a ROT en diferentes estadios de desarrollo. Las crías en condiciones control y tratadas con 1 mg/kg de ROT fueron evaluadas en la viga inclinada de diferente grosor. Panel A corresponde a la viga de 9 mm de grosor. Panel B a la de 6 mm. Panel C a la de 3 mm. GEST= gestación, LACT=lactancia y GEST/LACT= gestación/lactancia.

Concentración de α -sinucleína

Los resultados de la cuantificación de la concentración de la α -sinucleína en las crías de este diseño experimental se muestran en la figura 34, siendo mayor el contenido de esta proteína en los animales expuestos a ROT comparados con los controles, la concentración de la α -sinucleína siempre es ligeramente menor en el estriado (figura 34A) comparado con la *sustancia nigra* (figura 34B). La concentración de α -sinucleína fue mayor en los grupos expuestos a ROT siguiendo el siguiente orden: GEST/LACT > GEST > LACT > CONTROL, respectivamente. La ANOVA mostró diferencias significativas entre los grupos ($F_{(3,28)} = 4080$; $p < 0.0001$), para el estriado y ($F_{(3,28)} = 1221$; $p < 0.0001$) para la *sustancia nigra*. La prueba *post hoc* de Tukey reveló diferencias significativas entre el grupo control y todos los grupos expuestos a ROT en los diferentes estadios del

desarrollo descrito, y entre los grupos GEST y LACT y, el grupo GEST/LACT, sin observarse diferencias significativas entre los grupos GEST y LACT ($p < 0.0001$)

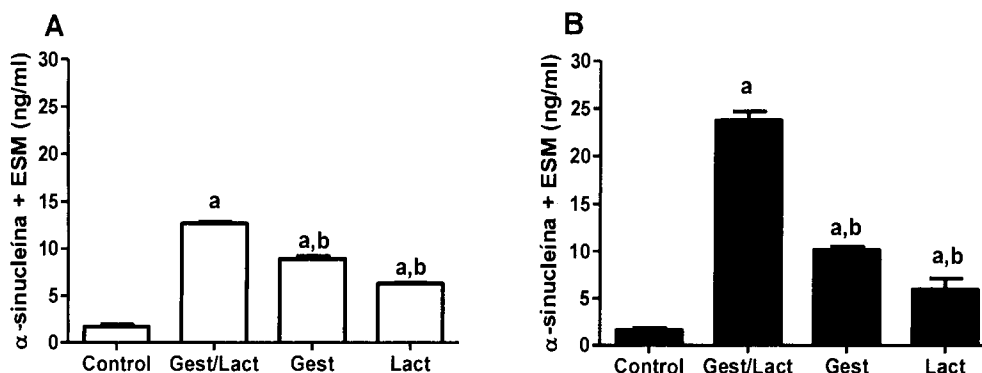


Figura 34 | Concentración de α -sinucleína en el estriado y la *substancia nigra* en diferentes etapas del desarrollo de las crías. La gráfica muestra el promedio en la concentración de α -sinucleína en el estriado (A) y en la *substancia nigra* (B), en las crías expuestas a ROT en diferentes etapas del desarrollo: gestación y lactancia (GEST/LACT), gestación (GEST) y lactancia (LACT). Las barras representan al promedio + error estándar de la media ^a $p < 0.0001$ al compararse con el control y ^b $p < 0.0001$ al compararse con el grupo GEST/LACT.

Los resultados de las evaluaciones en el número de neuronas TH-IR de la *substancia nigra*, la concentración de α -sinucleína y la capacidad motora, muestran que el mayor efecto de la ROT se obtuvo en los animales tratados durante la gestación y la lactancia.

7.4 Efecto de la exposición repetida de ROT.

Deficiencias motoras, número de neuronas TH-IR y detección de neurodegeneración con FluoroJade C en la *substancia nigra*.

Para evaluar una mayor sensibilidad al daño en el sistema dopaminérgico, provocado por un segundo tratamiento con ROT en la edad adulta, de las crías; exploramos la conducta motora a los 6, 9 y 12 meses de edad. Las crías de dos meses de edad, evaluadas previamente en el experimento 2; posteriormente fueron expuestas por segunda

ocasión en la edad adulta a 1 mg/kg de ROT. Paralelamente un grupo de ratas intactas de 2 meses de edad fueron evaluados con la misma prueba motora, estas ratas empezaron a recibir 1mg/kg de ROT a partir de los 2 meses de edad y posteriormente fueron evaluadas con la misma prueba motora a los 6, 9 y 12 meses de edad, este grupo permitió comparar el daño progresivo inducido por el tratamiento de la ROT.

La figura 35 muestra los resultados obtenidos del tiempo en que los animales tardan en ejecutar la prueba motora a los 2 meses de edad (A), a los 6 meses (B), a los 9 meses (C) y a los 12 meses (D). Al aplicar una ANOVA de dos vías para cada una de las edades; el análisis considera que el tratamiento explica más del 95% del total de la varianza y un valor de $p < 0.001$.

El aumento en el tiempo total para ejecutar la prueba motora se atribuye al daño durante el desarrollo y en la edad adulta; en la figura 36 se muestra la fotografía de una rata de 12 meses de edad con severas deficiencias motoras debido al tratamiento con ROT durante la gestación, la lactancia y en la edad adulta, y probablemente al envejecimiento.

En la figura 36 se muestra una fotografía de una rata de 12 meses de edad, en la que se observan las deficiencias motoras en grado extremo, provocadas por la exposición a ROT *in útero*, la lactancia y durante la edad adulta.

Para explorar la correlación entre el déficit motor y la degeneración neuronal en la *sustancia nigra* inducida por la doble exposición a ROT, la *sustancia nigra* de las ratas evaluadas en la viga inclinada se procesó para inmunotinción para TH y se evaluó con fluoro-Jade C en un grupo piloto, la neurodegeneración en la *sustancia nigra* por la exposición a ROT sin importar el mecanismo específico de la muerte celular. La figura 37 muestra micrografías de la *sustancia nigra* de ratas de 12 meses de edad; en los paneles A y B inmunoteñidas para TH y en los paneles C y D teñidas con fluoroJade C. Los paneles A y C corresponden a ratas en condiciones control, y los B y D a animales tratados con ROT; en estas últimas se puede observar una disminución importante en la densidad de la inmunotinción para TH lo que refleja la disminución del número de neuronas TH-IR que es significativa al compararse con el grupo control como se muestra en la figura 38, la prueba de t de Student muestra un valor $t_{(9,9)} = 10.72$ y $p < 0.0001$. Así mismo se observa un aumento en el número de neuronas inmunoteñidas con fluoroJade C, un marcador de

degeneración neuronal, en las ratas expuesta a ROT en dos ocasiones, lo que sugiere la presencia de un proceso neurodegenerativo en la *sustancia nigra*.

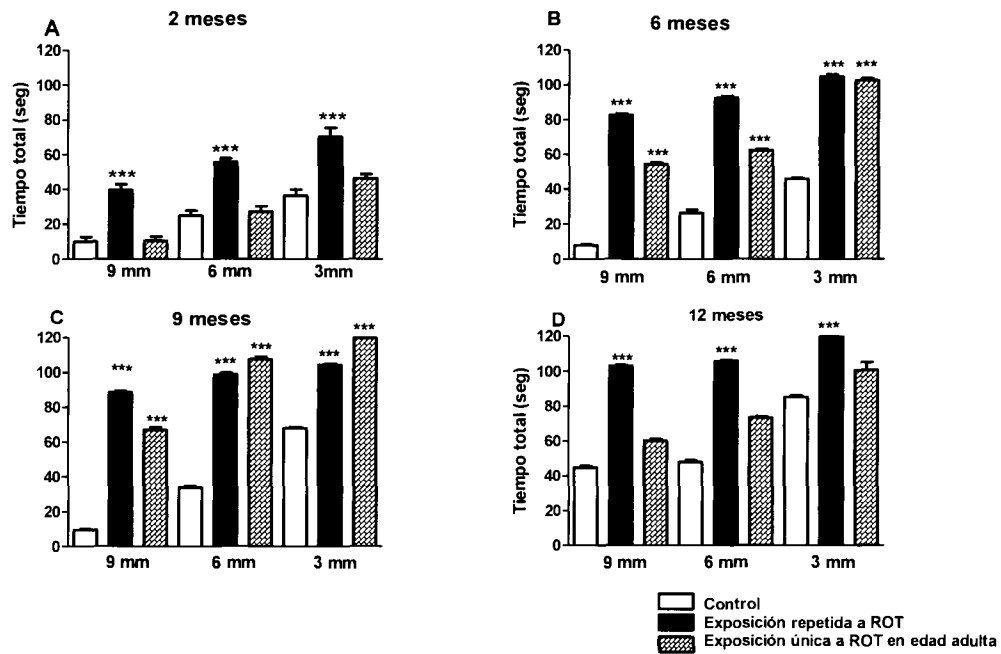


Figura 35 | Tiempo total para ejecutar la prueba de la viga inclinada para evaluar la capacidad motora en las ratas tratadas con 1 mg/kg de ROT durante la gestación, la lactancia y en edad adulta. Las crías del experimento 2 en condiciones control, y expuesta a ROT (1mg/kg), así como un grupo de ratas intactas de 2 meses de edad y posteriormente tratadas con ROT (1 mg/kg) fueron evaluadas en la prueba de coordinación motora a los 6, 8 y 12 meses de edad.



Figura 36 | Fotografía de rata con 12 meses de edad expuesta a ROT durante la gestación, la lactancia y en edad adulta. La fotografía muestra una rata de 12 meses de edad, que fue expuesta en dos ocasiones a ROT, nótese el deterioro motor, la posición de ambas extremidades y piloerección.

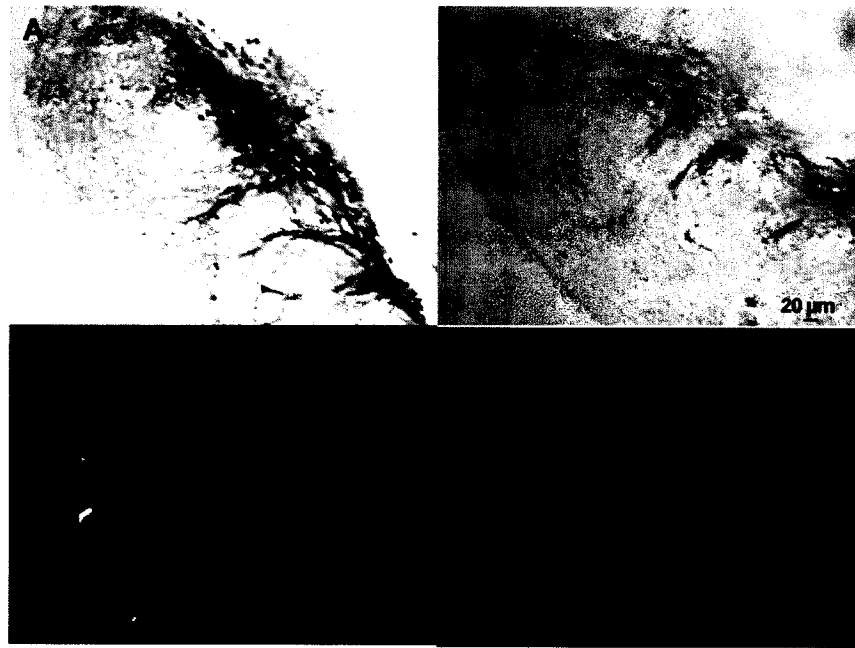


Figura 37 | Fotomicrografías de la *sustancia nigra* de ratas de 12 meses con inmunotinción para TH-IR y fluoro-jade C. La figura muestra el efecto en la *sustancia nigra* del tratamiento repetido con ROT durante dos etapas. En condiciones control (A y C) y (B y D). Se observa un menor número de células TH-IR y un aumento en las células teñidas con FluoroJade C en la *sustancia nigra* de las ratas tratadas con ROT.

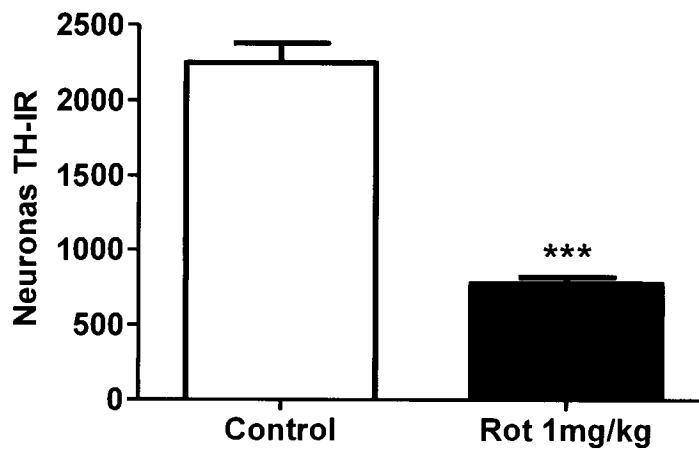


Figura 38 | Número de neuronas TH-IR en ratas de 12 meses de edad. La gráfica muestra el efecto de los tratamientos de ROT en dos diferentes etapas: durante el desarrollo de la *sustancia nigra* y en edad adulta. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar del número de neuronas TH-IR, obtenido a partir de 20 cortes por sujeto de cada grupo (n =10), $p < 0.0001$.

El tratamiento con ROT durante el desarrollo del sistema dopaminérgico nigroestriado hace al sistema vulnerable, ya que un segundo tratamiento durante la edad adulta tiene un efecto aditivo, el cual se refleja en el aumento en el tiempo para ejecutar la prueba motora así como el aumento en el número de neuronas en proceso de degeneración, observado con la marca con fluoroJade C, y la disminución en el número de neuronas TH-IR de la *sustancia nigra* (figuras 37 y 38).

8 DISCUSION

Hasta donde sabemos no hay estudios previos que aborden los efectos *in útero* de la ROT, por lo que aquí evaluamos en ratas Wistar la exposición a este pesticida durante la gestación y la lactancia, o en ambos estadios de desarrollo, y su correlación con posteriores exposiciones en la edad adulta. Los parámetros a considerar en sus crías fueron: el número de neuronas dopaminérgicas TH-IR, además de la concentración de α -sinucleína en el estriado y la *sustancia nigra*, y su posible efecto sobre la capacidad para ejecutar pruebas motoras. El diseño experimental contempló varias etapas, la primera consistió en determinar la dosis de ROT que permitiera la sobrevivencia de las hembras durante la gestación y la lactancia, así como el de sus crías. Al término de este diseño se determinó que la dosis de ROT de 1 mg/kg cumplía con nuestras expectativas. El segundo diseño experimental nos permitió determinar en cuál de los estadios, la gestación o la lactancia, las neuronas TH-IR de la *sustancia nigra* eran más vulnerables a los daños inducidos por la ROT, con este diseño pudimos determinar que durante la gestación las neuronas TH-IR de la *sustancia nigra* son más susceptibles a ser dañadas por la ROT, sin embargo si la exposición a ROT es durante la gestación y la lactancia sus efectos se potencian observándose una mayor pérdida de neuronas en las crías expuestas por ambos periodos. El tercer diseño nos permitió evaluar la vulnerabilidad a de las neuronas TH-IR de la nigra a posteriores exposiciones a ROT, para ello las crías tratadas *in útero* y durante la lactancia con ROT fueron expuestas en edad adulta por segunda ocasión a ROT, los resultados obtenidos mostraron que el sistema dopaminérgico nigroestriatal se encuentra sensible ya que el deterioro motor observado se acentuó, mientras las ratas adultas tratadas con ROT recuperaron su funciones motoras.

8.1 Efecto de la ROT en hembras gestantes

El efecto de la administración de ROT por vía s.c. en las madres sirvió como control del daño sobre las neuronas dopaminérgicas, puesto que las madres y las crías debieron haber estado expuestas a las mismas concentraciones de ROT en sangre, debido a la solubilidad del pesticida. Nuestros datos indican que las ratas madres tuvieron una disminución en el número de neuronas inmunoreactivas a TH (neuronas dopaminérgicas)

en la *sustancia nigra*, pero tal disminución sólo fue significativa con la dosis de 1.0 mg/kg. Como efecto de la ROT también se encontró un aumento en la concentración de α -sinucleína en la *sustancia nigra* y el estriado (figuras 23 y 24). Estos resultados replican los hallazgos previamente reportados por Betarbet y cols. (2000) quienes trataron ratas macho adultas con 2 mg/kg de ROT durante 2 semanas y observaron la misma disminución en el número de neuronas TH-IR. Es importante notar que en todos los estudios previos se habían empleado dosis superiores a 2 mg/kg de ROT, obteniendo resultados similares a los nuestros (Kilbourn y cols., 1997; Sherer y cols., 2003; Alam y Schmidh, 2002; Fleming y cols., 2004; Luo y cols., 2007; Cannon y cols. 2009). Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales, la inyección de 2 mg/kg ROT a hembras gestantes durante 51 días producía un efecto letal con nula sobrevivencia de los críos (tabla 5), lo cual llevó a evaluar dosis menores. La dosis de 1 mg/kg de ROT por 51 días replicó los daños reportadas con dosis mayores, suponemos que ésta es la dosis efectiva 50 para provocar un daño significativo sobre las neuronas dopaminérgicas en la *sustancia nigra* de ratas adultas.

Un estudio previo sugirió que las ratas hembras son resistentes a pesticidas como maneb y paraquat (Tiruchelvam y cols., 2000), sin embargo, nuestros resultados no indican ninguna resistencia especial de las hembras a la ROT, lo que podría deberse a varios factores, una de ellos es la manera en la que estos xenobioticos cruzan la barrera hematoencefálica, mientras la ROT cruza pasivamente la barrera por su alta lipofilicidad, se ha propuesto que el paraquat utiliza un aminoácido neutro y transportadores dependientes de sodio, y la capacidad de penetración del maneb al cerebro no ha sido demostrada. El principal blanco de la ROT y del paraquat es el complejo I mitocondrial lo que provoca el bloqueo del flujo de electrones y el ciclo redox, mientras el maneb bloquea el complejo III mitocondrial, (Cicchetti y cols. 2009). Adicionalmente se ha sugerido que los efectos de la ROT varían entre las distintas especies de roedores, que también puede depender de las dosis, tiempo y vía de administración.

8.2 Efecto de la ROT en las crías

El análisis macroscópico de las crías expuestas a las diferentes dosis utilizadas en curva dosis-respuesta de ROT no mostró ningún efecto teratogénico, sin embargo, otros

autores como Khera y cols., (1982) reportaron que la administración oral de 10 mg/kg de ROT a ratas Wistar por 6 a 15 días durante la gestación, disminuyen la tasa de gestación, aumenta la reabsorción fetal, reduce el incremento de peso de las madres y en de las crías y aumento en la incidencia de costillas extras en estas últimas. Además de haber una alta mortalidad de las madres.

Greene (2009) también demostró la pérdida de peso en las ratas adultas tratadas con ROT, por ello uno de los parámetros a evaluar en las crías era el peso al nacimiento a los 15, 30 y 60 días postnatales. Nosotros encontramos una pérdida de peso importante a partir de la dosis de 0.4 mg/kg de ROT; sin embargo a lo largo del desarrollo postnatal aún cuando los animales van ganado peso nunca alcanzan el de los animales control (tabla 5, figura 25). Probablemente, esta pérdida de peso en las crías expuestas a la ROT se debe a la disminución de la masa muscular del estómago y la discapacidad para digerir alimentos (Lapointe y cols., 2004), lo que deriva en la baja absorción de alimentos en el aparato digestivo. Adicionalmente Greene reportó que las ratas tratadas con ROT por 22-28 días tuvieron un retraso importante en el vaciado gástrico lo que sugiere la inhibición entérica por la ROT.

El interés primordial de este trabajo fué explorar los daños que la ROT puede producir sobre las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra* durante el desarrollo de las crías. Nuestros resultados también muestran que todas las dosis de la curva dosis-respuesta de ROT que fueron administradas a la madre, produjeron una disminución significativa en el número de neuronas dopaminérgicas TH-IR en las crías (figuras 27 y 28). Esto contrasta con el efecto observado en las madres (figura 23), en las cuales solo la dosis mayor de ROT provocó un decremento significativo de neuronas TH-IR. Esta diferencia puede deberse a que en las ratas adultas el fenotipo neuronal esta bien definido y esto les puede conferir cierta resistencia a los efectos de las neurotóxicas, mientras en las crías el fenotipo neuronal no está definido y el mismo proceso de diferenciación las hace mas vulnerables a los daños ocasionados por factores externos. Estos resultados se asocian a los hallazgos de Dencker y Eriksson, (1998) en los que se muestra que en la rata y el ratón en desarrollo, ocurre un crecimiento acelerado del cerebro, que abarca de la 3^a a la 4^a semana de vida, durante el cual ocurren varias fases fundamentales del desarrollo cerebro

como es el crecimiento de axones y dendritas, el establecimiento de conexiones neuronales, la sinaptogénesis, multiplicación de las células gliales y mielinización.

Aunque ambos grupos de crías estuvieron expuestos a la ROT durante el mismo tiempo (la diferencia estriba en las crías que permanecieron sin exposición durante 30 días), el mayor daño que la ROT provocó sobre las neuronas de las crías de 60 días no tuvo una relación directa con los resultados obtenidos al evaluar la capacidad motora de las crías en la prueba de coordinación motora, ya que no hubo diferencias significativas en el tiempo en tardan en trepar o ejecutar la viga inclinada entre los animales probados a los 30 días y a los 60 días de edad (figura 30).

Trabajos de otros autores (Feng y cols., 2006; Jakowec y cols., 2001; Li y cols., 2011; Zhong y cols., 2010) que han evaluado la presencia de α -sinucleína utilizan métodos cualitativos en preparaciones inmunohistoquímicas y Western blot de tejido cerebral de embriones o en ratones adultos. En particular el trabajo de Feng y cols., (2006) evaluó por inmunotinción la distribución de α -sinucleína en ratas en estriado y *sustancia nigra* después de tratarlas con ROT. Hasta donde sabemos, este trabajo es el primero en evaluar cuantitativamente la concentración de la α -sinucleína en el tejido de la *sustancia nigra* y el estriado de las crías expuestas a ROT. El incremento en la concentración de α -sinucleína probablemente se debe a la alta tasa de síntesis de la proteína requerida en la neuroplasticidad de los ganglios basales durante el desarrollo, pero también en este caso en particular puede estar asociada a los daños ocasionados por la exposición *in útero* y durante la lactancia a la ROT, lo cual coincide con los datos de Jakowec en 2001 que encontró altos niveles en la expresión de α -sinucleína en la *sustancia nigra* de ratas de una semana de edad. Adicionalmente la acumulación de α -sinucleína puede atribuirse a la inhibición de unidades del proteosoma que son degradadas por la ROT (Chou y cols. 2010), lo que inhabilita la capacidad del proteosoma para regular la concentración de las proteínas en las neuronas, así como de degradar y eliminar de proteínas mutadas, mal plegadas o dañadas.

Nuestros resultados mostraron que en los animales de 60 días quienes estuvieron 30 días sin exposición a ROT, hay una disminución aún mayor en el número de neuronas TH-IR en comparación con los animales de 30 días, quienes recién habían terminado su exposición al pesticida cuando fueron evaluadas, esto podría atribuirse a la acumulación de

ROT en el tejido adiposo de la crías, que pudiera estarse liberando de manera tónica en las crías.

8.3 Efecto de exposición a ROT *in útero* y durante la lactancia

Para explorar la etapa del desarrollo en la que la ROT tiene mayor impacto en el sistema dopaminérgico en desarrollo, se probó la exposición a la dosis de 1 mg/kg, solo durante la gestación o durante la lactancia, y en ambas. Los resultados se muestran en las figuras 31, 32 y 33.

El principal hallazgo del estudio fue la disminución significativa de las neuronas TH-IR de la *sustancia nigra* y el aumento en los niveles de α -sinucleína, en el grupo de crías que fueron expuestas a ROT en la GEST/LACT (figura 24 y 25); además se observaron deficiencias motoras importantes (figura 26) al compararse con las crías expuestas sólo durante la GEST o la LACT (figura 26), periodos del desarrollo en los que si bien encontramos una pérdida de neuronas, un aumento en la concentración de α -sinucleína y déficit motor, los daños son menores, por lo tanto, podemos inferir que en el grupo GEST/LACT los efectos son aditivos.

La sobreexpresión de α -sinucleína en el estriado y la *sustancia nigra* por la exposición a ROT en el grupo GEST/LACT es mayor que en el grupo GEST y en el grupo LACT; esto probablemente se deba a la inhibición del proteosoma por la ROT que incrementa el daño por oxidación y/o por nitración de subunidades del proteosoma (Chou y cols., 2010), a lo que se suma a la alta tasa de síntesis de α -sinucleína inherente al desarrollo de la vía nigroestriada (Jakowec y cols., 2001). Ambos procesos de manera sinérgica pueden incrementar la agregación y concentración de las proteínas. Adicionalmente, es necesario considerar que el proteosoma se encarga normalmente de fragmentar a las proteínas (como la α -sinucleína) en aminoácidos (McNaught y Jenner, 2001), pero la consecuencia de su inhibición por la ROT debe ser el aumento en la concentración de estas proteínas. Los agregados de α -sinucleína tienen una conformación en láminas β , esta conformación también hace poco accesible que el proteosoma las

fragmente en aminoácidos. Se ha documentado que la sobreproducción de α -sinucleína en las etapas tempranas de la degeneración axónica nigroestriatal tiene efectos dañinos sobre la transmisión dopaminérgica lo que se correlaciona con la reducción de la actividad motora (Gaugler y col., 2012).

Durante la etapa fetal el cerebro es altamente sensible a los daños que pueden ocasionarle diversos factores externos, ya que durante este periodo la protección que la placenta ofrece es limitada, sobre todo contra aquellas sustancias que son altamente liposolubles como la ROT. Además, en los fetos la barrera hematoencefálica no se encuentra completamente desarrollada pues ésta termina su desarrollo después del nacimiento (Julvez y Grandjean, 2009), y debido a que el cerebro continúa su desarrollo durante la etapa postnatal, el periodo de vulnerabilidad a la ROT se prolonga.

8.4 Efecto de la exposición de ROT en dos diferentes etapas.

Se ha reportado que ratones recién nacidos expuestos a dosis bajas de agentes neurotóxicos, como el insecticida paraquat, no muestran efectos inmediatos, sin embargo en la edad adulta presentan cambios conductuales y deficiencias en el aprendizaje, lo que se ha interpretado como una consecuencia de los daños cerebrales irreversibles provocados por la exposición temprana a esta sustancia (Eriksson, 1997).

Las neurotoxinas ambientales pueden ser consideradas un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Cory-Slechta y cols., 2005a, 2005b). Aunque las enfermedades como el Parkinson se presentan con mayor frecuencia en la edad avanzada, la exposición de un individuo a sustancias ambientales nocivas a lo largo de la vida podría tener efectos que serían evidentes sólo cuando una fracción crítica de neuronas dopaminérgicas murieran (Fearnley y Lees, 1991). Si sustancias como la ROT inician sus efectos tóxicos *in útero* o en la edad postnatal temprana, los sujetos expuestos podrían tener una menor población de neuronas dopaminérgicas desde el inicio de la vida, y por lo tanto, pueden ser más vulnerables a otros factores dañinos subsecuentes, lo que incrementa el riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas, como el Parkinson en la edad adulta.

Nuestros resultados muestran que la pérdida permanente y selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra* provocado por la ROT en las crías expuestas a ella en edades tempranas, también potencia el impacto del daño por una segunda exposición a la misma ROT, y probablemente también a otros factores ambientales de riesgo que se presentan durante la edad adulta.

Barlow y cols. (2007) mostraron que la presencia de pesticidas durante el periodo prenatal y perinatal causa la reducción del número de neuronas dopaminérgicas e incrementa la susceptibilidad de estas neuronas a la degeneración por daños subsecuentes ocasionados por otros factores ambientales o por la edad (Landrigan y cols., 2005; Richardson y cols., 2006). Nuestros resultados parecen apoyar esta hipótesis. Sin embargo, la muerte de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales es finalmente el elemento primordial que conduce al deterioro conductual.

En las crías expuestas a ROT *in útero* y la lactancia, y posteriormente tratadas en edad adulta a ROT observamos que se potenció el deterioro motor (figura 35 y 36), y disminuyeron muy por debajo de los niveles normales el número de neuronas dopaminérgicas TH-IR (figura 37 y 38) en la *sustancia nigra* y adicionalmente se encontró un gran número de neuronas marcadas con fluoro-jade C en la *sustancia nigra* de las crías de doce meses de edad (figura 37), lo que sugiere un proceso degenerativo, ya que este fluoroforo aniónico permite localizar con alta afinidad los cuerpos neuronales, dendritas y axones en proceso de degeneración.

Al comparar la capacidad motora de las crías expuesta a ROT en dos ocasiones con el grupo que fue tratado únicamente en la edad adulta, los datos sugieren un fenómeno de plasticidad neuronal, en estos últimos, que no ocurre en las crías expuestas en edades tempranas a la ROT, porque reducen el tiempo para ejecutar la prueba de capacidad motora a los 12 meses y en la viga más delgada (3 mm) este hallazgo se relaciona con las deficiencias motoras que se presenta en los individuos afectados por la enfermedad de Parkinson en quienes se observa la degeneración de hasta del 80% de las neuronas dopaminérgicas, mientras en las etapas tempranas de la enfermedad existe un fenómeno de

compensación o plasticidad en el cual las funciones de las neuronas que han degenerado se sustituye por otras, por ello la enfermedad de Parkinson es de progreso lento.

Se ha sugerido que los niños accidentalmente expuestos durante el desarrollo fetal a pesticidas tienen mayor riesgo de desarrollar trastorno de déficit de atención e hiperactividad (TDAH), sobre todo en casos donde la exposición es mediante alimentos tratados con pesticidas (Mehler-Wex y cols., 2006; Kuehn, 2010). El TDAH está estrechamente relacionado con desórdenes en el funcionamiento del sistema dopaminérgico, Warton y cols. (2009) sugirieron que los niños que lo padecen pueden tener alterada la liberación de dopamina en las terminales nigroestriatales. Nuestro estudio sugiere que la exposición a ROT por vía materna podría tener alguna relación con sus observaciones.

Adicionalmente, se ha documentado que la exposición a pesticidas entre los cuales se encuentra la ROT aumenta la incidencia de enfermedades neurodegenerativas como de Parkinson en los individuos expuestos (Dhillon y cols., 2008; Vanacore y cols., 2002; Wirdefeldt y cols., 2011).

En resumen, la ROT es capaz de inducir daño neuronal desde antes del nacimiento; los individuos expuestos durante su desarrollo podrían tener un número menor de neuronas dopaminérgicas desde etapas tempranas de la vida, lo que los haría más vulnerables a otros factores nocivos, aumentando el riesgo de desarrollar en edades tempranas trastornos en relacionados con disfunciones del sistema dopaminérgico como el TDAH, o alteraciones tardías como la enfermedad de Parkinson, sin descartar otros tipos de trastornos funcionales o psiquiátricos.

Durante la etapa fetal el cerebro es sensible a los daños que pueden ocasionarle diversos factores externos, durante este periodo la protección que la ofrece placenta es limitada, sobre todo contra aquellas sustancias que son altamente liposolubles como la ROT. Además, en los fetos la barrera hematoencefálica no se encuentra completamente desarrollada pues ésta termina su desarrollo después del nacimiento (Julvez y Grandjean, 2009), y debido a que el cerebro continúa su desarrollo durante la etapa postnatal, el periodo de vulnerabilidad se prolonga.

Barlow y cols. (2006) mostraron que la presencia de pesticidas durante el periodo prenatal y perinatal causa la reducción del número de neuronas dopaminérgicas e incrementa la susceptibilidad de estas neuronas a la degeneración por daños subsecuentes ocasionados por otros factores ambientales o por la edad (Heindel, 2005; Landrigan y cols. 2005; Richardson y cols. 2006). Nuestros resultados apoyan su hipótesis.

Se ha sugerido que los niños accidentalmente expuestos durante el desarrollo fetal a pesticidas tienen mayor riesgo de desarrollar trastorno de déficit de atención e hiperactividad (TDAH), sobre todo en casos donde la exposición es mediante alimentos tratados con pesticidas (Mehler-Wex y cols 2006; Kuehn, 2010). El TDAH está estrechamente relacionado con desordenes en el funcionamiento del sistema dopaminérgico, Warton sugiere que los niños que lo padecen pueden tener alterada la liberación de dopamina en las terminales nigroestriatales (Warton y cols. 2009) Nuestro estudio sugiere que la exposición a ROT por vía materna podría tener una relación causal con sus observaciones.

Adicionalmente, se ha documentado que la exposición a pesticidas entre los cuales se encuentra la ROT aumenta la incidencia de enfermedad de Parkinson en los individuos expuestos (Dhillon y cols. 2008; Vanacore y cols. 2002; Wirdefeldt y cols. 2011). Por otra parte, Whatley (1997) ha propuesto un mecanismo fisiopatológico indirecto para el desarrollo de esquizofrenia, derivado de que la ROT puede afectar la expresión de genes mitocondriales en las neuronas dopaminérgicas, y esto, a su vez, podría facilitar el desarrollo de dicha enfermedad. Más aún, entre los efectos de la ROT está la disminución de serotonina en el hipocampo, que facilita conductas relacionadas con la depresión, que también han sido exploradas en modelos animales (Santiago y cols. 2010).

En resumen, la ROT es capaz de inducir daño neuronal desde antes del nacimiento; los individuos expuestos durante su desarrollo podrían tener un número menor de neuronas dopaminérgicas desde etapas tempranas de la vida, lo que los haría más vulnerables a otros factores nocivos, aumentando el riesgo de desarrollar en edades tempranas trastornos en relacionados con disfunciones del sistema dopaminérgico como el TDAH, o alteraciones tardías como la enfermedad de Parkinson, sin descartar otros tipos de trastornos funcionales o psiquiátricos

Hasta donde sabemos, en México se conoce muy poco sobre la asociación entre xenobióticos ambientales y trastornos neurológicos en individuos expuestos durante etapas tempranas de la vida. Se supone que en México hay aproximadamente 1.5 millones de niños menores de 18 años que padecen de TDAH, y la mayoría no han sido diagnosticados. También existe la posibilidad de que un número importante de individuos se encuentre afectado debido a la exposición *in útero* a tóxicos ambientales⁽¹³⁾.

9 CONCLUSIONES

- La dosis mínima efectiva de ROT para inducir daño en las neuronas dopaminérgicas de las hembras (madres) es de 1.0 mg/kg por vía subcutánea.
- La exposición en la gestación y la lactancia a ROT alcanza al sistema dopaminérgico y reduce al 91% el número de neuronas TH-IR de la *sustancia nigra*; mientras que la exposición solo durante la gestación o la lactancia, las reducen en 79% y 49%, respectivamente, por lo que los daños inducidos por la ROT en el sistema dependen del periodo de exposición a ROT.
- La ROT produce un claro aumento de la concentración de α -sinucleína en el estriado y la *sustancia nigra* por la inhibición que la ROT induce sobre el sistema proteosómico de ubiquitina encargado de la degradación de proteínas.
- La exposición a ROT durante el desarrollo embrionario y la lactancia de las ratas produce deficiencias motoras.
- Existe una interacción causa-efecto entre la ROT y la edad de exposición

10 REFERENCIAS

1. Ahlbom J, Fredriksson A, Eriksson P. Exposure to an organophosphate (DFP) during a defined period in neonatal life induces permanent changes in brain muscarinic receptors and behaviour in adult mice. Brain Res. 1995;677(1):13-9
2. Alam M, Schmidt WJ. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. Behav Brain Res. 2002;136(1):317-24
3. Altman J, Bayer SA Development of the brain stem in the rat. V. Thymidine-radiographic study of the time of origin of neurons in the midbrain tegmentum. J Comp Neurol. 1981;198(4):677-716.
4. Andersen HR, Nielsen JB, Grandjean P. Toxicologic evidence of developmental neurotoxicity of environmental chemicals. Toxicology. 2000;144(1-3):121-7.
5. Auluck PK, Chan HY, Trojanowski JQ, Lee VM, Bonini NM. Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease. Science. 2002;295(5556):865-8.
6. Banks WA, Kastin AJ, Harrison LM, Zadina JE. Perinatal treatment of rats with opiates affects the development of the blood-brain barrier transport system PTS-1. Neurotoxicol Teratol. 1996;18(6):711-5.
7. Barlow BK, Cory-Slechta DA, Richfield EK, Thiruchelvam M. The gestational environment and Parkinson's disease: evidence for neurodevelopmental origins of a neurodegenerative disorder. Reprod Toxicol. 2007;23(3):457-70.
8. Barlow BK, Richfield EK, Cory-Slechta DA, Thiruchelvam M. A fetal risk factor for Parkinson's disease. Dev Neurosci. 2004;26(1):11-23.
9. Betarbet R, Sherer TB, Di Monte DA, Greenamyre JT. Mechanistic approaches to Parkinson's disease pathogenesis. Brain Pathol. 2002;12(4):499-510.
10. Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Animal models of Parkinson's disease. Bioessays. 2002;24(4):308-18.
11. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. Nat Neurosci. 2000;3(12):1301-6
12. Bonifati V, Rizzu P, Squitieri F, Krieger E, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, van Duijn CM, Oostra B, Meco G, Heutink P. DJ-1(PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. Neurol Sci. 2003;24(3):159-60.
13. Bové J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. NeuroRx. 2005;2(3):484-94
14. Brown TP, Rumsby PC, Capleton AC, Rushton L, Levy LS. Pesticides and Parkinson's disease- is there a link? Environ Health Perspect. 2006;114(2):156-64.
15. Bucciantini M, Giannoni E, Chiti F, Baroni F, Formigli L, Zurdo J, Taddei N, Ramponi G, Dobson CM, Stefani M. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. Nature. 2002;416(6880):507-11.
16. Caboni P, Sherer TB, Zhang N, Taylor G, Na HM, Greenamyre JT, Casida JE. Rotenone, deguelin, their metabolites, and the rat model of Parkinson's disease. Chem Res Toxicol. 2004;17(11):1540-8.
17. Calne DB, Langston JW. Aetiology of Parkinson's disease. Lancet. 1983;2(8365-66):1457-9.
18. Campbell, B.C., Li, Q.X., Culvenor, J.G., Jakala, P., Cappai, R., Beyreuther, K., Masters, C.L., McLean, C.A. Accumulation of insoluble alpha-synuclein in dementia with Lewy bodies. Neurobiol. Dis. 2000;7:192-200.
19. Cannon JR, Greenamyre JT. Neurotoxic in vivo models of Parkinson's disease recent advances. Prog Brain Res. 2010;184:17-33

20. Cannon JR, Tapias V, Na HM, Honick AS, Drolet RE, Greenamyre JT. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2009;34(2):279-90.
21. Carvey PM, Punati A, Newman MB. Progressive dopamine neuron loss in Parkinson's disease: the multiple hit hypothesis. *Cell Transplant.* 2006;15(3):239-50.
22. Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destée A. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet.* 2004;364(9440):1167-9.
23. Chen CK, Silverstein FS, Johnston MV. N-methyl-D-aspartate-mediated injury enhances quisqualic acid-stimulated phosphoinositide turnover in perinatal rats. *J Neurochem.* 1992;59(3):963-71.
24. Chesselet MF. Presynaptic regulation of dopamine release. Implications for the functional organization of the basal ganglia. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;604:17-22.
25. Chou AP, Li S, Fitzmaurice AG, Bronstein JM. Mechanisms of rotenone-induced proteasome inhibition. *Neurotoxicology.* 2010;31(4):367-72.
26. Cicchetti E, Drouin-Ouellet J, Gross RE. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30(9):475-83.
27. Conway KA, Harper JD, Lansbury PT Jr. Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry.* 2000;39(10):2552-63.
28. Conway KA, Rochet JC, Bieganski RM, Lansbury PT Jr. Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science.* 2001;294(5545):1346-9.
29. Corrigan FM, Wienburg CL, Shore RF, Daniel SE, Mann D. Organochlorine insecticides in substantia nigra in Parkinson's disease. *J Toxicol Environ Health A.* 2000;59(4):229-34.
30. Cory-Slechta DA, Thiruchelvam M, Barlow BK, Richfield EK. Developmental pesticide models of the Parkinson disease phenotype. *Environ Health Perspect.* 2005a;113(9):1263-70
31. Cory-Slechta DA, Thiruchelvam M, Richfield EK, Barlow BK, Brooks AI. Developmental pesticide exposures and the Parkinson's disease phenotype. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2005b;73(3):136-9.
32. Del Zompo M, Piccardi MP, Ruiu S, Corsini GU, Vaccari A. High-affinity binding of [3H]1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium ion to mouse striatal membranes: putative vesicular location. *Eur J Pharmacol.* 1991;202(2):293-4.
33. Delle Donne A, Klos KJ, Fujishiro H, Ahmed Z, Parisi JE, Josephs KA, Frigerio R, Burnett M, Wszolek ZK, Uitti RJ, Ahlskog JE, Dickson DW. Incidental Lewy body disease and preclinical Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2008;65(8):1074-80.
34. Dencker L, Eriksson P. Susceptibility in utero and upon neonatal exposure. *Food Addit Contam.* 1998;15 Suppl:37-43.
35. Deutch AY. Striatal plasticity in parkinsonism: dystrophic changes in medium spiny neurons and progression in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 2006;(70):67-70
36. Dexter DT, Nanayakkara I, Goss-Sampson MA, Muller DP, Harding AE, Marsden CD, Jenner P. Nigral dopaminergic cell loss in vitamin E deficient rats. *Neuroreport.* 1994;5(14):1773-6.
37. Dexter DT, Wells FR, Lees AJ, Agid F, Agid Y, Jenner P, Marsden CD. Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 1989;52(6):1830-6
38. Dhillon AS, Tarbutton GL, Levin JL, Plotkin GM, Lowry LK, Nalbone JT, Shepherd S. Pesticide/environmental exposures and Parkinson's disease in East Texas. *J Agromedicine.* 2008;13(1):37-48.
39. Di Fonzo A, Fabrizio E, Thomas A, Fincati E, Marconi R, Tinazzi M, Breedveld GJ, Simons EJ, Chien HF, Ferreira JJ, Horstink MW, Abbruzzese G, Borroni B, Cossu G, Dalla Libera A,

- Fabbrini G, Guidi M, De Mari M, Lopiano L, Martignoni E, Marini P, Onofrij M, Padovani A, Stocchi F, Toni V, Sampaio C, Barbosa ER, Mecco G; Italian Parkinson Genetics Network, Oostra BA, Bonifati V. GIGYF2 mutations are not a frequent cause of familial Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009;15(9):703-5.
40. Drucker-Colín R, García-Hernández F. A new motor test sensitive to aging and dopaminergic function. *J Neurosci Methods.* 1991;39(2):153-61.
 41. Eriksson P. Developmental neurotoxicity of environmental agents in the neonate. *Neurotoxicology.* 1997;18(3):719-26.
 42. Ershov PV, Ugrumov MV, Calas A, Krieger M, Thibault J. Degeneration of dopaminergic neurons triggers an expression of individual enzymes of dopamine synthesis in non-dopaminergic neurons of the arcuate nucleus in adult rats. *J Chem Neuroanat.* 2005;30(1):27-33.
 43. Eskenazi B, Rosas LG, Marks AR, Bradman A, Harley K, Holland N, Johnson C, Fenster L, Barr DB. Pesticide toxicity and the developing brain. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008 Feb;102(2):228-36.
 44. Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain.* 1991;114(Pt 5):2283-301.
 45. Feng LR, Maguire-Zeiss KA. Dopamine and paraquat enhance α -synuclein-induced alterations in membrane conductance. *Neurotox Res.* 2011;20(4):387-401.
 46. Feng Y, Liang ZH, Wang T, Qiao X, Liu HJ, Sun SG. alpha-Synuclein redistributed and aggregated in rotenone-induced Parkinson's disease rats. *Neurosci Bull.* 2006;22(5):288-93.
 47. Ferrante RJ, Schulz JB, Kowall NW, Beal MF. Systemic administration of rotenone produces selective damage in the striatum and globus pallidus, but not in the substantia nigra. *Brain Res.* 1997;753(1):157-62.
 48. Fleming SM, Zhu C, Fernagut PO, Mehta A, DiCarlo CD, Seaman RL, Chesselet MF. Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone. *Exp Neurol.* 2004;187(2):418-29.
 49. Floor E, Wetzel MG. 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.* 1998;70, 2682–2675.
 50. Frankle WG, Laruelle M, Haber SN. Prefrontal cortical projections to the midbrain in primates: evidence for a sparse connection. *Neuropsychopharmacology.* 2006;31(8):1627-36.
 51. Fricker-Gates RA, White A, Gates MA, Dunnett SB. Striatal neurons in striatal grafts are derived from both post-mitotic cells and dividing progenitors. *Eur J Neurosci.* 2004;19(3):513-20
 52. Fudge JL, Haber SN. The central nucleus of the amygdala projection to dopamine subpopulations in primates. *Neuroscience.* 2000;97(3):479-94.
 53. Fukushima T, Yamada K, Isobe A, Shiwaku K, Yamane Y. Mechanism of cytotoxicity of paraquat. I. NADH oxidation and paraquat radical formation via complex I. *Exp Toxicol Pathol.* 1993;45:345–349.
 54. Galvin JE, Lee VM, Baba M, Mann DM, Dickson DW, Yamaguchi H, Schmidt ML, Iwatsubo T, Trojanowski JQ. Monoclonal antibodies to purified cortical Lewy bodies recognize the mid-size neurofilament subunit. *Ann Neurol.* 1997;42(4):595-603.
 55. Galvin JE, Schuck TM, Lee VM, Trojanowski JQ. Differential expression and distribution of alpha-, beta-, and gamma-synuclein in the developing human substantia nigra. *Exp Neurol.* 2001;168(2):347-55
 56. Gasser T, Müller-Myhsok B, Wszolek ZK, Oehlmann R, Calne DB, Bonifati V, Bereznoi B, Fabrizio E, Vieregge P, Horstmann RD. A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet.* 1998;18(3):262-5

57. Gates MA, Torres EM, White A, Fricker-Gates RA, Dunnett SB. Re-examining the ontogeny of substantia nigra dopamine neurons. *Eur J Neurosci*. 2006;23(5):1384-90
58. Gaugler MN, Genc O, Bobela W, Mohanna S, Ardah MT, El-Agnaf OM, Cantoni M, Bensadoun JC, Schneggenburger R, Knott GW, Aebischer P, Schneider BL. Nigrostriatal overabundance of α -synuclein leads to decreased vesicle density and deficits in dopamine release that correlate with reduced motor activity. *Acta Neuropathol*. 2012;123(5):653-69
59. Giasson BI, Lee VM. Parkin and the molecular pathways of Parkinson's disease. *Neuron*. 2001;31(6):885-8
60. Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(7):492-501.
61. Goldberg MS, Lansbury PT. Jr. Is there a cause-and-effect relationship between α -synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nature Cell Biol*. 2002;2, E115-E119.
62. Goldey ES, O'Callaghan JP, Stanton ME, Barone S Jr, Crofton KM. Developmental neurotoxicity: evaluation of testing procedures with methylazoxymethanol and methylmercury. *Fundam Appl Toxicol*. 1994;23(3):447-64.
63. Gómez-Chavarín M, Díaz-Pérez R, Morales-Espinosa R, Fernández-Ruiz J, Roldán-Roldán G, Torner C. 2012 Efecto de la exposición al pesticida rotenona sobre el desarrollo del sistema dopaminérgico nigro-estriatal en ratas. *Salud Mental*. 2012; 35(6):XX-XX.
64. Gosavi N, Lee HJ, Lee JS, Patel S, Lee SJ. Golgi fragmentation occurs in the cells with prefibrillar alpha-synuclein aggregates and precedes the formation of fibrillar inclusion. *J Biol Chem*. 2002;277(50):48984-92.
65. Graham DG Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol*. 1978;14(4):633-43.
66. Grandjean P, Landrigan PJ. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet*. 2006 Dec 16;368(9553):2167-78
67. Grandjean P, Lyngbye T, Hansen ON. Lessons from a Danish study on neuropsychological impairment related to lead exposure. *Environ Health Perspect*. 1991;94:111-5.
68. Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, Murata K, Sørensen N, Dahl R, Jørgensen PJ. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol*. 1997 ;19(6):417-28.
69. Greene JG, Noorian AR, Srinivasan S. Delayed gastric emptying and enteric nervous system dysfunction in the rotenone model of Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2009;218(1):154-61.
70. Gupta A, Agarwal R, Shukla GS. Functional impairment of blood-brain barrier following pesticide exposure during early development in rats. *Hum Exp Toxicol*. 1999;18(3):174-9.
71. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*. 1992;59:1609-1623.
72. Hanaway J, McConnell JA, Netsky MG. Cytoarchitecture of the substantia nigra in the rat. *Am J Anat*. 1970;129(4):417-37.
73. Heikkila RE, Nicklas WJ, Vyas I, Duvoisin RC. Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *Neurosci Lett*. 1985;62(3):389-94.
74. Heindel JJ. The fetal basis of adult disease: Role of environmental exposures--introduction. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005; 73(3):131-2.
75. Hirsch EC. Iron transport in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2009;15 Suppl 3:S209-11
76. Hurtig, HI. et al. α -Synuclein cortical Lewy bodies correlate with dementia in Parkinson's disease. *Neurology*. 2000;54, 1916-1921.

77. Ibáñez P, Bonnet AM, Débarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, Agid Y, Dürr A, Brice A Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. Lancet. 2004;364(9440):1169-71.
78. Li K, Ito H, Tanaka K, Hirano A. Immunocytochemical co-localization of the proteasome in ubiquitinated structures in neurodegenerative diseases and the elderly. J Neuropathol Exp Neurol. 1997;56(2):125-31.
79. Inden M, Kitamura Y, Takeuchi H, Yanagida T, Takata K, Kobayashi Y, Taniguchi T, Yoshimoto K, Kaneko M, Okuma Y, Taira T, Ariga H, Shimohama S. Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone. J Neurochem. 2007;101(6):1491-1504.
80. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. En: XII Censo General de Población y Vivienda, México 2000. Disponible en: www.inegi.gob.mx.
81. Jakowec MW, Donaldson DM, Barba J, Petzinger GM. Postnatal expression of alpha-synuclein protein in the rodent substantia nigra and striatum. Dev Neurosci. 2001;23(2):91-9.
82. Jenner P. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. Mov Disord. 1998;13 Suppl 1:24-34.
83. Jones SR, Gainetdinov RR, Wightman RM, Caron MG. Mechanisms of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter. J Neurosci. 1998;18(6):1979-86.
84. Julvez J, Grandjean P. Neurodevelopmental toxicity risks due to occupational exposure to industrial chemicals during pregnancy. Ind Health. 2009;47(5):459-68
85. Julvez J, Grandjean P. Neurodevelopmental toxicity risks due to occupational exposure to industrial chemicals during pregnancy. Ind Health 2009;47(5):459-68.
86. Kanthasamy AG, Kitazawa M, Kanthasamy A, Anantharam V. Dieldrin-induced neurotoxicity: relevance to Parkinson's disease pathogenesis. Neurotoxicology. 2005;26(4):701-19
87. Keeney PM, Xie J, Capaldi RA, Bennett JP Jr. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. J Neurosci. 2006;26(19):5256-64
88. Keeney PM, Xie J, Capaldi RA, Bennett JP Jr. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. J Neurosci. 2006;26(19):5256-64
89. Kentroti S. Neuronal plasticity in development: lessons from ethanol neurotoxicity during embryogenesis. Adv Exp Med Biol. 1997;429:19-37.
90. Khera KS, Whalen C, Angers G. Teratogenicity study on pyrethrum and rotenone (natural origin) and ronnel in pregnant rats. J Toxicol Environ Health. 1982;10(1):111-9
91. Kilbourn MR, Charalambous A, Frey KA, Sherman P, Higgins DS Jr, Greenamyre JT. Intrastratial neurotoxin injections reduce in vitro and in vivo binding of radiolabeled rotenoids to mitochondrial I. J Cereb Blood Flow Metab. 1997;17(3):265-72.
92. Kim CS, Binienda Z, Sandberg JA. Construction of a physiologically based pharmacokinetic model for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dosimetry in the developing rabbit brain. Toxicol Appl Pharmacol. 1996 ;136(2):250-9
93. Kimbrough, R.D., Mahaffey, K.R., Grandjean, P., Sandoe, S.H., Rustein, D.R., 1989. Clinical Effects of Environmental Chemicals, A Guide to Etiologic Diagnosis. Hemisphere, New York.
94. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. Nature. 1998;392(6676):605-8
95. Kitai ST, Shepard PD, Callaway JC, Scroggs R. Afferent modulation of dopamine neuron firing patterns. Curr Opin Neurobiol. 1999;9(6):690-7.
96. Kodavanti PR, Tilson HA Structure-activity relationships of potentially neurotoxic PCB congeners in the rat. Neurotoxicology. 1997;18(2):425-41.

97. Krueger MJ, Singer TP, Casida JE, Ramsay RR. Evidence that the blockade of mitochondrial respiration by the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) involves binding at the same site as the respiratory inhibitor, rotenone. Biochem Biophys Res Commun. 1990;169(1):123-8
98. Krüger R, Kuhn W, Müller T, Voitalla D, Graeber M, Kösel S, Przuntek H, Epplen JT, Schöls L, Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease. Nature Genet. 1998;18,106–108.
99. Krukoff BA y Smith AC.. Rotenone-yielding plants. Am J of Botany 1937;24(9):573-587.
100. Kuehn BM.Increased risk of ADHD associated with early exposure to pesticides, PCBs. JAMA. 2010;304(1):27-8.
101. Kuzuhara S, Mori H, Izumiyama N, Yoshimura M, Ihara Y. Lewy bodies are ubiquitinated. A light and electron microscopic immunocytochemical study. Acta Neuropathol. 1988;75(4):345-53.
102. Landrigan PJ, Sonawane B, Butler RN, Trasande L, Callan R, Droller D. Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. Environ Health Perspect. 2005;113(9):1230-3.
103. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. Science. 1983;219(4587):979-80
104. Langston JW, Forno LS, Tetrud J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. Ann Neurol. 1999;46(4):598-605
105. Lapointe N, St-Hilaire M, Martinoli MG, Blanchet J, Gould P, Rouillard C, Cicchetti F. Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity. FASEB J. 2004;18(6):717-9.
106. Lashuel HA, Petre BM, Wall J, Simon M, Nowak RJ, Walz T, Lansbury PT Jr. Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. J Mol Biol. 2002;322(5):1089-102.
107. Lauder JM, Bloom FE. Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, Raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. J Comp Neurol. 1974;155(4):469-81.
108. Lautier C, Goldwurm S, Dürr A, Giovannone B, Tsiaras WG, Pezzoli G, Brice A, Smith RJ.Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease. Am J Hum Genet. 2008;82(4):822-33.
109. Lee HJ, Lee SJ. Characterization of cytoplasmic α -synuclein aggregates: fibril formation is tightly linked to the inclusion forming process in cells. J Biol Chem. 2002;277(50):48976-83
110. Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. Nature. 1998;395(6701):451-2.
111. Levin AA, Miller RK.Dept. of Pharmacology & Toxicology, University of Rochester, School of Medicine and Dentistry, New York. Teratology. 1980;22(1):1-5.
112. Li JY, Henning Jensen P, Dahlström A. Differential localization of alpha-, beta- and gamma-synucleins in the rat CNS. Neuroscience. 2002;113(2):463-78.
113. Li YH, Gao N, Ye YW, Li X, Yu S, Yang H, Uéda K, Chan P. Alpha-synuclein functions as a negative regulator for expression of tyrosine hydroxylase. Acta Neurol Belg. 2011;111(2):130-5.
114. Li YJ, Deng J, Mayhew GM, Grimsley JW, Huo X, Vance JM. Investigation of the PARK10 gene in Parkinson disease. Ann Hum Genet. 2007 ;71(Pt 5):639-47.
115. Lindvall O, Björklund A. Anatomy of the dopaminergic neuron systems in the rat brain. Adv Biochem Psychopharmacol. 1978;19:1-23.

116. Ling Z, Chang QA, Tong CW, Leurgans SE, Lipton JW, Carvey PM. Rotenone potentiates dopamine neuron loss in animals exposed to lipopolysaccharide prenatally. *Exp Neurol*. 2004;190(2):373-83.
117. Ling Z, Gayle DA, Ma SY, Lipton JW, Tong CW, Hong JS, Carvey PM. In utero bacterial endotoxin exposure causes loss of tyrosine hydroxylase neurons in the postnatal rat midbrain. *Mov Disord*. 2002;17(1):116-24.
118. Ling ZD, Chang Q, Lipton JW, Tong CW, Landers TM, Carvey PM. Combined toxicity of prenatal bacterial endotoxin exposure and postnatal 6-hydroxydopamine in the adult rat midbrain. *Neuroscience*. 2004;124(3):619-28.
119. Liou HH, Chen RC, Tsai YF, Chen WP, Chang YC, Tsai MC. Effects of paraquat on the substantia nigra of the wistar rats: neurochemical, histological, and behavioral studies. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996;137(1):34-41.
120. Lloyd SA, Faherty CJ, Smeyne RJ Adult and in utero exposure to cocaine alters sensitivity to the Parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neuroscience*. 2006;137(3):905-13.
121. Luo C, Rajput AH, Akhtar S, Rajput A. Alpha-synuclein and tyrosine hydroxylase expression in acute rotenone toxicity. *Int J Mol Med*. 2007 Mar;19(3):517-21
122. Maker HS, Weiss C, Silides DJ, Cohen G. Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates. *J Neurochem*. 1981;36(2):589-93.
123. Marttila RJ, Lorentz H, Rinne UK Oxygen toxicity protecting enzymes in Parkinson's disease. Increase of superoxide dismutase-like activity in the substantia nigra and basal nucleus. *J Neurol Sci*. 1988;86(2-3):321-31.
124. McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, Di Monte DA. Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis*. 2002;10(2):119-27.
125. McNaught KS, Jenner P. Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2001 Jan 19;297(3):191-4.
126. Mehler-Wex C, Riederer P, Gerlach M. Dopaminergic dysbalance in distinct basal ganglia neurocircuits: implications for the pathophysiology of Parkinson's disease, schizophrenia and attention deficit hyperactivity disorder. *Neurotox Res*. 2006;10(3-4):167-79
127. Monti B, Gatta V, Piretti F, Raffaelli SS, Virgili M, Contestabile A. Valproic acid is a neuroprotective in the rotenone rat model of Parkinson's disease: involvement of alpha-synuclein. *Neurotox Res*. 2010 Feb;17(2):130-41. Epub 2009 Jul 21.
128. Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Rudolph A, Shults C, Conneally PM, Foroud T; Parkinson Study Group. Genome screen to identify susceptibility genes for Parkinson disease in a sample without parkin mutations. *Am J Hum Genet*. 2002;71(1):124-35.
129. Paxinos G, Watson Ch. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego Academic Press; 1997.
130. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997;276, 2045-2047.
131. Przedborskin S, Jackson-Lewis V. Mechanisms of MPTP toxicity. *Mov Disord*. 1998;13 (Suppl. 1), 35-38.

132. Richardson JR, Caudle WM, Wang M, Dean ED, Pennell KD, Miller GW. Developmental exposure to the pesticide dieldrin alters the dopamine system and increases neurotoxicity in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J.* 2006;20(10):1695-7.
133. Ritz B, Yu F. Parkinson's disease mortality and pesticide exposure in California 1984-1994. *Int J Epidemiol.* 2000;29(2):323-9.
134. Rodier PM. Chronology of neuron development: animal studies and their clinical implications. *Dev Med Child Neurol.* 1980;22(4):525-45
135. Rodier PM. Developing brain as a target of toxicity. *Environ Health Perspect.* 1995;103 Suppl 6:73-6.
136. Ross OA, Soto AI, Vilariño-Güell C, Heckman MG, Diehl NN, Hulihan MM, Aasly JO, Sando S, Gibson JM, Lynch T, Krygowska-Wajs A, Opala G, Barcikowska M, Czyzewski K, Uitti RJ, Wszolek ZK, Farrer MJ. Genetic variation of Omi/HtrA2 and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2008;14(7):539-43.
137. Saggiu H. et al. A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in parkinsonian substantia nigra. *J Neurochem.* 1989;53, 692-697.
138. Salama, A.K., Bakry, N.M., Abou-Donia, M.B. A review article on placental transfer of pesticides. *J. Occup. Med. Toxicol.*, 1993;2, 383-397.
139. Salazar J, Mena N, Hunot S, Prigent A, Alvarez-Fischer D, Arredondo M, Duyckaerts C, Sazdovitch V, Zhao L, Garrick LM, Nuñez MT, Garrick MD, Raisman-Vozari R, Hirsch EC.
140. Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(47):18578-83.
141. Santiago RM, Barbeiro J, Lima MM, Dombrowski PA, Andreatini R, Vital MA. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010;34(6): 1104-14.
142. Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo M, Kawaguchi T, Tsunoda T, Watanabe M, Takeda A, Tomiyama H, Nakashima K, Hasegawa K, Obata F, Yoshikawa T, Kawakami H, Sakoda S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Nakamura Y, Toda T. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet.* 2009;41(12):1303-7.
143. Schmidt CJ, Ritter JK, Sonsalla PK, Hanson GR, Gibb JW. Role of dopamine in the neurotoxic effects of methamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1985;233(3):539-44.
144. Schmued LC, Albertson C, Slikker W Jr. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* 1997;751(1):37-46
145. Schul JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem.* 2000;267, 4904-4911.
146. Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, Greenamyre JT. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol.* 2003;179(1):9-16
147. Shojae S, Sina F, Banihosseini SS, Kazemi MH, Kalhor R, Shahidi GA, Fakhrai-Rad H, Ronaghi M, Elahi E. Genome-wide linkage analysis of a Parkinsonian-pyramidal syndrome *Am J Hum Genet.* 2008;82(6):1375-84.
148. Shtilerman MD, Ding TT, Lansbury PT Jr. Molecular crowding accelerates fibrillization of alpha-synuclein: could an increase in the cytoplasmic protein concentration induce Parkinson's disease? *Biochemistry.* 2002;41(12):3855-60
149. Sinclair SR, Fawcett JW, Dunnett SB. Dopamine cells in nigral grafts differentiate prior to implantation. *Eur J Neurosci.* 1999;11(12):4341-8.
150. Singer TP, Ramsay RR. The reaction sites of rotenone and ubiquinone with mitochondrial NADH dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta.* 1994 Aug 30;1187(2):198-202
151. Slikker W Jr. Principles of developmental neurotoxicology. *Neurotoxicology.* 1994;15(1):11-6.

152. Slikker, W., Miller, R.K., 1994. Placental metabolism and transfer: role in developmental toxicology. In: Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J. (Eds.), *Developmental Toxicology*, 2nd edn. Raven Press, New York, pp. 245–283.
153. Smith Y, Villalba RM, Raju DV. Striatal spine plasticity in Parkinson's disease: pathological or not? *Parkinsonism Relat Disord*. 2009 Dec;15 Suppl 3:S156-61.
154. Sofic E, Riederer P, Heinsen H, Beckmann H, Reynolds GP, Hebenstreit G, Youdim MB. Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *J Neural Transm*. 1988;74(3):199-205.
155. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*. 1996 Jul 5;273(5271):59-63.
156. Sonsalla PK, Jochnowitz ND, Zeevalk GD, Oostveen JA, Hall ED. Treatment of mice with methamphetamine produces cell loss in the substantia nigra. *Brain Res*. 1996;738(1):172-5.
157. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997 ;388(6645):839-40.
158. Stanton ME, Spear LP. Workshop on the qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity, Work Group I report: comparability of measures of developmental neurotoxicity in humans and laboratory animals. *Neurotoxicol Teratol*. 1990;12(3):261-7.
159. Strauss KM, Martins LM, Plun-Favreau H, Marx FP, Kautzmann S, Berg D, Gasser T, Wszolek Z, Müller T, Bornemann A, Wolburg H, Downward J, Riess O, Schulz JB, Krüger R. Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*.;14(15):2099-111.
160. Sulzer D, Chen TK, Lau YY, Kristensen H, Rayport S, Ewing A. Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. *J Neurosci*. 1995;15(5 Pt 2):4102-8.
161. Tepper JM, Bolam JP Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiol*. 2004;14(6):685-92.
162. Thiffault C, Langston JW, Di Monte DA Increased striatal dopamine turnover following acute administration of rotenone to mice. *Brain Res*. 2000;885(2):283-8.
163. Thiruchelvam M, Richfield EK, Baggs RB, Tank AW, Cory-Slechta DA. The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease. *J Neurosci*. 2000;20(24):9207-14.
164. Tilson HA, Kodavanti PR, Mundy WR, Bushnell PJ. Neurotoxicity of environmental chemicals and their mechanism of action. *Toxicol Lett*. 1998;102-103:631-5
165. Tompkins MM, Hill WD. Contribution of somal Lewy bodies to neuronal death. *Brain Res*. 1997 ;775(1-2):24-9.
166. Tuntland T, Odinecs A, Pereira CM, Nosbisch C, Unadkat JD. In vitro models to predict the in vivo mechanism, rate, and extent of placental transfer of dideoxynucleoside drugs against human immunodeficiency virus. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;180(1 Pt 1):198-206
167. Ugrumov MV, Melnikova VI, Lavrentyeva AV, Kudrin VS, Rayevsky KS. Dopamine synthesis by non-dopaminergic neurons expressing individual complementary enzymes of the dopamine synthetic pathway in the arcuate nucleus of fetal rats. *Neuroscience*. 2004;124(3):629-35.
168. Uversky VN. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell Tissue Res*. 2004;318(1):225-41.
169. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, González-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood

- NW. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. Science. 2004;304(5674):1158-60.
170. Vanacore N, Nappo A, Gentile M, Brustolin A, Palange S, Liberati A, Di Rezze S, Caldora G, Gasparini M, Benedetti F, Bonifati V, Forastiere F, Quercia A, Mecocci G. Evaluation of risk of Parkinson's disease in a cohort of licensed pesticide users. Neurol Sci. 2002;23 Suppl 2:S119-20
 171. Villalba RM, Smith Y. Striatal spine plasticity in Parkinson's disease. Front Neuroanat. 2010 Dec 10;4:133.
 172. Volles MJ, Lansbury PT Jr. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. Biochemistry. 2002;41(14):4595-602.
 173. Volles MJ, Lee SJ, Rochet JC, Shtilerman MD, Ding TT, Kessler JC, Lansbury PT Jr. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. Biochemistry. 2001;40:7812-7819.
 174. Voorn P, Kalsbeek A, Jorritsma-Byham B, Groenewegen HJ. The pre- and postnatal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat. Neuroscience. 1988;25(3):857-87.
 175. Vorhees CV. Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. Drug Chem Toxicol. 1997;20(4):387-99.
 176. Wakabayashi K, Tanji K, Mori F, Takahashi H. The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. Neuropathology. 2007;27(5):494-506.
 177. Whatley SA, Curti D, Marchbanks RM. Mitochondrial involvement in schizophrenia and other functional psychoses. Neurochem Res 1996;21(9):995-1004
 178. Warton FL, Howells FM, Russell VA. Increased glutamate-stimulated release of dopamine in substantia nigra of a rat model for attention-deficit/hyperactivity disorder--lack of effect of methylphenidate. Metab Brain Dis. 2009;24(4):599-613
 179. Watanabe T, Matsuhashi K, Takayama S. Placental and blood-brain barrier transfer following prenatal and postnatal exposures to neuroactive drugs: relationship with partition coefficient and behavioral teratogenesis. Toxicol Appl Pharmacol. 1990;105(1):66-77.
 180. Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. Eur J Epidemiol. 2011;26 Suppl 1:S1-58.
 181. Zheng G, Dwoskin LP, Crooks PA. Vesicular monoamine transporter 2: role as a novel target for drug development. AAPS J. 2006;8(4):E682-92.
 182. Zhong SC, Luo X, Chen XS, Cai QY, Liu J, Chen XH, Yao ZX. Expression and subcellular location of alpha-synuclein during mouse-embryonic development. Cell Mol Neurobiol. 2010 Apr;30(3):469-82.
 183. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, Stoessl AJ, Pfeiffer RF, Patenge N, Carbajal IC, Vieregge P, Asmus F, Müller-Miyahara B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZK, Gasser T. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. Neuron. 2004;44(4):601-7.

11 PUBLICACIONES

Mecanismos fisiopatológicos involucrados en la enfermedad de Parkinson

Margarita Gómez-Chavarín^{1,5}, G. Roldan-Roldan¹, R. Morales-Espinosa², G. Pérez-Soto³,
C. Torner-Agullar^{4,5}

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson es una condición neurológica devastadora que afecta a millones de persona en el mundo; su característica fisiopatológica es la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo. Se han buscado las causas posibles de ésta enfermedad y se ha encontrado una diversidad que incluye mutaciones genéticas y toxinas ambientales, pero la causa precisa que conduce a la muerte neuronal aún se desconoce. En la actualidad se han caracterizado algunos mecanismos patogénicos que son básicos para la degeneración de las células dopaminérgicas. Principalmente, la deficiencia en el almacenamiento de la dopamina en las vesículas sinápticas deriva en la generación en el citoplasma de radicales libres y especies reactivas del oxígeno, lo que parece ser el punto de inicio en el proceso de la muerte de estas neuronas, lo que eventualmente progresará a enfermedad de Parkinson. Esto parece ser la vía fisiopatológica común que subyace tanto a las formas genéticas como esporádicas de esta enfermedad.

Palabras claves: enfermedad de Parkinson, dopamina, estrés oxidativo, α -sinucleína, sistema proteosómico de ubiquitina.

Physiopathological mechanisms of Parkinson's disease

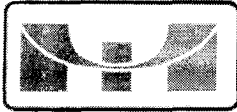
ABSTRACT

Parkinson's disease is a progressive neurological condition that affects millions of people in the world. Its pathophysiological feature is the loss of the dopaminergic neurons in the midbrain. The possible causes of this disease are diverse and that includes genetic mutations and environmental toxins, but the exact cause leading to the neuronal death remains unknown. Some pathogenic mechanisms that are basic to the degeneration of the dopaminergic cells has been characterized, and the evidence is presented and discussed in this work. Briefly, the deficiency in the dopamine storing into the synaptic vesicles leads to its uncontrolled metabolism, generating free radicals and reactive oxygen species in the cytoplasm. This seems to be the kick off of the processes for annihilating these neurons, and eventually progressing to a Parkinson's disease. This seems to be the common pathophysiological pathway underlining both, the genetic and the sporadic forms of the disease.

Key words: Parkinson's disease, dopamine, oxidative stress, α -synuclein, ubiquitina proteasome system.

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno crónico y progresivo, que se manifiesta por una combinación variable de temblor, rigidez, bradicinesia y una alteración característica de la marcha y postura¹. La característica patológica de esta enfermedad es la pérdida pronunciada de neuronas productoras de dopamina que se

localizan en la *substancia nigra pars compacta* (SNpc); estas células normalmente liberan dopamina en sus terminales axónicas en el cuerpo estriado y forman parte del sistema extrapiramidal de regulación motora, por lo mismo, su pérdida se traduce en los trastornos del movimiento antes descritos.



**INSTITUTO NACIONAL
DE PSIQUIATRÍA
RAMON DE LA FUENTE**

salud mental

Ref. DEDPC-226-12

Dr. Carlos A. Torner Aguilar
Margarita Gómez Chavarín
Rosalinda Díaz-Pérez
Rosario Morales-Espinosa
Juan Fernández-Ruiz
Gabriel Roidán-Roidán
Presentes

Mayo 14 de 2012

Distinguidos autores

Por medio de la presente les comunico que la tercera versión de su artículo: "EFECTO DE LA EXPOSICION AL PESTICIDA ROTENONA SOBRE EL DESARROLLO DEL SISTEMA DOPAMINERGICO NIGRO-ESTRIATAL EN RATAS", ha sido aceptada por el Comité Editorial y aparecerá publicado en SALUD MENTAL, a partir del vol. 35, no. 6, noviembre-diciembre de 2012.

Atentamente

Dr. Héctor Pérez-Rincón
Director-Editor

HP-R/ech

EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN AL PESTICIDA ROTENONA SOBRE EL
DESARROLLO DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO NIGRO-ESTRIATAL EN RATAS

DEVELOPMENTAL EFFECTS OF ROTENONE EXPOSURE ON THE RAT NIGRO-
STRIATAL DOPAMINERGIC SYSTEM

Gómez-Chavarín M^{a,b}, Díaz-Pérez R^b, Morales-Espinosa R^b,
Fernández-Ruiz J^b, Roldán-Roldán G^b, Torner C^a.

^aDivisión de Ciencias Biológicas y de la Salud. Doctorado en
Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma Metropolitana, México.

^bFacultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México,
México.

Autor de correspondencia:

Carlos A. Torner Aguilar

División Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana -Xochimilco

Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán,

04960, D.F. México

Tel. 5483 7000 ext. 3260

Fax: 5483 7200

e-mail: ctorner@correo.uam.xoc.mx

Elsevier Editorial System(tm) for Toxicology Letters
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: ROTENONE EXPOSURE DURING GESTATION AND NURSING REDUCES DOPAMINERGIC NEURONS AND INCREASES α -SYNUCLEIN CONTENT IN THE NIGRO-STRIATAL PATHWAY OF THE RAT

Article Type: Research Paper

Keywords: Rotenone; substantia nigra; striatum; tyrosine hydroxylase; α -synuclein; dopaminergic neurons.

Corresponding Author: Dr. Carlos Torner, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidad Autonoma Metropolitana

First Author: Margarita Gómez-Chavarin, M.Sc.

Order of Authors: Margarita Gómez-Chavarin, M.Sc.; Rosalinda Díaz-Perez, M.Sc.; Juan Fernandez-Ruiz, Ph.D.; Gabriel Roldan-Roldan, Ph.D.; Carlos Torner, Ph.D.

Abstract: Adult rats exposed to the pesticide rotenone showed neuronal degeneration and deposits of α -synuclein in the substantia nigra. However, it has not been determined whether pre- and post-natal exposure to rotenone through the dams may elicit deleterious effects on the dopaminergic neurons of their offspring. Rotenone (1 mg/kg/day) was injected subcutaneously to dams during pregnancy and nursing. Half of the litters from the rotenone-treated dams were switched at birth with half from the control dams in order to have rotenone-exposed pups only during pregnancy, nursing, or both stages. The number of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the substantia nigra as well as α -synuclein content in the substantia nigra and striatum from the dams and their offspring were measured.

Rotenone induced a significant decrease of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and increased α -synuclein concentration in the dams and in their pups, indicating that this pesticide reached the offspring through the placenta and the maternal milk. However, the damage produced by rotenone differed depending on the maturational stage, being more severe when the offspring were exposed during gestation than nursing, suggesting that this pesticide is more harmful during *in-utero* nervous system development.