UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
COORDINACIÓN GENERAL ACADÉMICA
Coordinación de Bibliotecas
Biblioteca Digital

La presente tesis es publicada a texto completo en virtud de que el autor ha dado su autorización por escrito para la incorporación del documento a la Biblioteca Digital y al Repositorio Institucional de la Universidad de Guadalajara, esto sin sufrir menoscabo sobre sus derechos como autor de la obra y los usos que posteriormente quiera darle a la misma.

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO CIENCIAS DE LA SALUD

DOCTORADO EN FARMACOLOGÍA

TESIS PARA OBTENER GRADO DE

DOCTORADO

“EFECTO DEL BETA-CARIOFILENO EN LA ACTIVACIÓN DE ASTROCITOS Y MICROGLÍA, POR LA VÍA P38 MAPK, EN UN MODELO MURINO DE INDUCCIÓN DE PARKINSONISMO”

M EN C: RICARDO ALONSO LLAMAS VELÁZQUEZ

GUADALAJARA, JALISCO. JUNIO 2016

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD
DOCTORADO EN FARMACOLOGÍA

TESIS PARA OBTENER GRADO DE DOCTORADO

“EFECTO DEL BETA-CARIOFILENO EN LA ACTIVACIÓN DE ASTROCITOS Y MICROGLÍA, POR LA VÍA P38 MAPK, EN UN MODELO MURINO DE INDUCCIÓN DE PARKINSONISMO”

M. EN C: RICARDO ALONSO LLAMAS VELÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. EN C. MARIO EDUARDO FLORES SOTO

CO-DIRECTORES DE TESIS:
DRA. EN C. VERONICA CHAPARRO HUERTA
DR. EN C. GENARO GABRIEL ORTIZ

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres Guillermo Llamas y Maria Luisa Rodriguez, A mis asesores, Dr. **Mario Eduardo Flores Soto**, la Dra**. Veronica Chaparro Huerta** y Dr. **Genaro Gabriel Ortiz**, por su apoyo, paciencia y dedicación al dirigirme en este proyecto de tesis y formarme como investigador, a el Dr. **Jaime Federico Andrade Villanueva,** por su apoyo para la estancia de investigación realizada para esta tesis.

A los becarios de CUCEI, Denise, Aldo, Alex, Eduardo, Ines y Dr. Juan Viveros por hacerme parte de su equipo de trabajo y el apoyo brindado durante estos meses de formación.

Al Dr. Dario Acuña Castro-Viejo, la Dra. Germaine Escames, Dra, Iryna Rusanova, Elena, Guaiki, Santos, Bea, sergío y todos los amigos de CIBM, gracias por sus consejos, sabiduria y apoyo durante la estancia realizada en su institución.

A mis compañeros del doctorado por estos cuatro años grandiosos a su lado, en especial a mis amigos en orden alfabetico: Angélica Sánchez, Fabiola Vaca, Fabiola Medina, Juan Toscano, Karina Pérez y Marisol Cortés y mi coordiandora de posgrado Dra. en C. Ana Rosa Rincón por su apoyo a lo largo de esta travesia que parecía inalcanzable, sin ustedes el doctorado no hubiera sido lo mismo, voy a extrañar ser compañeros pero se que la amistad seguira indefinidamente, se quedan en mi corazón para siempre, mi cuarteto fantástico y mi miga, juanito y tus bromas.

A las **Instituciones Públicas**, las cuales abrieron sus puertas para acogerme y nuevamente proporcionarme las herramientas necesarias para forjarme un nuevo destino como Doctor en Ciencias, **UDG, CONACyT y CIBO-IMSS, UGR y CIBM.**

A todas las personas que directa o indirectamente colaboraron en la realización de este proyecto ya que sin su magnífica ayuda, jamás podríamos concretado con éxito esta investigación.

A mi Tia **Petra Velázquez Rodriguez** por apoyarme toda mi vida incondicionalmente, enseñarme a no rendirme y siempre ir por mas, y lo mas importante de todo. por enseñarme que tengo “Como límite el Cielo”.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

6OHDA: 6-hidroxidopamina
ADN: Acido desoxiribonucléico
ARN: Acido Ribonucléico
ATP: Adenosin Trifosfato
BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés brain-derived neurotrophic factor)
BHE: Barrera Hemato-Encefalica
CE: Cuerpo Estriado
EP: Enfermedad de Parkinson
ERK1/2: Cinasa regulada por señal extracelular (del inglés extracellular signal regulated kinases)
FAAH: Hidrolasa Amida de Ácidos Grasos (del inglés fatty acid amide hydrolase)
GB: Ganglios Basales
GDNF: factor neurotrófico derivado de una línea celular glíal (del inglés Glialcell line-Derived Neurotrophic Factor
GFAP: proteína glíal fibrilar acídica (del inglés Glial Fibrillary Acidic Protein)
GPe: Globo Pálido parte externa
GPi: Globo Pálido parte interna
Iba-1: Molécula de unión adaptadora 1 (del inglés Ionized calcium-Binding Adapter molecule-1)
IL-1β: Interleucina 1 beta
MHCI y MHCII: complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I y II
MIP-2: Proteína inflamatoria de macrófagos (del inglés Macrophage Inflammatory Proteins)
MPTP: 1-metil-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (del inglés 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)
ON: Óxido Nítrico
NST: Núcleo Sub-Talámico
OEA: Oleiletanolamida
p38 MAPK: Vía de las cinasas MAP de sobrevida de la celular
PEA :Palmitoiletanolamida
PPAR: Proliferadores de Peroxisomas (del inglés Peroxisome Proliferator-Activated Receptors)
RCB1: Receptores Cannabinoides tipo 1
RCB2: Receptores Cannabinoides tipo 2
SN: *Sustancia Nigra*
SNC: Sistema Nervioso Central
SNpc: Substancia Nigra Pars Compacta
THC: Δ9-tetrahidrocannabinol
TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés Tumor Necrosis Factor)
TRPV1: Receptor vanilloide tipo 1 (del inglés Transient Receptor Potential Vanilloid1)
WIN55,212-2: Farmaco agonista del receptor cannabinoide Tipo 1
β-Cariofileno: beta-cariofileno, molécula farmacologica

ÍNDICE

Resumen 1
INTRODUCCIÓN 2
MARCO TEORICO 3
1. Enfermedad de Parkinson (EP) 3
2. Epidemiología 3
3. Fisiopatología de la Enfermedad de Parkinson 4
4. Inflamación en el Sistema Nervioso Central (SNC) 7
   a. Microglia 8
      Los estadios de activación morfológica de la microglia 11
   b. Astrocitos 12
   c. Vía p38 de mediación inflamatoria. 14
6. Modelos Animales 22
   a. 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) 23
   b. 6-hidroxidopamina (6OHDA) 26
7. Tratamiento 27
   a) Eficacia neuroprotectora de los cannabinoides en la EP 28
   b) Beta-cariofileno 31
Caracteristicas físico-químicas 33
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 34
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN 35
HIPÓTESIS 35
MATERIAL Y MÉTODOS 36
Tipo de estudio: 36
Población a estudiar: 36
Tamaño de Muestra 37
Grupos de estudio 37
VARIABLES 39
   Variables Independientes: 39
   Variables Dependientes 39
Criterios de Selección 39
   Inclusión 39
   Exclusión 39
   Eliminación 40
   Cronograma de actividades Experimentales 40
   Dia1al 5: 40
   Día 6 al 10 40
   Día 14 al fin de estudio. 41
Determinación pruebas sensorimotoras 42
1. Procedimiento de desafío de barra transversal 42
2. Prueba del poste 44
Análisis Inmunohistoquímico 44
Detección de neuronas dopaminérgicas (Tirosina Hidroxilasa) 46
CONSIDERACIONES BIOÉTICAS 49
RESULTADOS 51
BIBLIOGRAFÍA 78

Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) es una patología neurodegenerativa que afecta al ser humano principalmente durante el envejecimiento. La EP se caracteriza por la aparición de cuatro síntomas: 1) bradicinecia, 2) rigidez, 3) temblor, e 4) inestabilidad postural. Además, ocurre pérdida de neuronas dopaminérgicas de la *substancia nigra pars compacta* (SNpc) y denervación del cuerpo estriado (CE). La neuro-inflamación en la EP es generada principalmente por astrocitos y microglia que al activarse mediante la vía de las cinasas específicamente p38 provoca diferente sintomatología en el ser humano, entre ellas discinecias. El tratamiento de elección es la terapia de remplazo con Levo-Dopa, no apto para todos los pacientes y controla parcialmente las discinecias por periodos de tiempo cortos. Son tres frentes de experimentación donde la regulación endocannabinoide por β-cariofileno puede ser importante: las alteraciones motoras parkinsonianas, las discinesias iatrogénicas, y la neurodegeneración. Con mayor relevancia en el cese de signos de parkinson avanzado, al activar los receptores cannabinoides tipo 2 (RCB2) sin la clásica tétrada cannabinnoide: hipotermia, hipoquinesia, analgesia y catalepsia, propia de activación de receptores cannabinoides tipo 1 (RCB1). Por este motivo en el presente trabajo se analizó el efecto neuroprotector de β-Cariofileno en la inactivación de astrocitos y microglia, a través de la inhibición de la vía p38 MAPK, en un modelo murino de inducción de Parkinsonismo.

INTRODUCCIÓN

Originariamente se sabía que los cannabinoides causaban hipolocomoción e hipocinesia, lo que ya manifestaba su importante papel motor. El descubrimiento del sistema endocannabinoide resaltó este aspecto, pues dicho sistema está involucrado en mecanismos de señalización en varias regiones cerebrales relacionadas con el control motor como son los ganglios basales y el cerebelo. De hecho la regulación endocannabinoide de diversos sistemas neurotransmisores en los ganglios basales origina importantes cambios motores (*Benarroch 2007)*. No es de extrañar que los datos de numerosos experimentos en modelos animales de neurodegeneración apoyen que los endocannabinoides deben jugar un papel importante en alteraciones motoras como la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, el conocimiento de la fisiología motora de los ganglios basales indica que hay multiplicidad de sitios donde actúan los endocannabinoides, y que el resultado final “clínico” sobre la regulación motora es difícil de predecir, lo que explicaría las inconsistencias experimentales (Carroll y cols., 2004; Benarroch, 2007). Es conveniente al respecto tener un conocimiento amplio de la estructura funcional de los ganglios basales, de la disposición del sistema endocannabinoide en los mismos, y cómo se alteran en la enfermedad de Parkinson. Por otra parte, los endocannabinoides pueden jugar un papel en signos de parkinsonismo avanzado y originados por la medicación, como son las discinesias. También podrán jugar un papel neuroprotector, que limitaría el avance de la neurodegeneración. Son tres frentes de experimentación donde la regulación endocannabinoide puede ser importante: las alteraciones motoras parkinsonianas, las discinesias iatrogénicas, y la neurodegeneración.

MARCO TEORICO

1. Enfermedad de Parkinson (EP)

La enfermedad de parkinson (EP) fue descrita por James Parkinson (Parkinson 1917) y posteriormente Jean Marie Charcot describió los signos cardinales de dicha enfermedad a finales del siglo XVIII. Esta patologia es considerada crónico degenerativa puesto que los signos y sintomas van en aumento y complicandose, alguno de ellos son: temblor, rigidez muscular, lentitud de movimientos (bradiquinesia) y alteración de la marcha y reflejos posturales (Farreras y Rozman 1995).

2. Epidemiología

La EP es el segundo trastorno neurodegenerativo más frecuente despues de la enfermedad de Alzheimer (de Lau y Breteler, 2006) y debido al envejecimiento de la población su prevalencia en los países más poblados del mundo se duplicará en los próximos 25 años (Dorsey y cols., 2007). Como aproximación se puede considerar que las tasas de prevalencia se situan entre 0.3% y 2% en mayores de 60 años, en méxico se estima una prevalencia que va entre 40 a 50 casos por cada 100,000 habitantes/año, en el instituto Nacional de Neurologia y neurocirugía es el cuarto motivo de consulta (Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de parkinson inicial y avanzada en el tercer nivel de atención, México, Secretaria de Salud, 2010). En un 5-10% de los casos, se la diagnostica más precozmente, entre los 20 y los 50 años de edad. Este comienzo temprano, suele asociarse con las formas heredables o familiares de la patología (Bekris y cols. 2010).

3. **Fisiopatología de la Enfermedad de Parkinson**

La enfermedad de Parkinson se presenta debido a la muerte y pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la *pars compacta* de la *sustancia nigra* (SNPc), lo que ocasiona un déficit en la secreción de dopamina en el núcleo caudado y putamen. (Pakkenberg B, 1991) Las principales caracteristicas anatomo-patológicas incluyen cambios degenerativos, como son la muerte neuronal, la despigmentación en la sustancia nigra por pérdida de la neuromelanina (Nieto A y cols. 1997 y Dorado C y cols 2003), y la aparición de inclusiones intracelulares en las neuronas dopaminérgicas denominadas cuerpos de Lewy (Greenfield 1953). La muerte de neuronas dopaminérgicas en la área tegmental ventral (VTA) y de otras neuronas monoaminérgicas como son las neuronas noradrenérgicas del locus cerúleos y serotoninérgicas del rafe, que también ocurren de forma mas tardia (Hornykiewicz, 1998;, Tolsa y Poewe, 2006, Davie 2008). Los efectos funcionales de la pérdida de dopamina en los pacientes con Parkinson pueden ser entendidos según el mecanismo de perdidas de neuronas dopaminérgicas. La dopamina ejerce un efecto inhibitorio sobre las neuronas GABAérgicas del estriado con receptores D2 (vía indirecta) y un efecto excitatorio en las neuronas con receptores D1 (vía directa). Al disminuir el efecto inhibitorio sobre neuronas con receptores D2, aumenta la acción inhibitoria GABAérgica del estriado sobre el globo pálido en su parte externa (GPe), Al frenar la acción inhibitoria sobre el núcleo subtalámico (NST). Se produce así una liberación del Neurotrasmisores al desaparecer dicho freno, con lo que aumenta el estímulo excitatorio del núcleo a todos los niveles: Sustancia Nigra (SN), GPe y globo pálido parte interna (GPi). Por otro lado, la disminución de la acción dopaminérgica sobre neuronas con receptores D1 estriatales conlleva una

amortiguación de la acción inhibitoria GABAérgica de las neuronas estriatales sobre el GPi. Por lo tanto, como resultado final, en ambas vías directa e indirecta se produce un aumento de la acción GABAérgica del GPi, esta hiperactividad causa la inhibición del tálamo motor que es el responsable del control motor de las áreas corticales implicadas en la iniciación de los movimientos. La hipoactividad glutamatérgica tálamo-cortical se relaciona con síntomas como la rigidez, lentitud de movimientos, acinesia, etc. El temblor se cree que es originado debido al “escape” del tálamo motor a la potente inhibición procedente del GPi, al originar ráfagas de disparo (cada 125-250 ms) hacia la corteza que son causantes del temblor muscular (4-8 veces por segundo). (Aizman y cols., 2000; Sylviane Lortet 2013).

Los individuos sanos poseen una amplia reserva de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales; por lo que la aparición de los síntomas de parkinson no ocurre hasta que se ha perdido un 80% de las neuronas aproximadamente. La actividad compensadora en las neuronas restantes, tales como el aumento de la síntesis de la tirosina-hidroxilasa produciendo mayor cantidad de dopamina, así como el desarrollo de hipersensibilidad de receptores dopaminérgicos actúan como mecanismos de neuroadaptación compensatoria. La reserva funcional a través de estas adaptaciones explica la progresión de la enfermedad de Parkinson, retrasando la aparición de los síntomas de la enfermedad. Las lesiones de evolución rápida, tales como las producidas por neurotoxinas, también producen síntomas de parkinson. Se ha postulado que alguna irritación de tipo tóxico o vírico podría acelerar la degeneración progresiva neuronal. La pérdida lenta y progresiva de neuronas dopaminérgicas también se produce en individuos normales durante la vida adulta en ausencia de enfermedad de Parkinson, sin alcanzar una pérdida superior al 80%

de las neuronas dopaminérgicas (Pakkenberg B, 1991).

En la enfermedad de Parkinson, el daño en la *sustancia nigra* y en el circuito nigroestriado se considera debido fundamentalmente a estrés oxidativo, el cual es la "fuerza motriz" de la neurodegeneración, y su causa es desconocida (Fernández-Espejo, 2004). Hay diversos indicadores de que la *sustancia nigra* en la EP está sujeta a estrés oxidativo. Los niveles de hierro están aumentados un 129% (Sofic *y cols.*, 1988; Morris y Edwardson, 1994), y los del péptido antioxidante glutatión están disminuidos un 40% (Shapira y cols., 1989), lo cual podría facilitar la aparición de reacciones de Fenton con la formación de radicales fuertemente oxidantes, como el ión superóxido. La enzima sintasa de óxido nítrico también está aumentada en la glía de la *sustancia nigra* (Hunot y cols., 1996), lo que lleva a la formación de peroxinitritos y radicales hidroxilo, altamente oxidantes. La formación excesiva de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno conlleva al daño en proteínas, lípidos, ADN y ARN. Los niveles de carbonilos de proteínas, marcadores de oxidación proteíca, están dos veces elevados en la *sustancia nigra* de enfermos de EP (Floor y Wetzel, 1998). Los niveles de hidroperóxidos lipídicos, indicadores de oxidación lipídica, están diez veces aumentados (Dexter y cols., 1989). Finalmente, la 8-hidroxiguanina, indicador de daño oxidativo en el ARN y ADN, está también aumentada (Alam y cols., 1997). Además del estrés oxidativo, existe un ciclo tóxico neurodegenerativo caracterizado por disfunción mitocondrial, excitoxicidad mediada por glutamato, e inflamación en la *sustancia nigra*. Todo esto explica la rápida progresión de la EP una vez que la sintomatología se manifiesta de lo que abordaremos a continuación.

Uno de los hallazgos característicos en las muestras *post-mortem* de pacientes con EP es la activación de las células de la glía, en particular la microglía. Esta activación microglial se ve acompañada de la presencia de mediadores inflamatorios, como por ejemplo, citoquinas pro-inflamatorias (McGeer y McGeer 2007).

4. Inflamación en el Sistema Nervioso Central (SNC)

La inflamación en el SNC es uno de los procesos con mayor control del organismo del ser humano, al estar contenido dentro de la calota o huesos craneales carece de lugar para poder expanderse después de una agresión o traumatismo, ya sea por una distensión excesiva debido a una extravasación de líquido y células que podría causar daño inespecífico de graves consecuencias funcionales (Yang, Min y cols. 2007). El término inflamación en el SNC se presta a confusión debido a las diversas maneras en las que se este se emplea, por lo cual definiremos inflamación como la respuesta de las células de la glía, principalmente la microglía y astrocitos, y la presencia de infiltrado inflamatorio periférico (Spranger 1996, Mc Guear 1993).

El SNC al igual que la placenta son los organos mejor resguardados en cuanto a sistema inmunologico se refiere, ya que ambos poseen barreras especiales que los protegen de las agresiones tanto del medio externo como interno del ser humano; la placenta posee la barrera placentaria que protege al nuevo individuo del medio interno de la madre, por su parte el cerebro inmunológicamente privilegiado por poseer una Barrera Hemato-Encefálica (BHE) que lo protege de las agresiones tanto del medio interno como externo (Davson 1976; Mrass y Weninger 2006) ya que la misma afecta el libre pasaje de agentes patógenos y células inmunes al parénquima

cerebral. La BHE tiene la capacidad de ser altamente selectiva ya que posee la habilidad de decidir sobre el paso de moléculas hacia en interior y hacia el exterior del SNC. Últimamente se postula una comunicación más fluida entre el SNC y el resto del organismo sin dejar de perder valor lo ya mencionado descrito (Zlokovic 2008). Debido a que el cerebro cuenta con la BHE y el paso de sustancias asi como células es estrechamente vigilado y altamente selectivo, el cerebro cuenta con un exclusivo sistema inmunologico que aunque diferente al de la periferia o resto del cuerpo, cumple las mismas funciones, y no solo un sistema de defensa inmunlógico sino células especializadas en estructurar, y proteger la viabilidad del tejido, estas células tambien llamadas sistema glial o células gliales se conforman de Astrocitos, microglia, oligodendrocitos, células ependimarias, entre otras.

a. **Microglia**

La microglía es una de las células de mayor importancia en el proceso inmunológico del SNC, fundamental en la neuroinflamamación. Originalmente fueron reconocidas por Nissl y descritas como células con núcleo en forma de cetro en 1899 (Barron 2003. El origen embriológico de estas no esta relacionado con otras células neurogliales, ya que estas derivan del mismo origen que los macrófagos del resto del cuerpo, nombrandolas “el macrofago del SNC” (Kreutzberg 1996). Son las más pequeñas de las células neurogliales y se hallan dispersas en todo el SNC, normalmente exhibe un fenotipo morfológico en reposo o “resting” (Kreutzberg 1996). De sus somas celulares se proyectan prolongaciones ondulantes ramificadas que tienen numerosas digitaciones similares a espinas. Asemejándose mucho a los macrófagos del tejido conectivo, la microglia migra al sistema nervioso durante la vida fetal. Las células de la microglia aumentan en número en presencia de tejido

nervioso dañado y muchas de las células nuevas son monocitos que migran desde la sangre.

Fue del Pio del Rio Ortega quien las describió como un tipo celular específico con su tinción en plata en 1918, al diferenciarlas de esta manera de células como los astrocitos, oligodendrocitos y otras células gliales (Rio-Ortega 1918).

Las células microgliales son células inmunocompetentes con capacidad fagocítica que pueden mediar la respuesta inmune innata y ejercer una actividad crítica en la defensa del SNC (Kim y de Vellis 2005). Al estar en presentación de reposo es altamente sensible y puede cambiar su morfología en respuesta a diferentes alteraciones del microambiente cerebral o a procesos patológicos como infecciones o inflamaciones. Esto se conoce como activación morfológica (Banati, Gehrmann y cols. 1993; Kreutzberg 1996; Kim y de Vellis 2005; McGeer y McGeer 2007).

La activación microglial moderada cumple un papel homeostático en el cerebro, al remover toxinas, células muertas y restos celulares (Kim y de Vellis 2005). También es responsable de promover el crecimiento de procesos neuronales mediante la liberación de factores tróficos como el GDNF (factor neurotrófico derivado de una línea celular glíal) y el BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) (Lotharius 2005; McGeer y McGeer 2007).

Existe además una activación microglial atípica, en la que la microglía se encuentra parcialmente activada. Esta activación se ha descrito como consecuencia de la degeneración neuronal y la edad avanzada (Perry 2004). En este estadio de activación atípica, las células son capaces de transcribir citoquinas pro-inflamatorias aunque no son capaces de sintetizar la proteína en sí. Este concepto sugiere que

una célula en estado cebado requeriría de un segundo estímulo menor al que requeriría una célula en reposo hasta quedar clásicamente activada. La respuesta de la microglía a un estímulo dado, depende de su estado de activación o cebado al momento del estímulo (Perry 2004). Los cerebros de personas ancianas y los pacientes que sufren Alzheimer presentan microglía cebada (Perry 2004; Perry y Cunningham 2007).

Cuando la microglia se activa o “ceba” comienza la producción y secrecion de citocinas proinflamatorias, las cuales comienzan a regular y controlar el proceso inflamatorio. Tambien la microglía al activarse comienza un proceso de cambio en su membrana celular expresando direfentes tipos de marcadores de superficie como:

- Complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I y II (MHCI y MHCII) (Perry y Cunningham 2007).
- Moléculas coestimulatorias: CD40, CD80 y CD86 una vez activada. Por esta razón al expresar tales proteinas superficiales, se les considera una celula presentadora de antígenos.
- Tambien expresa en su superficie de su membrana la proteína o molécula adaptadora de unión a calcio unizado o Iba-1 (Ohsawa 2004), la cual tambien es llamada Factor Inflamatorio de aloingerto o AIF-1 (Autieri 1996), cuya función es promover o facilitar la fagocitosis, también sufre cambios del citoesqueleto lo que nos lleva a presentar 4 grados de activación.

Los estadios de activación morfológica de la microglia

Se pueden estadificar adaptando la clasificación de Kreutzberg

Estadio 1: Microglía en reposo: células con cuerpo en forma de cono y procesos finos y ramificados.

Estadio 2: Microglía activa ramificada: cuerpo celular alargado con procesos largos y gruesos.

Estadio 3: Microglía ameboidea: cuerpo celular redondo con procesos cortos y escasos.

Estadio 4: Células fagocíticas: cuerpo celular redondo con citoplasma vacuolado en las que no se pueden observar procesos en el microscopio óptico.

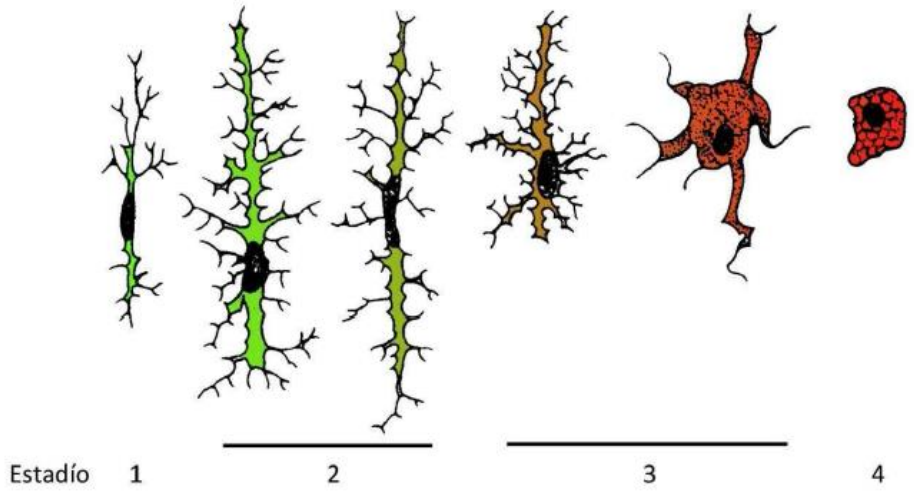


Figura 1. Estadíos de activacion de la microglia. Se muestran los estadios de la microglia en sus cuatro tipos de activación, estado inerte, ramificado y ameboide.
Fuente: www.uji.es/bin/publ/edicions/jfi1/microglia.pdf

Consideraremos microglía activada a todos los estadios con excepción del denominado “en reposo” o estadio 1. Todos estos tipos morfológicos son capaces de unirse a la lectina GSA1B:4. Como ya se mencionó anteriormente a lo largo de la activación morfológica de la microglía ésta experimenta cambios de forma y expresión de diferentes marcadores, como MHC-II. Por lo tanto, algunos de estos estadios de activación pueden ser también identificados por la presencia o ausencia de MHC-II+. En particular, el estadio 4 se lo puede caracterizar por positividad para el marcador de actividad fagocítica ED-1 (Spranger 1996, Mc Guear 1993).

Existe numerosa evidencia que apunta a que la microglía activada y sus productos tienen un efecto neurodegenerativo (Dheen ST 2007). Sin embargo, también se ha observado, que la microglía tendría efectos neuroprotectores. Por lo tanto, podríamos concluir que, la microglía tendría efectos duales dependiendo de su activación y de los factores liberados al nicho neuronal (Perry 2004, Perry 2007; McGeer 2008).

b. **Astrocitos**

Junto con las neuronas, los astrocitos son las células mas abundantes del SNC y también son unas de las de mayor tamaño, la caracteristica principal de este estirpe celular es que tienen forma de estrella, con prolongaciones citoplasmaticas abundantes y finas llamadas también “feet processes” las cuales estan en estrecha comunicación con las demas células vecinas y capilares cerebrales. Anteriormente se creia que los astrocitos solo fungian una actividad estructural, pero actualmente los relacionan con otros procesos como regulación de la neurotransmisión y en el desarrollo del proceso de memoria (Santello 2010, Moraga 2014).

Estructuralmente los astrocitos pueden dividirse en dos grandes tipos:

- protoplasmáticos, con prolongaciones ramificadas y cortas, que se localizan principalmente en la sustancia gris dispersa entre los cuerpos neuronales.
- fibrosos, o células en forma de araña, con prolongaciones más largas y más delgadas, que se sitúan principalmente en la sustancia blanca entre los haces de axones mielinizados (Raivich y cols., 1999)

Dentro de las funciones de estas células gliales, mencionamos que forman parte de la micro-arquitectura del cerebro, al proporcionar soporte estructural, trófico y metabólico a las neuronas (Chen y Swanson, 2003). Este tipo celular puede ser estimulado por distintos neurotrasmisores entre los que se encentran glutamato, GABA y acetilcolina entre otros, los astrocitos también modulan la excitabilidad neuronal y participan activamente en la transmisión y almacenamiento de la información sináptica (Perea y Araque, 2007). También ayudan a establecer y mantener los límites del SNC como la BHE, a través de interacciones con las células endoteliales, y regulan la expresión y función de varios transportadores endoteliales (Abbott y cols., 2006).

En respuesta a patologías del SNC tales como trauma, isquemia, tumores o enfermedades neurodegenerativas, los astrocitos se activan y dan lugar al proceso conocido como “gliosis reactiva” o “astrogliosis”. Este proceso es fundamental para limitar las áreas de daño formando tejido cicatrizal y recuperar la actividad neuronal. Su rasgo distintivo es el aumento en el número de astrocitos y la hipertrofia de sus procesos celulares. Además, se caracteriza por la sobreexpresión de algunas proteínas del filamento intermedio como la proteína glíal fibrilar acídica (GFAP) y la

vimentina (Eddleston y Mucke, 1993). En dichas condiciones patológicas, los astrocitos además producen una serie de mediadores químicos (glutamato, aspartato, adenosin trifosfato (ATP), Óxido nítrico (NO), Proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-2), Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) e Interleucina 1 beta (IL-1β), que aumentan la permeabilidad de la BHE.

c. Vía p38 de mediación inflamatoria.

Se ha implicado a la via p38 MAPK en numerosos procesos biológicos, incluso en respuestas a estrés y el proceso de inflamación, asi como la regulación, proliferación, diferenciación y la supervivencia de tipos celulares particulares, como los astrocitos y microglia. La información molecular detallada sobre cómo esta vía de señalización regula determinados procesos celulares es todavía escasa.

La via p38 MAPK, es una vía de que permite a a las células interpretar señales extracelulares y responder a ellas mediante la elaboración de diferentes efectos biologicos, algunos de los agentes externos que pueden generar una agresión a la homeostasis celular y desencadenar respuesta porla vía p38 son excitotocicidad, choque osmótico, estrés oxidativo, radiación ultravioleta, citocinas proinflamatorias, entre otros. Hay una gran diversidad y especificidad en la respuesta de esta vía, que se consigue al seguir una arquitectura o activación lineal, que aparentemente suele parecer simple, consta de tres proteinas quinasas que actúan en secuencia (Cuadrado 2010).

Los elementos centrales de esta vía son una familia de proteína-serina/treonina quinasas denominadas MAPK quinasas que se activan en respuesta a diversos

factores de crecimiento y a otras moléculas señaladoras. La activación de ERK tiene lugar a través de dos proteínas quinasas que están asociadas a receptores de factores de crecimiento mediante una proteína de unión a GTP denominada Ras (Avruch 2001).

Entre los miembros de la familia MAPK (protein cinasas activadas por mitogenos), los mitógenos y factores de crecimiento frecuentemente activan la ruta ERK1/2 también llamadas via de sobrevida celular, mientras que el estrés y procesos inflamatorios constituyen el principal desencadenante de la cascada de JNK y p38, algunas veces referidas como “proteínas quinasas activadas por estrés” lo que desencadena procesos inflamatorios que pueden llevar a activar la vía de apoptosis o muerte celular programada. Por tanto, median respuestas a choques osmóticos, citoquinas inflamatorias y otras agresiones (Nebreda y Porras, 2000).

La familia p38 (SAPK2) incluye cuatro isoformas (α-δ) poseen una homlogía en su secuencia 60-75% similares en tamaño (360-32 aminoácidos), y son activadas en respuesta a estímulos estresantes extracelulares como son el factor de necrosis tumoral-α (TNF-α) e interleuquina-1 (IL-1), radiación UV y choque osmótico (Raingeaud y col., 1995) de la misma forma que la familia JNK.

p38 es activada por MAPKKs (cinasas de la cinasa de la MAP cinasa), que incluyen MKK3·, MKK6, y JNKK1, que fosforilan con especificidad dual los motivos TGY (residuos de treonina 180 y tirosina 182). Los efectores de la familia p38 incluyen factores de transcripción (ATF-2, Elk-1, CHOP/Gadd15), Max, MEF2C) y enzimas (MAPK). La ruta MAP3K de p38 puede incluir Tak1, Ask1, y MLK (Nemoto y col., 1998).

La ruta p38 desempeña un papel importante en apoptosis e inflamación mediada por estrés. Se ha demostrado que muchas señales apoptóticas estimulan la actividad de p38 y que esta activación se correlaciona fundamentalmente con la inducción de apoptosis en varios tipos celulares, incluyendo la muerte de células dopaminérgicas en EP.

En el proceso inflamatorio, la participación de p38 es fundamental y se cree que es de las primeras funciones atribuidas a esta molécula, gracias a su implicación en la señalización de la activación de TGF-β. Se ha demostrado que en células que median procesos inflamatorios (neutrófilos, monocitos, macrófagos como las células microgliales y células T CD4+) la activación de p38 se produce principalmente mediante dos vías:

1) Vía MKK4, en respuesta a Rac/cdc42, aunque no es susceptible de activarse en respuesta a TNFα

2) Vía MKK6 o MKK3, donde son capaces de activarse en respuesta a TNFα y no son regulados por Rac/cdc42.

La actividad que efectua p38 en procesos inflamatorios se da en respuesta a TNFα y IL-1β y es debido a la activación por dos de sus sustratos: AP-1 y NF-κB (Eder, 1997). En este sentido, esta MAP quinasa tiene un papel clave durante el proceso de infiltración de los linfocitos hasta el tejido dañado.

Se ha implicado a diversos farmacos y moléculas capaces de inactivar la fosforilación de la MAPK p38 al inhibir asi sus funciones inflamatorias y pro apoptoticas; entre las moleculas conocidas estan los inhibidores de la fosforilación,

las moléculas SB, que actuan por Interacción de su grupo fluorofenilo con la Treonina 106 de p38-MAPK impidiendo unión ATP y con ello su activación, entre ellas SB203580 (Nemoto 1998), al inhibir p38 con SB203580 tenemos una descenso de citocinas proinflamatorias y como resultado disminución del proceso inflamatorio en la muerte neuronal (Chaparro-Huerta 2008) como podemos ver en la figura 2. Actualmente se ha demostrado que los cannabinoides poseen un potencial terapéutico para la inhibición de esta vía de señalización, Se menciona en los antecedentes del uso de estas drogas que son altamente efectivos para inhibir p38 MAPK en modelos de dolor neuropatico pos-operatorio en ratas, asi como la inhibición de inflamación mediada por activación de astrocitos por esta misma vía. (Alkaitis 2010).

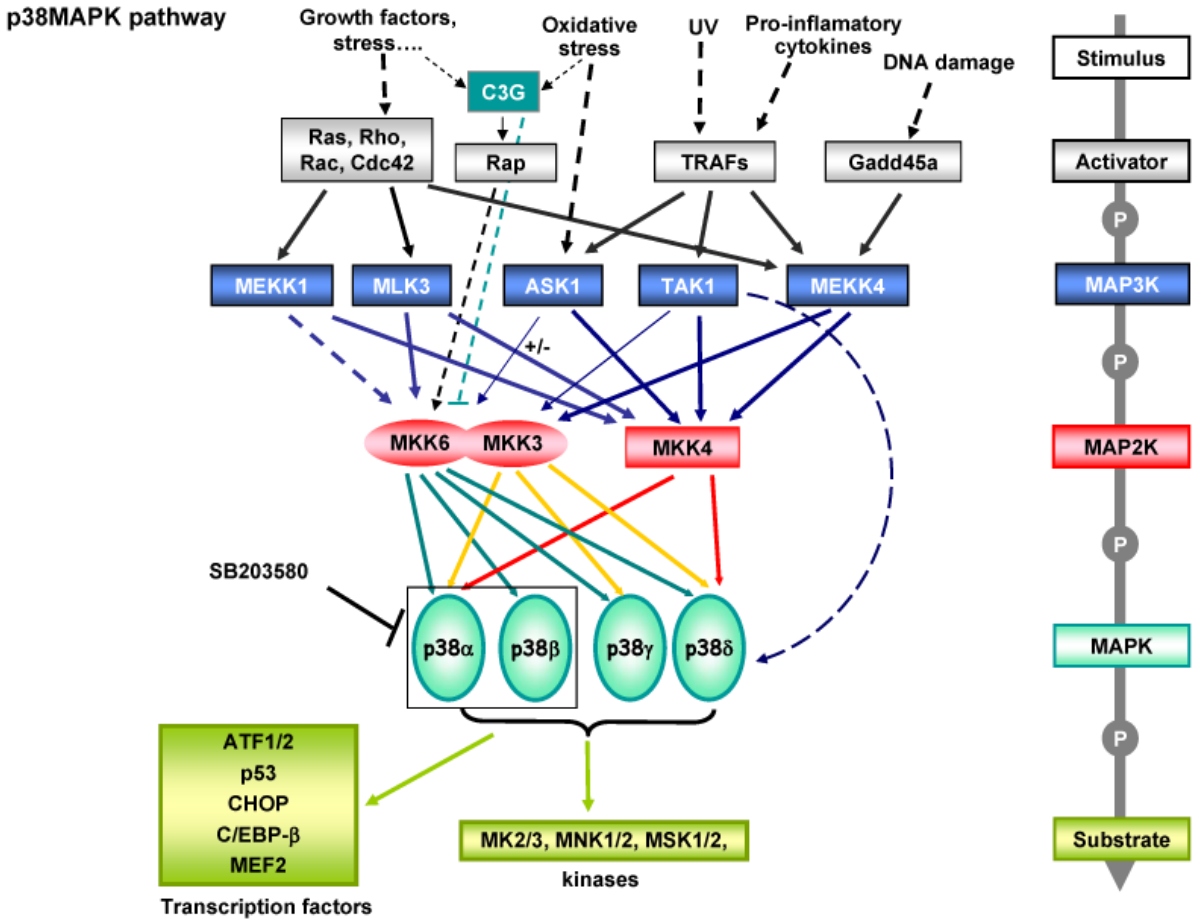


Figura 2. Se muestra la via p38 MAPK. Una variedad de estímulos, principalmente estrés, pueden activar p38 MAPK a través de cascadas de cinasas, como MAP3K que fosforila un MAPK2 que, a su vez, fosforila p38MAPK. Segundos mensajeros, como GTPasas, proteínas receptoras adaptadoras o proteínas de control del ciclo celular, entre otros, transmiten el estímulo a las cascadas de cinasas. Una vez activado, los diferentes p38 MAPK fosforilan objetivos citoplasmáticos o se translocan al núcleo y conducen la regulación de los factores de transcripción implicados en las respuestas celulares. MKK6 es el principal activador de la p38 MAPK en todas sus isoformas, mientras MKK3 MKK4 son más específicas y sólo se pueden activar algunas isoformas, SB203580 puede inactivar la fosforilación de P38 MAPK alfa y beta que encontramos en el cerebro. Tomada de : http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/MAPK14-p38ainCancerID20089.html

5. Parkinsonismo

El Parkinsonismo, también llamado parkinsonismo secundario, es similar a la enfermedad de parkinson, pero su causa es secundaria a la intervención de diversos agentes como son: medicamentos, trastornos diferentes del sistema nervioso y otra enfermedades.

Síntomas del parkinsonismo secundario

Los síntomas que se pueden presentar en el parkinsonismo son:

- Disminución en la expresión facial
- Dificultad para comenzar y controlar el movimiento
- Voz baja
- Algunos tipos de parálisis
- Rigidez del tronco y extremidades
- Temblor

Una de las diferencias que radica, respecto a sintomatología, entre enfermedad de parkinson y parkinsonismo; se basa en los problemas cognitivos, los problemas de tipo cognitivo son poco comunes en la enfermedad de parkinson mientras que son mas frecuentes en el parkinsonismo secundario. Esto se debe a que las enfermedades que causan el parkinsonismo tiene una alta frecuencia de presentar demencia.

La enfermedad de parkinson es uno de los trastornos del SNC más comunes en la vejez. El término “parkinsonismo” se refiere a cualquier entidad que ocasiona movimientos anormales de tipo parkinson, los cuales son ocasionados por cambios o

destrucción de las células neuronales dopaminérgicas que producen dopamina en los ganglios basales, que controlan el movimiento.

El parkinsonismo secundario puede ser causado por trastornos como:

- Encefalitis
- Meningitis
- Accidente cerebrovascular
- Degeneración corticobasal
- Enfermedad por cuerpos de Lewy difusos
- Atrofia multisistémica
- Parálisis supranuclear progresiva

Algunos medicamentos también pueden ser causa de parkinsonismo como son:

- Antipsicóticos (haloperidol)
- Metoclopramida
- Fenotiazinas

Si los siguientes farmacos llegan a provocar muerte de las neuronas dopaminérgicas tambien pueden causar parkinsonismo secundario:

- Lesiones cerebrales por anestésicos (durante cirugía)
- Intoxicación con monóxido de carbono
- Exposición a toxinas (MPTP y 6-OHDA)
- Sobredosis de narcóticos

Se ha reportado casos de parkinsonismo secundario en personas farmacodependientes a la heroína por por contaminación de la misma al producirla con un subproducto llamado MPTP, esta neurotoxina produce la muerte de celulas

dopaminérgicas y presentar la sintomatología de parkinsonismo.El parkinsonismo secundario causado por antipsicóticos y otros medicamentos generalmente es reversible si se identifica pronto. El parkinsonismo secundario peude ser irreversible si es causado por: daño cerebral relacionado con drogas, infecciones y toxinas.

Pruebas diagnósticas del parkinsonismo secundario, el examen puede mostrar:

- Dificultad para iniciar o suspender los movimientos voluntarios
- Aumento del tono muscular
- Problemas con la postura
- Marcha lenta y lerda
- Temblores de tipo Parkinson
- Los reflejos generalmente son normales.

Los exámenes generalmente no son específicos para el parkinsonismo secundario, pero se pueden utilizar para confirmar o descartar otros trastornos que pueden ocasionar síntomas similares.

El tratamiento está orientado a controlar los síntomas, si son leves, es posible que no se requiera tratamiento. Si la afección es causada por un medicamento, se deben valorar los beneficios del medicamento frente a la severidad de los síntomas y decidir sobre el costo/beneficio para suspender o cambiar el farmaco. El tratamiento de otras afecciones, como accidente cerebrovascular o infecciones, puede reducir los síntomas. El parkinsonismo secundario tiende a ser menos sensible a la terapia farmacológica que la enfermedad de Parkinson.

6. Modelos Animales

Para tratar de reproducir en un modelo animal la enfermedad de parkinson, se debe comenzar imitando los principales signos patognomonicos de la enfermedad como son:

- La pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SN
- La disminución del contenido de dopamina en el estriado que representan las alteraciones histológicas y neuroquímicas más importantes de la EP.

En un modelo ideal de la EP se debería observar una pérdida gradual y progresiva de las neuronas dopaminérgicas en el individuo adulto así como la detección de alteraciones motoras y la aparición de los cuerpos de Lewy (Phani y cols. 2012).

Los modelos que existen en la actualidad pueden ser clasificados en dos grandes grupos; los modelos que emplean neurotoxinas ambientales o sintéticas y los modelos genéticos que emplean la expresión *in vivo* de mutaciones relacionadas con la EP.

Los modelos neurotóxicos de EP más empleados se basan en la utilización de sustancias como: 1-metil-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP) y 6-hidroxidopamina (6OHDA) (Castañeda, 2015).

a. 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)

El MPTP es una neurotoxina precursora del MPP+ cuya acción se basa en la destrucción de las neuronas dopaminérgicas en la *Sustacia Nigra*. Aunque el MPTP no tiene efectos psicoactivos se le puede producir accidentalmente en la síntesis de análogos de la meperidina. Su descubrimiento lo debemos a un grupo de adictos a la heroína al tratar de generarla se contamino con MPTP y dió los primeros cuadros de parkinsonismo en california en 1982 (Markey, 1986).

Al descubrir el efecto del MPTP como causante de parkinsonismo en humanos se propició la elaboración de modelos animales de esta enfermedad, estos fueron generados en primates y ratones dando como resultado parkinsonismo severo. El MPTP es altamente lipofílico, cruza rápidamente la BHE y es convertido en su metabolito activo MPP+ por la monoamina oxidasa B presente en las células gliales, este tipo de MAO lleva en sus siglas la B (BRAIN) por su única localización en el cerebro, lo que nos indica que la tranformación en metabolito activo solo se generará en esta región. El MPP+ es tomado por el transportador de dopamina y se acumula en las neuronas dopaminérgicas. En las mitocondrias, inhibe el complejo I de transporte de electrones, reduce la generación de ATP y genera estrés oxidativo por aumento de la concentración de radicales libres de oxígeno (Blesa, Phani y cols. 2012). Una única inyección de MPTP causa degeneración de la SN en 1-2 semanas, por lo que se lo considera un modelo agudo de neurodegeneración (Jackson-Lewis 2007).

También existen variaciones de este modelo que consisten en inoculaciones crónicas o inyecciones seriadas de MPTP a través del tiempo y asi ocasionar un

modelo crónico que replica mejor la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la EP. Este modelo se emplea mayormente en ratones. Por razones desconocidas las ratas son resistentes a la acción del MPTP y la eficacia del modelo es variable en ratones dependiendo de la cepa que se empleé.

Especies animales

Diversos animales han sido utilizadas para generar modelos de parkinsonismo, la neurotoxicidad varía entre cada especie, algunos de los especímenes empleados son macacos, gatos y ratones negros C57/BL6. No se ha logrado dilucidar por que hay diferencias en la vulnerabilidad al MPTP pero se creé que esta relacionada con las diferencias al metabolizar el MPTP y la farmacocinética de la misma, distribución y vida media de eliminación del metabolito activo MPP+. Algunas hipótesis mencionan que la neurotoxicidad está media o tiene dependecia por la neuromelanina (que es producto de degradación de la dopamina); puesto, el MPP+ tiene una alta afinidad por la neuromelanina y las celulas dopaminérgicas contienen esta compuesto abundantemente, dandole una coloración café obscura o negra. Los efectos que la neurotóxina MPTP produce en los ratones varía considerablemente con la edad del animal, la dosis, la vía metabólica y el número de dósis administradas. Se ha demostrado que el daño causado a nivel mitocondrial por el MPTP se incrementa con la edad de ratón (Mandavilli 2000), y los cerebros de ratones más viejos acumulan más MPP+ que los de los animales más jóvenes, lo que puede contribuir al aumento de la sensibilidad a la toxicidad por MPTP (Langston 1987). También se ha descrito una importante variabilidad en la sensibilidad al tratamiento con MPTP, esta depende de la cepa de ratón que este siendo tratada. La cepa C57/BL6 es la más sensible a la intoxicación

sistémica por MPTP, ya que la neurotóxina alcanza el sistema nigroestriatal de manera mas selectiva que en otras cepas murinas (Schmidt 2001). Esta variabilidad en la sensibilidad al MPTP se atribuye a diferencias genéticas (Seledis 2000).

Diversas investigaciones con MPTP en ratones utilizados como modelos experimentales de parkinsonismo, se basan en la administración de dosis subcutáneas o intraperitoneal de 10 a 20 mg/kg, esto con el fin de reproducir el modelo presintomático y determinar los mecanismos compensatorios que se establecen para contrarrestar o amortiguar la intoxicación por la neurotóxina (Ungerstedt 1968). Los dos modelos que están vigentes y son mayormente empleados, son el agudo y el crónico mediante la administración por vía intraperitoneal. Respecto al modelo agudo se puede resaltar la manera en que se produce el modelo, se aplican cuatro dosis de 20 mg/kg de MPTP en el mismo día y el animal es sacrificado a los 7 días postaplicación (Jackson 1995). En el modelo crónico se emplean dos pautas distintas: 1. Se administra una sola dosis diaria de 30 mg/kg de MPTP durante 5 días consecutivos y se sacrifica el animal a los 7 días; 2. Se administra una dosis al día de MPTP de 4mg/kg con una duración de 20 días, 7 días después los animales se sacrifican posterior a la ultima administración (Bezard 1997).

Algunos otras hipotesis están relacionadas con la actividad MOA-B a nivel de los capilares cerebrales. Al parecer, algunas especies animales como la rata, son resistentes a la administración sistémica de MPTP, su metabolito MPP+ es una toxina potente y produce destrucción de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra cuando se administra por medio de una inyección estereotáxica intracerebroventricular en el cuerpo estriado. Por tanto, cabe la posibilidad que la

que la diferente suceptibilidad en las diferentes especies de animales al MPTP sea dependiente de factores relacionados con algunos parámetros farmacocinéticos como son: la distribución y metabolización cerebral de la neurotocina.

b. 6-hidroxidopamina (6OHDA)

La 6OHDA es un análogo hidroxilado de la dopamina, su neurotoxicidad se basa en inhibir la cadena de fosforilación oxidativa, especificamente los complejos I y IV. La 6OHDA no cruza la barrera BHE, razón por la cual debe ser inyectada de manera estereotáxica en el cerebro, esta técnica se basa en sujetar por el craneo al modelo animal en un aparato llanado “estereotáxico” el cual permite mediante coordenadas especificas la inoculación presisa en la región cerebral deseada. En 1968 Ungerstedt describió por primera vez que la inyección estereotáxica de 6OHDA en la vía nigroestriatal inducía una lesión selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SN (Ungerstedt 1968).

El modelado de la parkinsonismo se puede generar al inyectar la 6OHDA en tres estructuras blanco: el cuerpo estriado, la SN o area tegumental ventral. Esto resulta en la captación de la 6OHDA por las neuronas dopaminérgicas de la SN donde causa estrés oxidativo y degeneración. La administración de la 6OHDA en la SN induce una degeneración rápida y casi completa de las neuronas dopaminérgicas de la SN. Esta degeneración difiere sustancialmente de la que ocurre en la EP en la que la pérdida neuronal es lenta y progresiva. Por ello, en los últimos años se está usando como modelo de neurodegeneración a la inyección de la 6OHDA en el cuerpo estriado. En este caso la degeneración neuronal parece ser debida a una degeneración neuronal retrógrada secundaria a la lesión de los terminales

dopaminérgicos estriatales y no al transporte axonal retrógrado de la neurotoxina desde el estriado hacia la SN. La toxina causaría una rápida degeneración de los terminales comenzando a las 24 horas al provocar una forma de axotomía química que aísla a los cuerpos celulares de sus estructuras blancos. La degeneración continúa progresivamente a partir de ese momento. Este modelo resulta muy interesante ya que reúne las características requeridas de neurodegeneración parcial y gradual (Blesa 2012).

7. Tratamiento

La enfermedad de parkinson carece de tratamiento curativo, los tratamientos actuales se basan en una terapia de remplazo que consiste enla administración de medicamentos que remplazan la función normal de dopamina, de la cual se carece en esta enfermedad, y de fármacos capaces de retrazar la degradación de los analogos dopaminérgicos. La enfermedad avanza irremediablemente al no existir terapias que detengan su curso. El tratamiento farmacológico tiene como diana terapéutica frenar o minimizar la sintomatología al utilizar fundamentalmente levodopa (L-3.4-dihidroxifenilalanina) asociada a un inhibidor de decarboxilasas periférico o agonistas dopaminérgicos, en la mayoría de los casos. El tratamiento a largo plazo con Levodopa puede traer como efectos secundarios la aparición de disquinesias que se pueden volver incapacitantes (Farreras y Rozman 1995). Estos efectos secundarios tienen una tasa de prevalencia promedio de 10% anual luego del comienzo del tratamiento con levodopa (Poewe 2006). Este porcentaje es mayor en pacientes que cursan con un inicio temprano de la sintomatologia, sobre todo los que tienen un carácter hereditario de la EP .

El tratamiento quirúrgico en EP se originó en los años 50. A los pacientes que presentaban temblor severo ocasionalmente se les indicaba cirugía ablativa del tálamo contralateral al temblor. Con el advenimiento del tratamiento con levodopa los procedimientos quirúrgicos fueron dejados de lado por unos años (Davie 2008). La aparición de las complicaciones causadas por el tratamiento a largo plazo con levodopa, llevó a que se estudiaron nuevas técnicas quirúrgicas con la intención de tratar las mismas. Las cirugías en esta etapa se concentraron en la palidotomía por lesión quirúrgica, particularmente efectiva para el tratamiento de las disquinesias inducidas por levodopa. Un nuevo desarrollo tecnológico hizo su aparición con la estimulación cerebral profunda (DBS por sus siglas en ingles) en que, la estimulación de alta frecuencia de áreas discretas del cerebro producen una inhibición funcional reversible del área blanco. El procedimiento más comúnmente empleado para reducir la bradiquinesia, el temblor y la rigidez y que también reduce las complicaciones motoras de causa farmacológica es la estimulación subtalámica bilateral. La intervención es altamente compleja y se emplea solamente en casos avanzados de la patología (Davie 2008).

a) **Eficacia neuroprotectora de los cannabinoides en la enfermedad de Parkinson y modelos de parkinsonismo.**

Los cannabinoides puedes ejercer su función neuroprotectora sobre el daño que se genera en la via nigroestriatal, esto podria ser de amplia utilidad en la enfermedad de parkinson disminuyendo el curso natural de la enfermedad. Los cannabinoides endógenos como exógenos, entre ellos la anandamida y 2-araquidonilglicerol y a los análogos cannabinoides como la oleiletanolamida (OEA) y la palmitoiletanolamida (PEA), poseen eficacia neuroprotectora. Los análogos cannabinoides actúan

principalmente a través de receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), que incluyen PPAR-alfa, PPAR-beta y PPAR-gamma (Rodríguez de Fonseca y cols., 2001; Fu y cols., 2003). Ciertos cannabinoides, como el cannabidiol, delta-9-THC, cannabinol, nabilona, etc., tienen capacidad de disminuir el estrés oxidativo (Marsicano *y cols.*, 2002). Estudios con modelos animales de Parkinsonismo así lo confirman, y sus efectos parecen ser debidos a propiedades antioxidantes pues no actúan a través de los receptores cannabinoides CB1 o CB2 (Lastres-Becker y cols., 2005). En cultivos celulares de neuronas de dopamina de la sustancia nígra el delta-9-Tetrahidrocannabinol también muestra actividad antioxidante contra el tóxico 6-OHDA, sin participar los receptores CB1 (Fernández-Espejo 2004). La OEA y la PEA también poseen propiedades antioxidantes, pues la acción agonista sobre PPAR-γ disminuye el estrés oxidativo inducido por 6-OHDA (Beltowski y cols., 2002), reduce la actividad de la enzima iNOS, sintetasa de óxido nítrico, de gran importancia oxidativa, y aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes cerebrales. Estos análogos cannabinoides son candidatos muy interesantes como compuestos neuroprotectores porque son producidos por las propias neuronas y glía en respuesta al estrés oxidativo. Diversos experimentos han puesto de manifiesto dicha eficacia, pero también un posible efecto “ventana” (solo ciertas dosis son efectivas) que podría limitar su uso. Este efecto se debe a que co-actúan sobre el receptor TRPV1 y la activación de este receptor posee acciones lesivas sobre neuronas dopaminérgicas (Kim *y cols.*, 2005; Marinelli y cols., 2006). Al igual que sucede con las acciones antidiscinéticas de los agonistas cannabinoides, compuestos que posean actividad estimuladora PPAR-γ y bloqueante TRPV1 podrían ser de una mayor eficacia neuroprotectora.

Los agonistas cannabinoides poseen capacidad anticitóxica, al disminuir la liberación de glutamato, a través de receptores CB1 presinápticos (Grundy y cols., 2001). Pueden ser eficaces en disminuir el exceso de actividad glutamatérgica procedente del núcleo subtalámico, centro hiperactivo en la EP, al igual que hacen otros fármacos como el riluzol, actualmente en ensayo clínico. Los agonistas cannabinoides CB1 también atesoran propiedades antiinflamatorias, pues disminuyen los niveles de citocinas inflamatorias como TNF-alfa, IL-12 o incrementan los niveles de IL-10, citocina antiinflamatoria (Smith y cols., 2000). Los agonistas PPARa disminuyen la actividad de factores proinflamatorios como NFkB, AP-1 y NFAT.

El agonista WIN55,212-2 muestra eficacia antidiscinética en roedores, y la nabilona reduce las discinesias en monos y pacientes parkinsonianos. El empleo de cannabis en enfermos de EP ha dado resultado confusos e inconsistentes (Carroll y cols., 2004; Benarroch, 2007), aunque es interesante que las discinesias se ven reducidas en un grupo significativo de pacientes checos al mes de cesar el uso “terapéutico” de cannabis, sin una explicación clara. La acción cannabinoide agonista podría contrarrestar la hipersensibilidad dopaminérgica e incluso modular la desregulación glutamatérgica de un modo indirecto. Sin embargo, es importante mencionar que los agonistas indirectos, inhibidores de la recaptación de anandamida, no muestran eficacia antidiscinética (Segovia y cols., 2003). A este respecto, en la acción discinética de los cannabinoides también podría participar otro receptor, el TRPV1 (receptor vanilloide tipo 1). El aumento de los niveles de anandamida mediante agonistas indirectos o inhibidores de FAAH (enzima degradadora de anandamida) no tiene eficacia antidiscinética salvo si se coadministra capsazepina, antagonista de

los receptores TRPV1. Por este motivo el WIN55,212-2, agonista CB1 pero también bloquean TRPV1, sí posee eficacia antidiscinética. Parece ser que los agonistas directos cannabinoides tienen eficacia al bloquear el receptor vanilloide aunque también poseen propiedades antidiscinéticas, y podrían ser efectivos en la reducción de la aparición de este fenómeno tras un tratamiento prolongado con levodopa en enfermos de EP.

Diversos cannabinoides muestran eficacia neuroprotectora sobre las neuronas de dopamina, a través de una acción antioxidante, antiinflamatoria o antiexcitotóxica. La liberación endógena de cannabinoides tras daño neuronal constituye una respuesta fisiológica protectora. Si esta función neuroprotectora debida a la acción antioxidante *per se* o a la activación de receptores cannabinoides se transfiere a la clínica, se constituiría un marco muy atractivo para el desarrollo de agentes neuroprotectores en la EP.

b) Beta-cariofileno

El sesquiterpeno β-cariofileno se encuentra en grandes cantidades en el aceite esencial de diferentes especias y los alimentos vegetales, como el aguacate (*Persea americana Mill*), limón (*Citrus spp*.), El orégano (*Origanum vulgare L.),* la canela (*Cinnamomum spp),* Clavo (*Syzygium aromaticum*), el romero (*Rosmarinus officinalis L*.), tomillo (*Thymus serpyllum*), la salvia (*Salvia officinalis L.),* pimienta negra (*Piper nigrum L.)* y otros. Debido a su sabor y aroma débil, que también se utiliza comercialmente como un aditivo alimentario y en cosméticos (Gertsch 2008). Varios efectos en la salud han sido atribuidos a la β-cariofileno, como antiinflamatorio, anestésico local y la actividad anti- cancerígena. Recientemente, se ha descubierto

que β-cariofileno se une específicamente y activa el receptor cannabinoide tipo 2 (CB2). Por lo tanto, β-cariofileno no tiene efectos psicoactivos, a diferencia de la clásica fitocannabinoide Δ9-tetrahidrocannabinol (THC) de la planta Cannabis sativa, que activa los receptores cannabinoides neuronales tipo 1 (CB1) danto origen a la tétrada cannabinoide: : hipotermia, hipoquinesia, analgesia y catalepsia (Compton y cols., 1993; Fox y cols., 2001). Se estima que la ingesta diaria realista, prevista de 10 a 200 mg de β-cariofileno de alimentos vegetales es suficiente para que el receptor cannabinoide CB2 tenga una activación significativa (Gertsch J. 2008). La señalización del receptor CB2 tiene un papel importante y clave en procesos fisiológicos y fisiopatológicos, particularmente aquellos que involucran respuestas inflamatorias e inmunes. Los agonistas de los receptores CB2 pueden por lo tanto ser eficaces para el tratamiento de un espectro de trastornos inflamatorios y estados de dolor neuropático. La administración vía oral administración de β.cariofileno reduce las respuestas inflamatorias en modelos animales a dosis que son comparables a la ingesta nutricional. Se ha demostrado que la eficacia de la β-cariofileno en modelos de dolor neuropático es igual a la eficacia selectiva de la activación de CB2 por compuestos sintéticos. Con base en estos hechos, es probable que el β-cariofileno perteneca a un grupo de bioáctivos con un impacto potencial en la salud humana, (Zimmer 2014). De acuerdo a lo planteado en la fisiopatogenia de la EP, y el mecanismo de acción del β-cariofileno puede ser un posible tratamiento aun no empleado para la regulación del proceso inflamatorio degenerativo, por activación de las células astrogliales, vía p38, que pudiera ser mediado por activación de CB2 para protección neuronal de células dopaminérgicas en la *sustancia nigra*.

Caracteristicas físico-químicas

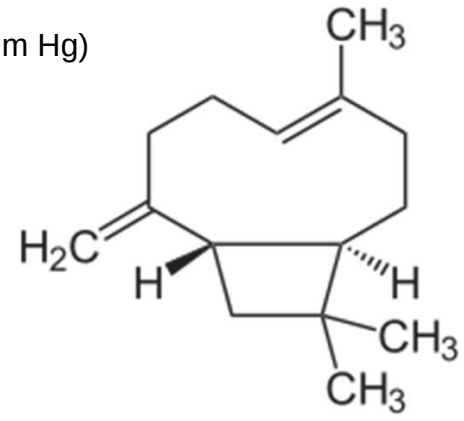
Formula Molecular: $C_{15}H_{24}$

Nombre Químico: trans-(1R, 9S)-8-metileno-4,11,11-trimetilbiciclo

Masa Molar: 204.36 g/mol

Densidad: 0.9052 g/cm^3

Punto de ebullición: 262-264 °F; 129-130 °C (14 mm Hg)



Aspecto a 20°c: Líquido fluido transparente

Color: de incoloro a amarillo palido

Olor: amaderado, especiado, seco, tenaz

Sabor: seco, algo amargo

Densidad a 20°c: (g/ml): 0.895 – 0.905

Punto de inflamación (°c): 116 Solubilidad: insoluble en agua

JUSTIFICACIÓN

El empleo del β-cariofileo en patologías de tipo inflamatorio ha sido reportado a lo largo del tiempo desde el descubrimiento de las propiedades de esta partícula, al carecer del efecto de la tétrada cannabinoide y sus efectos psicotrópicos al activar solo el receptor CB2 lo hace un posible tratamiento para enfermedades como la EP.

La gama de tratamientos farmacológicos para la EP es estrecha y la Levodopa no es una opción de tratamiento viable para todos los pacientes con dicha enfermedad, por lo cual, nos vemos en la necesidad de buscar terapias adyuvantes que auxilien a frenar o retrasar el desarrollo de esta enfermedad y al mismo tiempo protejan el resto de células nerviosas dopaminérgicas para favorecer el adecuado funcionamiento motriz de los pacientes, por tales razones β-cariofileno podría ser una alternativa terapéutica en EP.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso de cannabinoides para el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas como la EP no ha tenido el impacto que consideramos estas moléculas pueden llegar a representar en el tratamiento de dicha enfermedad. debido a que la gran mayoría de estos fármacos como fitocannabinoides y cannabinoides sintéticos activan los receptores cannabinoides CB1 y CB2, obteniendo efectos psicotropicos por la activación del receptor CB1. Por lo cual, el empleo de β-cariofileno como fármaco agonista de CB2 estaría exento de la presencia de estos efectos, además de sus propiedades en el bloqueo de activación de las células gliales como astrocitos y microglia, lo que se provocaría un decremento de la actividad

inflamatoria de las células neuronales y baja producción de especies reactivas que propicien el estrés oxidativo, impidiendo la neurodegeneración de las células dopaminérgicas de la *sustancia nigra.*

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué efecto tiene el uso de β-cariofileno en la activación de astrocitos y microglia a través de P38 MAPK en un modelo murino de inducción de parkinsonismo?

HIPÓTESIS

H1. β-Cariofileno impide la activación de astrocitos y microglia por la vía p38 MAPK en un modelo murino de inducción de parkinsonismo.

H0. β-Cariofileno no impide la activación de astrocitos y microglia por la vía p38 MAPK en un modelo murino de inducción de parkinsonismo.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de β-Cariofileno en la activación de las células de astrocitos y microglia, por la vía p38 MAPK, en un modelo murino de inducción de parkinsonismo.

Objetivos Particulares

- Determinar y comparar la coordinación motriz de los ratones post-intervención
- Detectar la inmunorreactividad de astrocitos y microglia en Cuerpo estriado y *Sustancia nigra*
- Identificar la expresión de TH en Cuerpo estriado y *Sustancia nigra*
- Determinar expresión de ATF-2 en Cuerpo Estriado y *Sustancia nigra*

MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio:

Diseño Experimental

Población a estudiar:

Los experimentos se realizarán en ratones machos de la cepa C57/BL6. Ya que esta, tiene predisposición genética a presentar las lesiones neurodegenerativas al generar el modelo de parkinsonismo, por su alta presencia de neuromielinización que favorece la transformación oxidativa del MPTP a MPP+ en células dopaminérgicas; aun cuando el receptor de dopamina lo internalice y la Monoaminooxidasa (MAO) realice también el proceso de oxidación (Markey 1986, Castagnoli 2003). Los ratones provinieron del bioterio del centro de investigación biomédica de occidente, con peso mínimo de 20 g y se mantuvieron en un ciclo

luz/oscuridad 12h/12h, con ingestión de agua y alimentos *ad libitum,* no se tuvo deceso de ningún ratón en los grupos de estudio.

Tamaño de Muestra

8 ratones por grupo, se estima un tamaño de muestra mínimo de 8 especímenes necesarios para realizar el estudio, considerando los siguientes valores para su cálculo: potencia estadística del 80% y la frecuencia de generación del modelo de parkinsonismo.

Grupos de estudio

Los grupos de estudio se dividieron en:

- **Grupo control (1):** no recibieron intervención ni MPTP para generar el modelo de EP, se le realizaron todas las pruebas correspondientes para evaluar las variables
- **Grupo con β-cariofileno (2)**: se le aplicaron inyecciones intraperitoneales de β-cariofileno a dosis de 10 mg/Kg emulsificado en cremofor al 25% como vehículo, (por curva dosis respuesta estandarizada por nuestro grupo de trabajo, en estudios previos aun no publicados, con 10% vehículo de aceite de castor de grado analítico), durante 5 días y se le realizaran todas las pruebas para evaluar las variables
- **Grupo de MPTP(3):** A este grupo se le administró MPTP, compuesto con el cual se generó el modelo de parkinsonismo con inyecciones intraperitoneales a una dosis de 30 mg/Kg diluido en solución salina como vehículo (dosis obtenida de la Guía oficial de la práctica clínica en la EP 2009) durante 5 días

consecutivos posteriormente se evaluaron las pruebas sensorimotoras, inmunohistoquímicas y morfológicas

- **Grupo de β-cariofileno y MPTP(4):** Se le realizaron las administraciones de β-cariofileno 5 días previos a la administración de MPTP a dosis de 10 mg/kg, al 6 día se administró el MPTP a dosis de 30 mg/Kg por 5 días más
- **Grupo de SB203580 y MPTP (5):** Se le realizaron las aplicaciones de MPTP a dosis de 10 mg/kg y 30 minutos antes se le administró SB203580 a dosis de 30 μM subcutánea para inhibir la fosforilación de p38 MAPK (con vehículo de DMSO aforado a 50 μM) por 5 días
- **Grupo de SB203580 (6):** Se le realizaron las aplicaciones de SB203580 a dosis de 30 μM subcutánea para inhibir la fosforilación de p38 MAPK por 5 días.

VARIABLES

Variables Independientes:

- β-Cariofileno

Variables Dependientes

- Tiempos de pruebas sensorimotoras
- Número células dopaminérgicas
- Grado de activación de células microgliales
- Grado de invasión zonal por reactividad astrocitica
- Niveles de p38 fosforilada y total

Criterios de Selección

Inclusión

- Ratones Macho de la cepa C57/BL6
- Con un peso mínimo de 20 gr.
- Sanos, sin haber sido sometidos a estudios previos
- Con una edad entre 60 a 90 días

Exclusión

- Ratones con comportamiento agresivo
- Ratones que presenten heridas o lesiones corporales
- Ratones que presenten alguna patología

Eliminación

- Ratones que presenten heridas o lesiones durante el período de estudio
- Ratones que perezcan durante el período de prueba o después de la inducción del modelo
- Ratones que presenten comportamiento agresivo durante el estudio
- Ratones que padezcan enfermedades concomitantes a EP, de cualquier tipo que no estén relacionadas con la fisiopatología del modelo de parkinsonismo

Cronograma de actividades Experimentales

Dia1al 5:

- Día 1. Se le realizaron todas las pruebas sensorimotoras preintervención a los 6 grupos de estudio
- Día 1 al 5. Se aplicaron a los grupos de estudio 2 y 5 la administración de β-cariofileno a dosis de 10mg/Kg por vía intraperitoneal cada 24 h y al grupo 6 SB203580 a dosis de 30 μM subcutánea por 5 días

Día 6 al 10

- Día 6 al 10. Se aplicaron a los grupos de estudio 4, 5 y 6 MPTP a dosis de 30mg/Kg por vía intraperitoneal por 5 días para instalar el daño por MPTP y el modelo de parkinsonismo, al grupo 6 previamente se le aplicaron 30 minutos antes de la aplicación de MPTP la molécula SB203580 a dosis de 30 μM subcutánea.
- **Día 8.** Se evaluaron los grupos de estudio 2 y 3 con las pruebas sensorimotoras post-intervención y se sacrifican los grupos 1, 2 y 3, tres días después de su última administración. Se dividieron por la mitad cada grupo de

estudio (4 y 4 ratones) para sacrificar 4 por fijación con solución fijadora vía intracardiaca y 4 por decapitación, se almacenaron los cerebros fijados y se realizó un homogenizado de las estructuras de importancia (cuerpo estriado y *sustancia nigra*) de los decapitados, congelándolas a -80°c. para su posterior estudio.

- Día 13. Tres días después de la última administración de MPTP se realizaron las pruebas sensorimotoras a los grupos de estudio 4, 5 y 6, se perfundieron los ratones con buffer y solución fijadora vía intracardiaca y se procedió al sacrificio por decapitación, se congelaron a -80°C los tejidos para su posterior prueba de inmunohistoquímicas y estudio morfológico.

Día 14 al fin de estudio.

- Día 14 al fin de estudio. se realizaron las pruebas de inmunohistoquímicas y morfometría, Así como la expresión de p38 fosforilada y total mediante Western blot. Como se muestra en el siguiente esquema.

Grupos / Días	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**fin**
1 Control	P	.	.	.	.	.	.	K	HW	HW	HW	HW	HW	HW	HW
2 Beta	PB	B	B	B	B	.	.	PK	HW	HW	HW	HW	HW	HW	HW
3 SB203580	PS	PS	PS	PS	PS	.	.	PK	HW	HW	HW	HW	HW	HW	HW
4 MPTP	P	.	.	.	.	M	M	M	M	M	.	.	PK	HW	HW
5. Beta + MPTP	PB	B	B	B	B	M	M	M	M	M	.	.	PK	HW	HW
6 SB + MPTP	P	.	.	.	.	SM	SM	SM	SM	SM	.	.	PK	HW	HW
Siglas															
P= pruebas sensorimotoras **B**= beta-cariofileno **S**= Inhibidor SB203580															
M= MPTP **K**= Sacrificio **H**= Inmunohistoquímica **W**= Western blot															
.= Día sin actividad															

Determinación pruebas sensorimotoras

La determinación de las pruebas sensorimotoras con los distintos tratamientos se valoró mediante la las siguientes pruebas:

1. Procedimiento de desafío de barra transversal

Se empleó esta técnica para evaluar la movilidad lineal del ratón en su deambulación sobre una barra fija con panel escalonado, el ratón se trasladó sobre un metro de longitud, el ratón sano caminó sobre los peldaños con mayor exactitud que el ratón con modelo de EP y se evaluaron las diferencias entre ambos grupos en 3 repeticiones para cada uno de los ratones, la técnica es la siguiente: Se invierten y alinean 3 jaulas limpias y a lo largo de ellas se coloca una la viga de 1 metro de longitud, donde se hizo deambular al ratón, sobre un extremo de la viga se coloca al ratón y al extremo opuesto se coloca la jaula hogar del ratón para estimularlo a caminar sobre la viga, se tomó el primer ratón por la base de la cola y se apoya sus patas traseras en la palma de la mano y las patas delanteras sobre el inicio de la viga, se dejó mover el ratón libremente hacia adelante, se evito su retroceso o desorientación y se condujo hacia la jaula hogar.

Se acercó la jaula hogar al ratón para estimularlo a deambular incluso si hay ratones compañeros en ella y lograr su caminata hacia la dirección correcta hasta el final de la barra para que logre entrar a la jaula, repitiéndolo con cada uno de los ratones de forma “asistida”. Se limpió la barra con un desinfectante (Etanol al 70%) para evitar que quedará rastro de aroma, heces u orina de los demás ratones. Se volvio a realizar la prueba nuevamente con cada uno de los ratones, pero sin hacer tan marcada la guía “asistida”, si el ratón caminó fuera de la viga se reorientó y estimuló

para que realizara el recorrido sin interrupciones, para esto fue necesario repetir alrededor de 5 veces los ensayos, 24 horas más tarde el día 2 de entrenamiento puedimos comenzar, los ratones recibieron 5 ensayos más en el mismo haz de configuración como en el día 1.

Los ratones no necesitaron ninguna ayuda pero necesitaron algunos ser corregido o tocado en la parte trasera para evitar la detención o exploración de la zona, 24 horas posteriores el día de la prueba real se puedo comenzar. Para el día de la prueba, el haz estaba configurado de una manera similar a los anteriores 2 días de entrenamiento. El ratón se coloca en la parte superior de la superficie de la barra en la sección más ancha y se registró el tiempo que tarda en reccorrer del inicio de la barra hasta la jaula hogar, se determinó la media de tres intentos para la comparación entre grupos (Fleming 2013, Luong, 2011). Evaluando con ella el grado de lesión motora por déficit de dopamina y desequilibrio de dopamina/acetilcolina, como vemos en la figura 3.

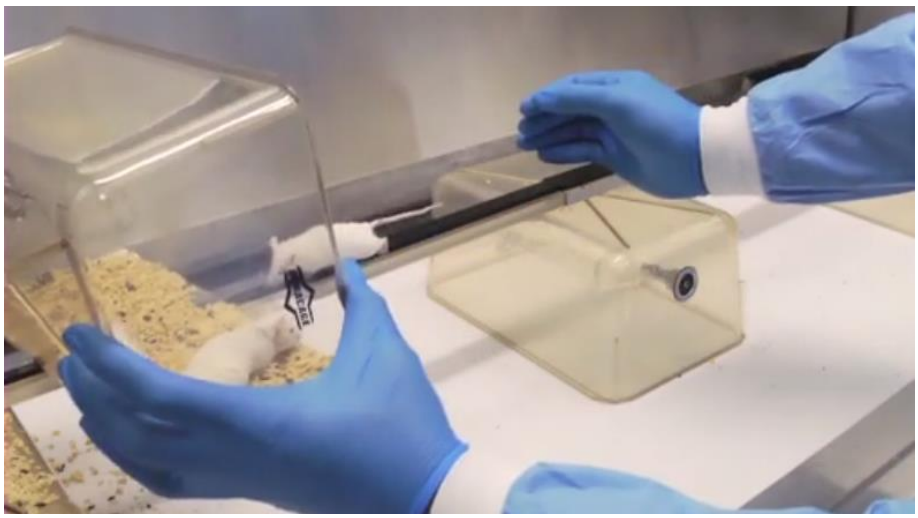


Figura 3. Prueba de desafío de barra transversal

Fuente: Fleming 2013, procedimiento de desafio de barra

2. Prueba del poste

Esta prueba tuvo como objetivo que el ratón suba y baje el poste evaluando movimientos rectos o rotatorios, previo entrenamiento, el ratón con modelo de parkinsonismo no podo realizar el descenso en movimiento circular, tuvo impedimento para realizar correctamente la prueba mientras que el ratón sin anormalidades descendió del poste rotando sin anormalidades y se cuantificó el tiempo de descenso para comparar la media de tres mediciones para la comparación de variables entre grupos (Fleming 2013, *Luong 2011), Evaluando con ella el grado de lesión motora por déficit de dopamina y desequilibrio de dopamina/acetilcolina, figura 4.*

Figura 4. Evaluación de prueba de poste vertical Fuente: Fleming 2013.

Análisis Inmunohistoquímico

Determinación Inmunohistoquímica de microglia por Iba-1 y GFAP.

Para está técnica los ratones fueron anestesiados (inyección intraperitoneal de una mezcla de 100mg/kg ketamina y 15 mg/kg Xilacina) y posteriormente perfundidos intracardiacamente en solución de buffer de fosfatos, posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4%. Inmediatamente después de la perfusión se obtuvieron los cerebros por decapitación y se mantuvieron en solución fijadora por una semana. Posteriormente se realizaron cortes seriados de 35 micras utilizando un vibratomo, para obtener las regiones de la SNpc y CE. De cada animal de obtuvieron 8 cortes correspondientes a la región cerebral.

La técnica se llevó a cabo en tejidos flotantes. Una vez lavados en PBS se procedió a disminuir el fondo de la reacción con la solución de borohidrato de sodio al 0.1% por 10 minutos. Los tejidos se enjuagaron con PBS 1X hasta eliminar las burbujas formadas, se adicionó una solución de tritón X-100 al 0.5% en PBS 1X con azida de sodio al 0.1% por una hora de agitación. Nuevamente fueron enjuagadas con PBS-azida y se inactivó la peroxidasa con peróxido de hidrógeno a 0.3% en PBS-azida de sodio por 5 minutos, se lavaron con PBS-Tritón X-100 al 0.1% de azida de sodio. Se incubaron con suero normal de cabra (vector) en una dilución de 1:100 por 30 min en agitación, posteriormente se retiró el suero y se agregaron los anticuerpos correspondientes: Iba-1 (Abcam 5076) y GFAP (policlonal DAKO) diluidas en PBS 0.1 M. Se retiró el anticuerpo primario y se enjuagó con PBS-Tritón X-100 0.1%-azida de sodio, se agregaron los anticuerpos secundarios correspondientes a una dilución de 1:500 y se incubó durante 24 horas en agitación. Después de la incubación se lavó perfectamente con la solución PBS-Tritón X-100 0.1%-azida de sodio y se transfirieron los tejidos a una solución preparada 30 minutos antes del complejo avidina-biotina (Vector, PK6000) y se incubaron por 2 horas en agitación, ésta solución se retiró y los tejidos se lavaron con PBS 0.01M y se revelaron con el kit de diaminobencidina (DAB).

Los tejidos se montaron en portaobjetos electrocargados y se mantuvieron en la cámara húmeda hasta que estuvieran adheridos. Estos portaobjetos se sometieron a un proceso de deshidratación con alcoholes, se colocó un cubreobjetos de vidrio con resina sintética. Los cortes se analizaron en un microscopio LEICA DME y se tomaron fotografías con una cámara digital DC120, de las regiones cerebrales SNpc y CE las cuales mostraron la inmunorreactividad con Iba-1 y GFAP.

Detección de neuronas dopaminérgicas (Tirosina Hidroxilasa)

Inmediatamente después de la perfusión se obtuvieron los cerebros por decapitación y se mantuvieron en solución fijadora por una semana. Posteriormente se realizaron cortes de 35 micras de espesor utilizando un vibratomo, para obtener las regiones de la SNpc y CE.

La técnica se llevó a cabo en los tejidos flotantes. Una vez lavados en PBS se procedió a disminuir el fondo de la reacción con la solución de borohidrato de sodio al 0.1% por 10 minutos. Los tejidos se enjuagaron con PBS 1X hasta eliminar las burbujas formadas, se adicionó una solución de tritón X-100 al 0.5% en PBS 1X con azida de sodio al 0.1% por una hora de agitación. Nuevamente se enjuagó con PBS-azida y se inactivó la peróxidasa con peróxido de hidrógeno a 0.3% en PBS-azida de sodio por 5 minutos, está vez se lavó con PBS-Tritón X-100 al 0.1% con azida de sodio. Se incubó con suero normal de cabra (vector) en una dilución de 1:100 por 30 min en agitación, posteriormente se retiró el suero y se agrego el anticuerpo anti-TH (AB152 millipore) a una dilución 1:1000 en PBS-BSA-azida de sodio por 24 horas en agitación. Se retiró el anticuerpo primario y se enjuagó con PBS-Tritón X-100 0.1%-azida de sodio, se agregó el anticuerpo secundario anti-conejo (1:500) que se preparó en una solución similar a la de el anticuerpo primario y se incubó durante 24 horas en agitación. Después de la incubación se lavó perfectamente con la solución PBS-Tritón X-100 0.1%-azida de sodio y se transfirió los tejidos a una solución preparada 30 minutos antes del complejo avidina-biotina (vector) y se incubó por 2 horas en agitación, ésta solución se retiró y los tejidos se lavaron con PBS 1X y se reveló con el kit de diaminobencidina (DAB). Los tejidos se montaron en portaobjetos electrocargados y se mantuvieron en la cámara húmeda hasta que estuvieron

adheridos. Estos portaobjetos se sometieron a un proceso de deshidratación con alcoholes, se colocó un cubreobjetos de vidrio con resina sintética. Se analizaron los cortes en un microscopio LEICA DME y se tomaron fotografías con una cámara digital DC120, de las regiones cerebrales SNpc y CE que mostraron reacción para TH, con un aumento del ocular de 10X y 40X.

Cuantificación de células gliales y neuronas dopaminérgicas en SNpc y CE

Para identificar las células gliales (Microglia y Astrocitos) y células dopaminérgicas de la SNpc y de CE, realizamos una inmunohistoquímica para detectar la inmunorreactividad de iba-1, GFAP y TH. Las células gliales y dopaminérgicas fueron contados en forma manual en uno de cada 8 cortes seriados de 35 □m por animal, en toda la substancia nigra pars compacta y cuerpo estriado de ambos hemisferios, definida por la marca inmunohistoquímica y por las referencias anatómicas del atlas del cerebro de rata de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson 1997). El conteo se realizó a ciego, bajo un objetivo 40X de un microscopio Leica DME, utilizando una retícula de $1mm^2$. Los resultados fueron expresados como el promedio +/- error estándar tanto para células gliales como para dopaminérgicas.

Western-Blot para ATF-2

Los ratones fueron sacrificados 3 días después de la última administración de cada grupo, se extrajo el cerebro y las partes de interés (*sustancia nigra* y cuerpo estriado), se congelaron a menos 80 °C, posteriormente los tejidos se sonicaron en buffer de lisis compuesto de: 920 μL de buffer de lisis 10 Mm (Tris-HCl pH 7.5, NaCl 150 mM, NaF 20 mM, orthovanadato de sodio 0.5 mM, pirofosfato de sodio 2mM) +

80 μL de coctel de inhibidores de proteasas (1 tableta complete Roche). En 2 mL de agua biodestilada. Las muestras se incubaron en hielo por 30 min y se centrifugaron a 13,000 rpm por 30 min a 4 °C. La concentración de proteínas se realizó mediante el método de Lowry (1951). Se utilizó albumina de suero bovino como referencia. Para la separación por electroforesis se utilizaron 50 μg de proteína en un gel SDS, poliacrilamida al 10%, que posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó con leche libre de grasa (10% Svelty) en buffer tris-salino, que contenía Tween-20 al 0.25% por 24h. La membrana se incubo con anti-ATF-2, humano (conejo) como anticuerpo primario (1:1000, 189275-Calbiochem) por 24 h para determinar la presencia de proteína ATF-2. Después se realizaron 5 lavados de buffer tris-salino con tween-20 al 0.05%, las membranas se incubaron durante 24 hrs, con un anticuerpo secundario, IgG anticonejo bionitilado hecho en cabra (1:1000, BA1000- Vector). Posteriormente se realizaron 5 lavados adicionales con BTTS. Las membranas se incubaron con ABC (elite kit, PK6101-Vector) por 1 h. Se realizaron tres lavados extras con BTTS, y el revelado se realizó con diaminobenzidina (DAB D5905 Sigma). Finalmente se tomó la fotografía digital con el sistema de foto-documentación Kodak Digital Analisys, para realizar el análisis correspondiente. El resultado obtenido utiliza la unidad arbitraria de intensidad como unidad de medida, esta es el producto del área interés seleccionada en mm^2 por la intensidad medida en pixeles. El resultado se normaliza ya que suelen ser números muy extensos, dividiéndolo entre potencias de base 10.

Análisis estadístico

- Para el análisis estadístico de comparación de medias entre grupos se utilizó la prueba de Anova con prueba posthoc de Tuckey, para medición de variables cuantitativas, previa realización de la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnof, tomando como nivel de significancia una $p<0.05$ y una potencia estadística del 80%

CONSIDERACIONES BIOÉTICAS

Proyecto apegado al Comité de cuidado de animales de laboratorio del Centro de Investigación Biomédica de Occidente y a los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la Producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. El estudio se evaluó por el comité de ética en investigación del Centro Universitario de Ciencias de la Salud (CUCS) con el siguiente número de registro: CEI/129/2014

CONFLICTO DE INTERESES

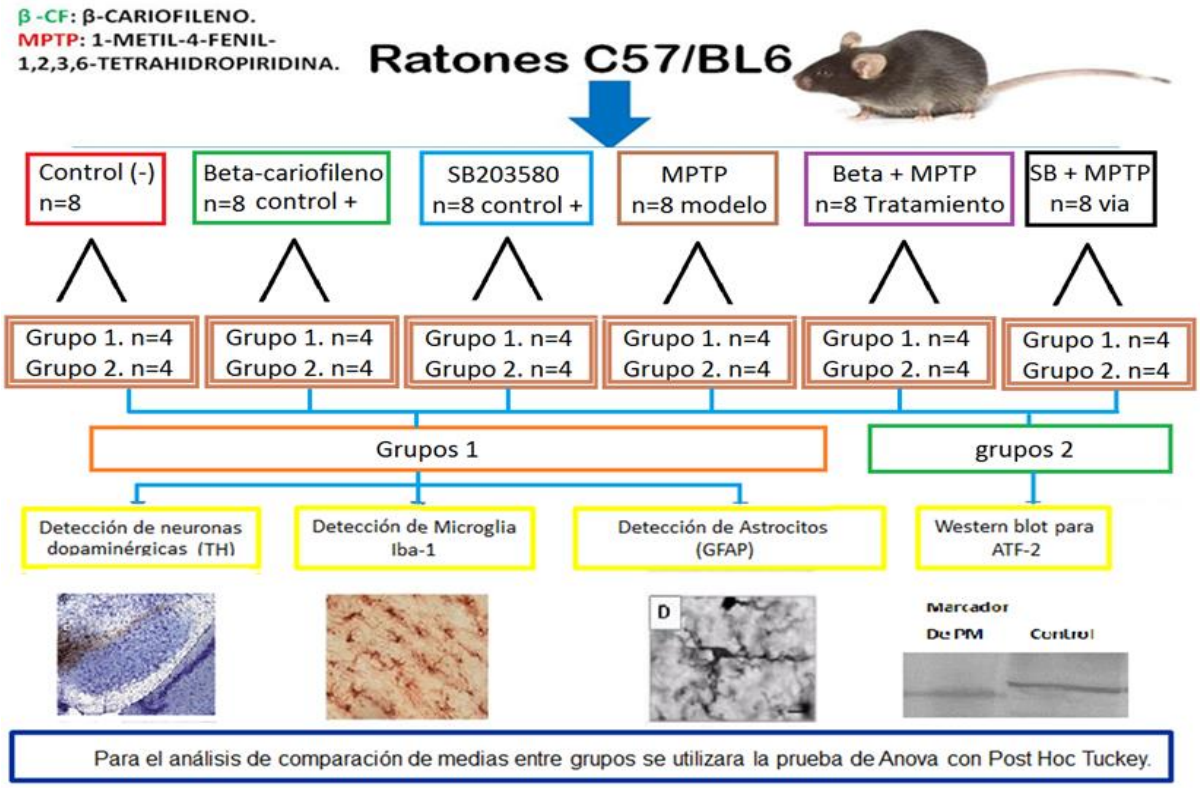
El estudio se presenta sin conflictos de intereses

FINANCIAMIENTO

El estudio no contó con financiamiento aunque se realizó en las instalaciones del laboratorio de Inmunofarmacología del Centro Universitario de Ciencias Exactas de

Ingeniería, se obtuvo recurso por parte del Doctorado en Farmacología para la compra de el anticuerpo Iba-1, MPTP y el inhibidor de p38 SB203580.

Diagrama Experimental

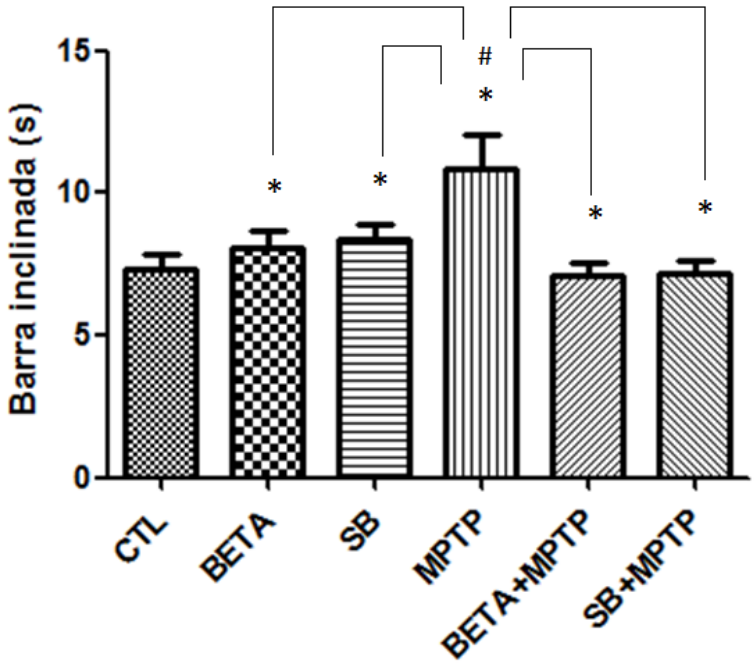


RESULTADOS

Determinación y comparación de la coordinación motriz de los ratones

Barra inclinada

Entre las características de la EP se encuentra el déficit motor, para estudiar este aspecto fue evaluado mediante el equilibrio en la prueba de barra inclinada. Los resultados muestran que el tiempo promedio que tardaron los ratones control en cruzar la barra fue de 7.30±0.52 segundos, mientras que los ratones expuestos a MPTP tardaron 10.80±1.15 segundos, con significancia estadística comparados contra el grupo control. En contraste, en los grupos tratados con beta-cariofileno previo a la administración de MPTP, se observó un descenso en el tiempo que tardaron los animales en cruzar la barra de 7.90±0.47 segundos, con significancia estadística respecto al grupo de MPTP. El SB203580 previo a la administración de MPTP, revirtió significativamente los efectos inducidos del MPTP ($p<0.05$). En el grupo tratado solamente con beta-cariofileno y SB203580 no se presentaron diferencias estadísticas respecto al grupo control (Gráfica 1).

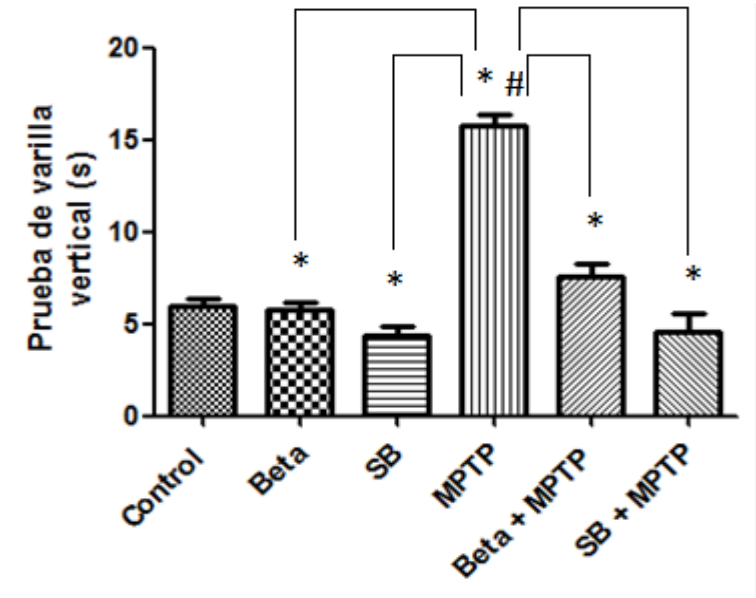


Gráfica 1. Evaluación sensorimotora en barra inclinada Se representa la evaluación de la coordinación motriz de los ratones por grupos de estudio medida en segundos, con Anova y posthoc de Tuckey. # diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control versus el grupo MPTP con una $p<0.001$, * diferencia estadísticamente significativa entre el grupo MPTP VS BETA, SB, BETA+MPTP y SB+ MPTP con una $p<0.05$.

Prueba de Poste

El efecto el beta-cariofileno en la función motora del ratón fue juzgado con la prueba de poste. Los ratones fueron examinados bajo condiciones basales previa administración de MPTP. El déficit en la coordinación motora fue claramente observado en los ratones tratados con MPTP, ya que presentaron la más severa discapacidad, en ejecutar esta prueba, con un desempeño de 17.51±0.59 segundos al girar a través de la cima y al descender el poste, en comparación con el grupo control 6.0±0.36 segundos. La administración de 10 mg/kg de beta-cariofileno previo a la administración de MPTP mostró una mejora en el tiempo de ejecución (7.32±0.65 segundos) de esta prueba, siendo estadísticamente significativo respecto a MPTP. La administración de SB203580, previo a la administración de MPTP,

también demostró revertir significativamente los efectos de discapacidad motora generados por el MPTP en la prueba de poste ($p<0.05$). En los grupos tratados solamente con beta-cariofileno y SB203580 no hubo significancia estadística comparados contra el grupo control (Gráfica 2).



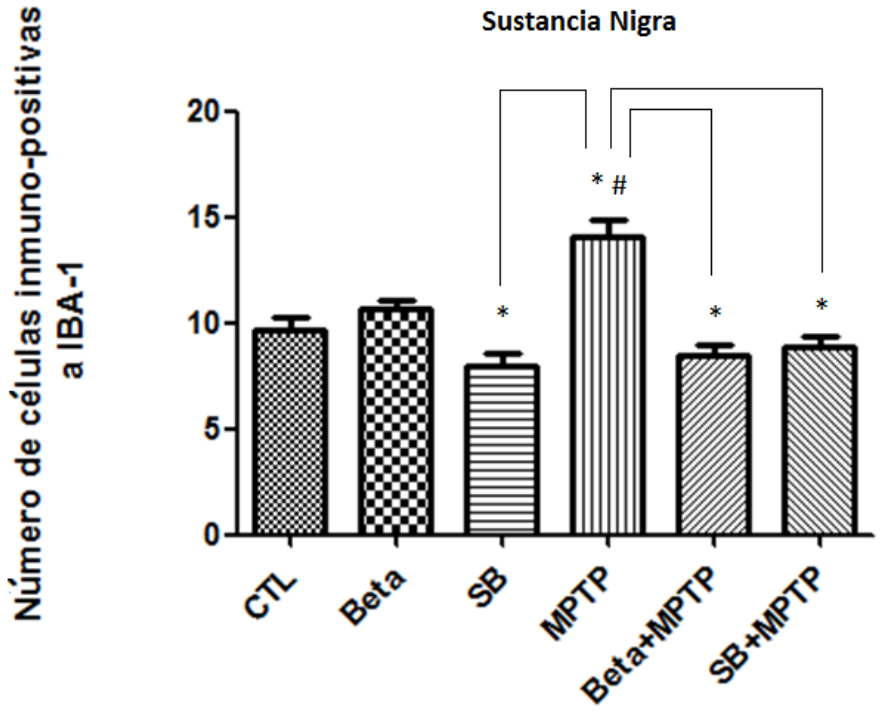
Gráfica 2. Evaluación sensorimotora en prueba de varilla vertical. Se representa la evaluación de la coordinación motriz de los ratones por grupos de estudio medida en segundos, con Anova y posthoc de Tuckey. # diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control versus el grupo MPTP con una $p<0.001$, * diferencia estadísticamente significativa entre el grupo MPTP VS BETA, SB, BETA+MPTP y SB+ MPTP con una $p<0.05$.

Detección y comparación de activación de la microglia y astrogliosis.

Microglia *Sustancia Nigra*

En la gráfica 3 se observa los cortes histológicos de los diferentes grupos de tratamiento. En el grupo tratado con MPTP se observa una gran cantidad de células inmunorreactivas a iba-1 (14.11±0.79 células) comparadas con el grupo control (9.64±0.57 células) siendo estadísticamente significativa. La administración de 10 mg/kg de beta-cariofileno, previos a la administración de MPTP, provocó una disminución estadísticamente significativa en la inmunorreactividad de las células de

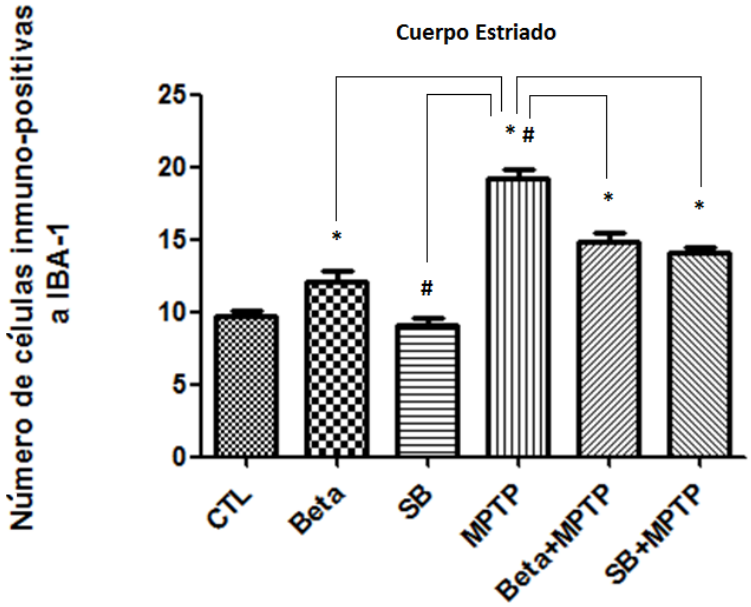
la microglia (8.49±0.45 células) respecto al grupo de MPTP (14.11±0.79 células). La administración de SB203580, previa a la administración de MPTP, indujo también una disminución estadísticamente significativa en dicha inmunorreactividad ($p<0.05$). En los grupos tratados únicamente con beta-cariofileno y SB203580 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control (Gráfica 3).



Gráfica 3. Evaluación de actividad de células de la microglia mediante el anticuerpo Iba-1 en sustancia nigra. Se representa la evaluación de activación de las células de la microglia en la sustancia nigra mediante el anticuerpo Iba 1 en los cortes de los diferentes grupos de estudio de los ratones cuantificando la media del número de células por campo, con Anova y posthoc de Tuckey. # diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control versus el grupo MPTP con una $p<0.05$, * diferencia estadísticamente significativa entre el grupo MPTP VS SB, BETA+MPTP y SB+ MPTP con una $p<0.05$.

Microglia cuerpo estriado

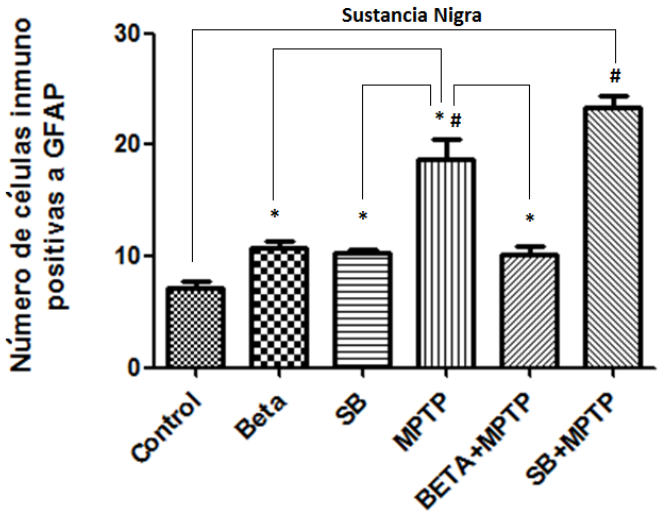
En la gráfica 4 se observa los cortes histológicos de los diferentes grupos de tratamiento. En el grupo tratado con MPTP se observa una gran cantidad de células inmunorreactivas a iba-1 (19.17±0.71 células) comparadas con el grupo control (9.71±0.42 células) siendo estadísticamente significativa. La administración de 10 mg/kg de beta-cariofileno, previos a la administración de MPTP, provocó una disminución estadísticamente significativa en la inmunorreactividad de las células de la microglia (14.78±0.68 células) respecto al grupo de MPTP (19.17±0.71 células). La administración de SB203580, previa a la administración de MPTP, indujo también una disminución estadísticamente significativa en dicha inmunorreactividad ($p<0.05$). En los grupos tratados únicamente con beta-cariofileno y SB203580 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control (Gráfica 4).



Gráfica 4. Evaluación de inmunorreactividad de microglia mediante el anticuerpo Iba-1 en cuerpo estriado. Se representa la evaluación de activación de las células de la microglia en el cuerpo estriado mediante el anticuerpo Iba 1 en los cortes de los diferentes grupos de estudio de los ratones, cuantificando la media del número de células por campo, con Anova y posthoc de Tuckey. Diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y SB versus el grupo MPTP con una #$p<0.001$, diferencia entre el grupo MPTP VS BETA, BETA+MPTP y SB+ MPTP con una *$p<0.05$.

Astrocitos *Sustancia Nigra*

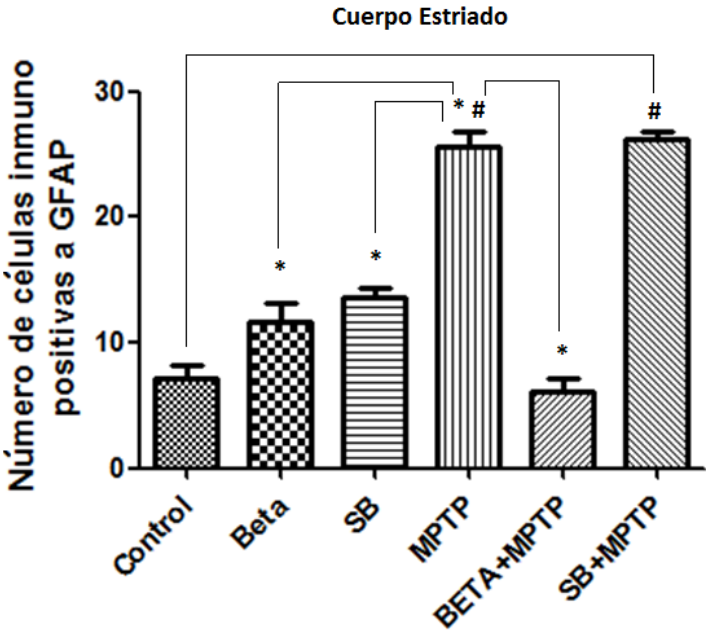
En la gráfica 5 se observa los cortes histológicos de los diferentes grupos de tratamiento. En el grupo tratado con MPTP se observa una gran cantidad de células inmunorreactivas a GFAP (18.69±1.75 células) comparadas con el grupo control (7.10±0.65 células) siendo estadísticamente significativa. La administración de 10 mg/kg de beta-cariofileno, previos a la administración de MPTP, provocó una disminución estadísticamente significativa en la inmunorreactividad de las células de la microglia (10.13±0.72 células) respecto al grupo de MPTP (18.69±1.75 células). La administración de SB203580, previo a la administración de MPTP, provocó un aumento en el número de astrocitos reactivos, siendo estadísticamente significativa en comparación al grupo control ($p<0.05$). En los grupos tratados únicamente con beta-cariofileno no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control (Gráfica 5).



Gráfica 5. Evaluación de actividad de células astrociticas mediante la detección de la proteína GFAP en sustancia nigra. Se representa la evaluación de activación de las células astrociticas en sustancia nigra mediante la detección dela proteína GFAP expresada al activarse, en los cortes de los diferentes grupos de estudio de los ratones, cuantificando la media del número de células por campo con Anova y posthoc de Tuckey. Diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control versus el grupo MPTP y SB + MPTP, con una #$p<0.001$, diferencia estadísticamente significativa entre el grupo MPTP VS BETA, BETA+MPTP y SB con una *$p<0.05$.

Astrocitos Cuerpo Estriado

En la gráfica 6 se observa los cortes histológicos de los diferentes grupos de tratamiento. En el grupo tratado con MPTP se observa una gran cantidad de células inmunorreactivas a GFAP (25.67±1.06 células) comparadas con el grupo control (7.11±1.10 células) siendo estadísticamente significativa. La administración de 10 mg/kg de beta-cariofileno, previos a la administración de MPTP, provocó una disminución estadísticamente significativa en la inmunorreactividad de las células de la microglia (6.06±1.11 células) respecto al grupo de MPTP (25.67±1.06 células). La administración de SB203580, previo a la administración de MPTP, provocó un aumento en el número de astrocitos reactivos, siendo estadísticamente significativa en comparación al grupo control ($p<0.05$). En los grupos tratados únicamente con beta-cariofileno no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control (gráfica 6, Figura 5).



Gráfica 6. Evaluación de actividad de células astrociticas mediante la detección de la proteina GFAP en cuerpo estriado. Se representa la evaluación de activación de las células astrociticas en cuerpo estriado mediante la detección dela proteina GFAP expresada al activarse dicha celula, en cortes de los diferentes grupos de estudio de los ratones, cuantificando la media del número de células por campo con Anova y posthoc de Tuckey. Diferencia estadisticamente significativa entre el grupo control versus el grupo MPTP y SB + MPTP, con una #$p<0.001$, diferencia estadisticamente significativa entre el grupo MPTP VS BETA y SB con una *$p<0.05$ y BETA+MPTP con una $p<0.001$.

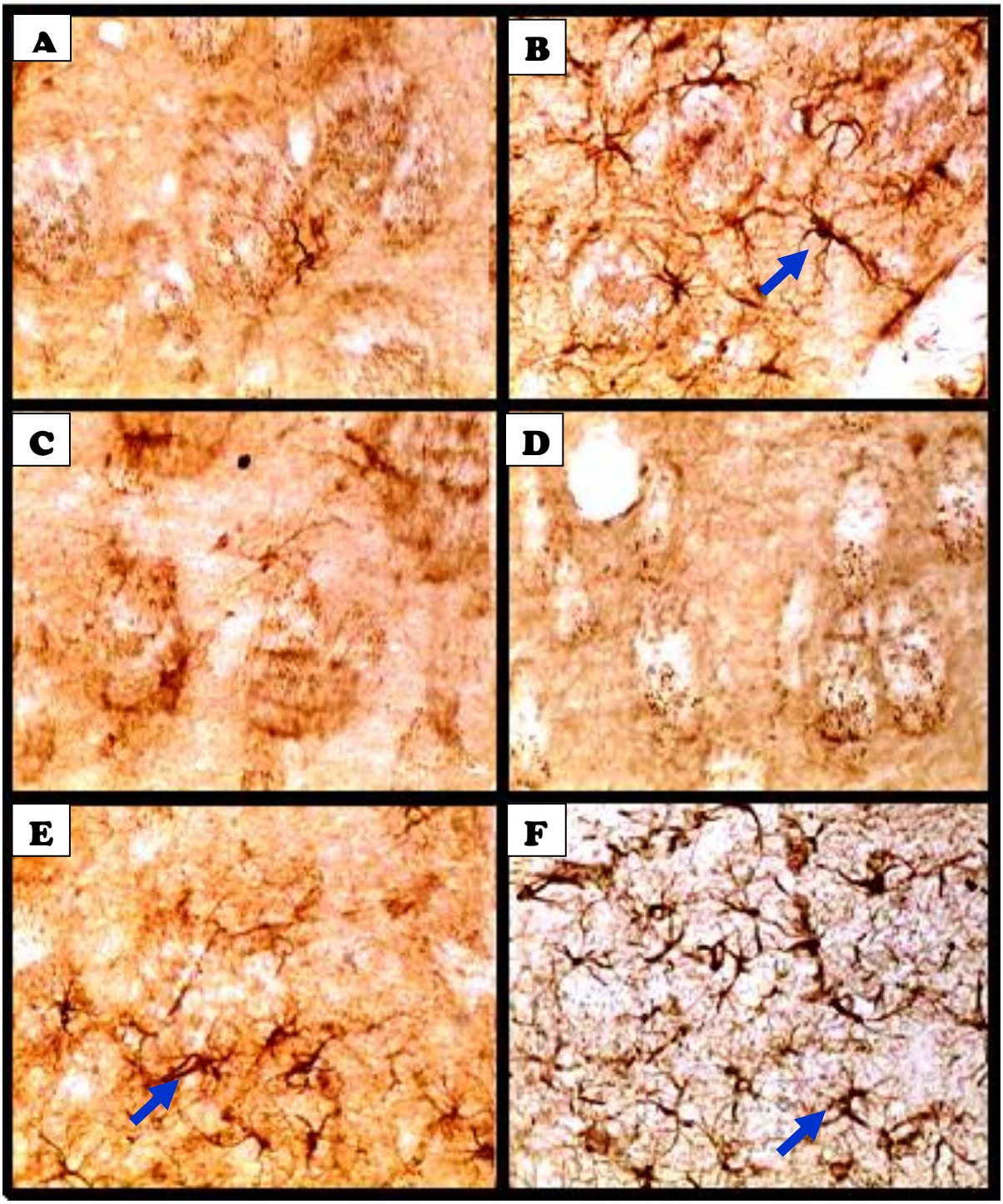
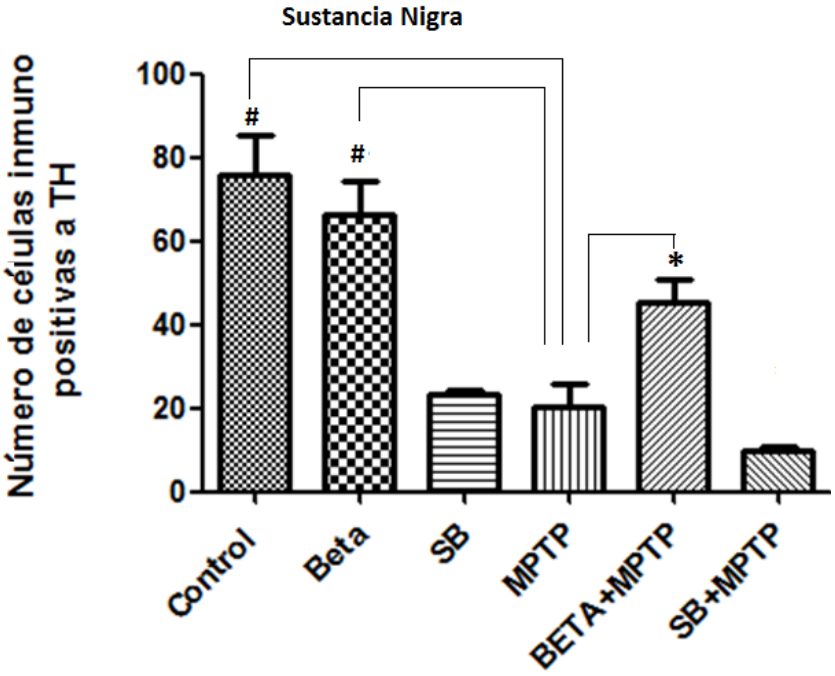


Figura 5. Se muestra una fotomicrografía representativa de la reactividad de GFAP para astrocitos en Cuerpo Estriado a 40X a 400 aumentos. **A. grupo A control** sin actividad astrocitica, **grupo B MPTP** con alta expresión de astrocitos, **grupo C BETA** sin actividad, **grupo D SB** sin actividad, **grupo E BETA + MPTP** con escaza astrogliosis, **grupo F SB + MPTP** se muestra un incremento en la reactividad de astrocitos respecto al control. ↗ Indica Astrocito reactivo o astrogliosis.

Inmunorreactividad de células dopaminérgicas en *Sustancia Nigra* y Cuerpo estriado.

Neuronas Dopaminérgicas en *Sustancia Nigra*

La administración de 30 mg/kg de MPTP provocó una disminución en el número de células (20.27±5.60 células) inmunopositivas a TH en la *sustancia nigra*, la cual es estadísticamente significativa en comparación con el grupo control (75.88±9.61 células). Por otro lado, la administración de beta-cariofileno (10mg/kg) por 5 días, antes de la administración de MPTP (45.51±5.55 células), produjo un aumento estadísticamente significativo en la inmunorreactividad de TH en comparación con el grupo tratado con MPTP (20.27±5.60 células). La administración de SB203580, previo a la administración de MPTP, provocó un descenso en el número de células neuronales dopaminérgicas inmunorreactivas, siendo estadísticamente significativa en comparación al grupo control ($p<0.001$). Además, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en el número de células inmunopositivas a TH entre el grupo tratado únicamente con beta-cariofileno respecto al grupo control. Aunque, el grupo tratado solo con SB203580 presento diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control con una $p<0.001$ (Gráfica 7).

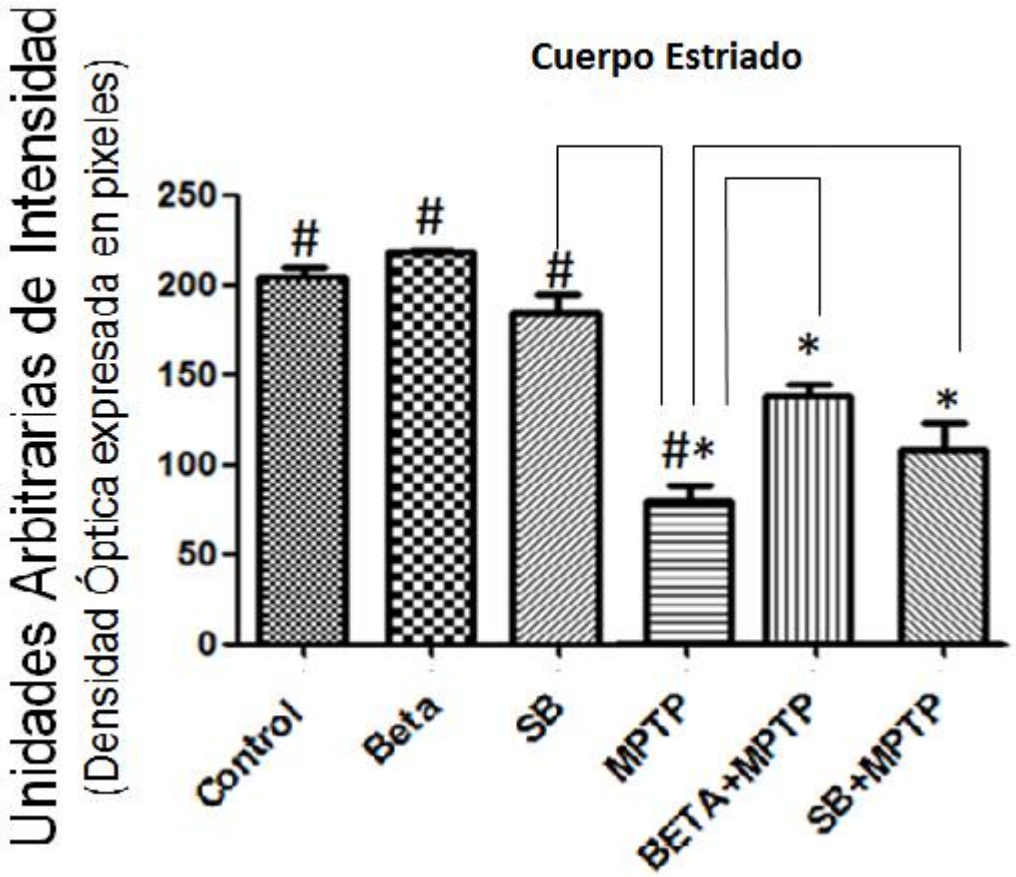


Gráfica 7. Evaluación de la presencia de células neuronales dopaminérgicas. Se detecta la presencia de neuronas dopaminérgicas mediante la detección de Tirosin Hidroxilasa enzima necesaria para la formación de dopamina a partir de precursores, en la sustancia nigra en cortes de los diferentes grupos de estudio de los ratones, cuantificando la media del número de células por campo con Anova y posthoc de Tuckey. Diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control versus el grupo MPTP y el grupo MPTP vs el grupo Beta-cariofileno con una #p<0.001, diferencia estadísticamente significativa entre el grupo MPTP VS BETA + MPTP con una *p<0.05.

Fibras Dopaminérgicas en Cuerpo Estriado

La administración de 30 mg/kg de MPTP provocó una disminución en el número de fibras dopaminérgicas (79.39±8.34 pixeles) inmunopositivas a TH en cuerpo estriado, la cual es estadísticamente significativa en comparación con el grupo control (204.40±4.67 pixeles). Por otro lado, la administración de beta-cariofileno (10mg/kg) por 5 días, antes de la administración de MPTP (138.70±5.49 pixeles), produjo un aumento estadísticamente significativo en la inmunorreactividad de TH en comparación con el grupo tratado con MPTP (79.39±8.34 pixeles). La administración de SB203580, previo a la administración de MPTP, provocó un aumento en el número de fibras neuronales dopaminérgicas inmunorreactivas, siendo

estadísticamente significativa en comparación al grupo de MPTP ($p<0.05$). Además, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en el número de fibras inmunopositivas a TH entre los grupos tratados únicamente con beta-cariofileno y sb203580 respecto al grupo control (Gráfica 8, Figura 6).



Gráfica 8. Evaluación de la presencia de axónes de células neuronales dopaminérgicas. Se detecta la presencia de axónes de neuronas dopaminérgicas mediante la detección por densitometría, en el cuerpo estriado en cortes de los diferentes grupos de estudio de los ratones, cuantificando la media del número de células por campo con Anova y posthoc de Tuckey. Diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control versus el grupo MPTP y el grupo MPTP vs el grupo Beta-cariofileno, SB, con una #$p<0.05$, diferencia estadísticamente significativa entre el grupo MPTP VS beta-cariofileno + MPTP y SB + MPTP con una *$p<0.001$.

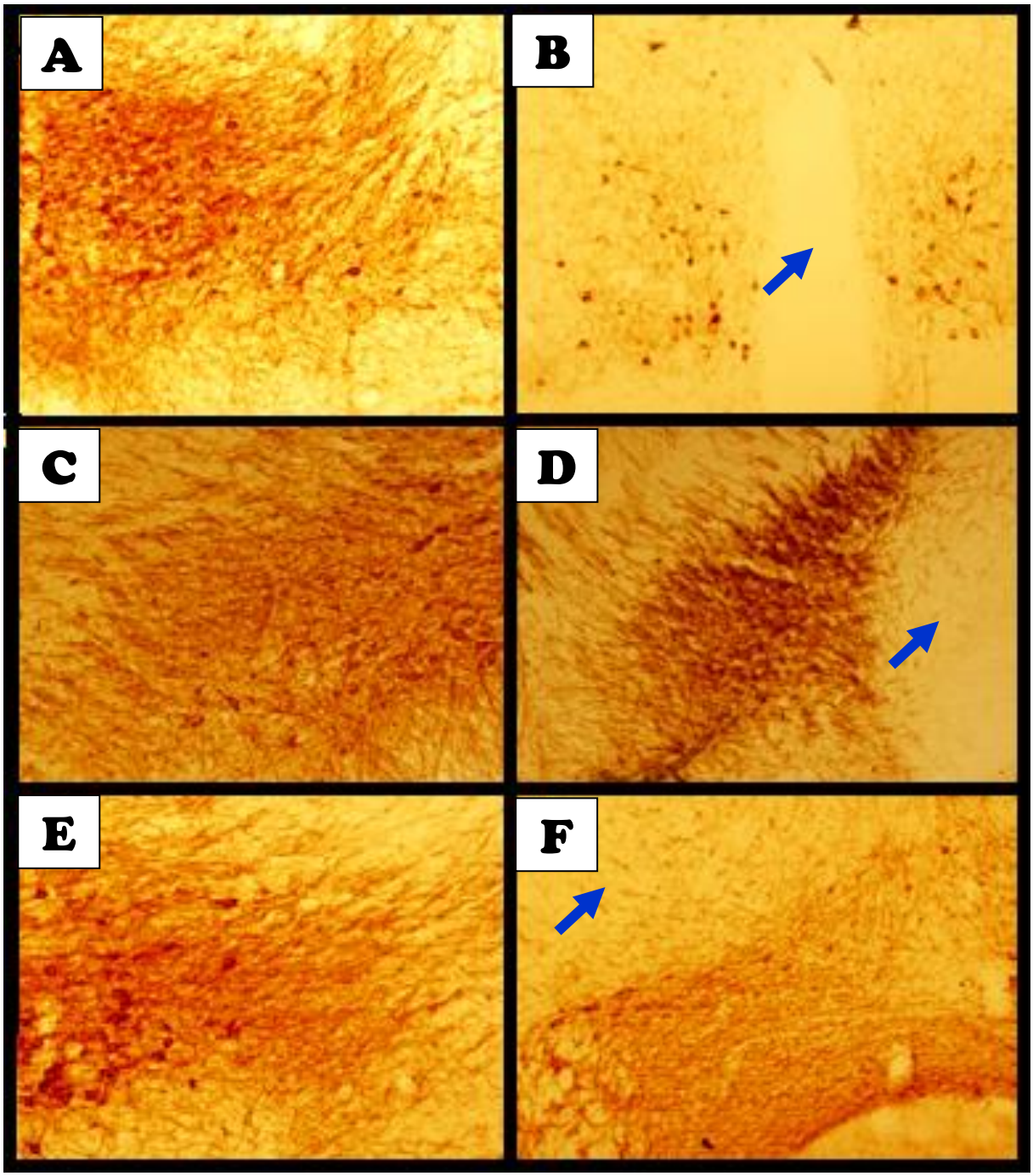
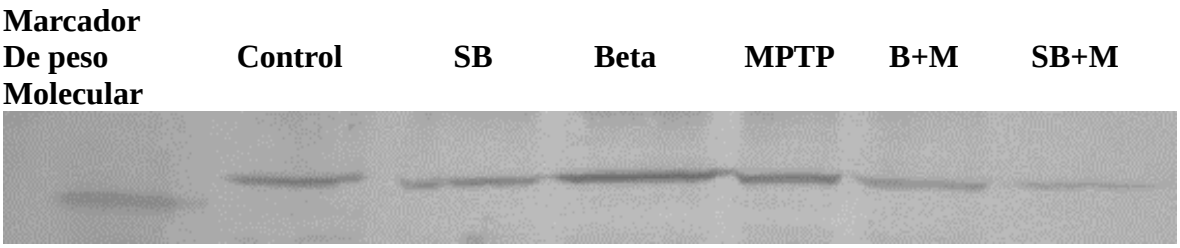
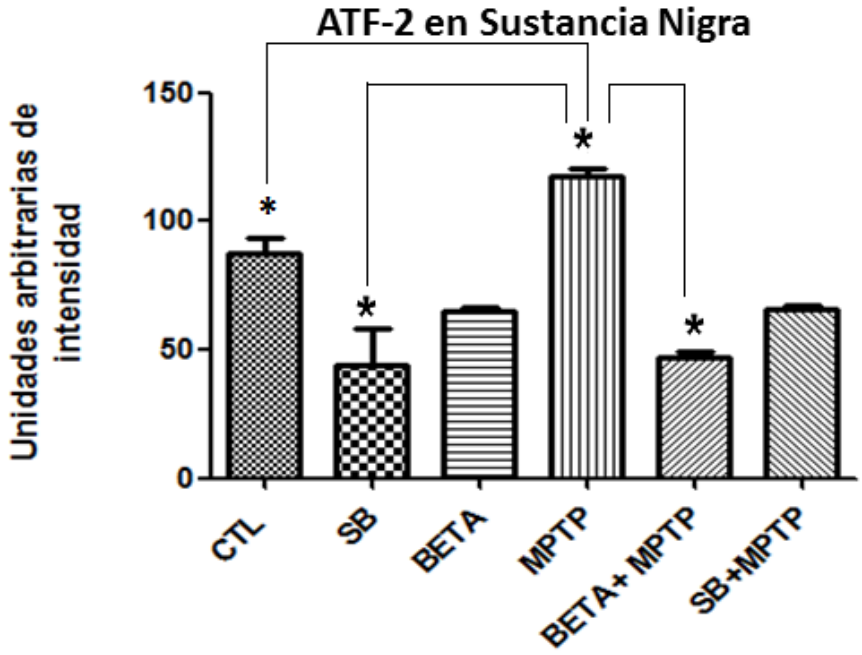


Figura 6. Se muestra una fotomicrografía de TH en Sustancia Nigra tomadas del microscopio de luz a 10X a 100 aumentos. **Grupo A control** gran cantidad de neuronas dopaminérgicas, **grupo B MPTP** con ausencia de neuronas dopaminérgicas, **grupo C BETA** gran cantidad de neuronas dopaminérgicas, **grupo D SB** con abundante presencia de neuronas dopaminérgicas**, Grupo E BETA + MPTP** con gran cantidad de neuronas dopaminérgicas, **grupo F SB + MPTP** regular cantidad de células dopaminérgicas. ↗ Indica las áreas claras que significa ausencia de puntilleo o manchado pardo negruzco de la neuromelanina de las neuronas dopaminérgicas reactivas a anti-TH.

Expresión de ATF-2 en *Sustancia Nigra*

La gráfica 9 muestra los niveles de expresión de ATF-2 que es el sustrato de la fosforilación de la vía p38 MAPK en cuerpo estriado, los resultados muestran un aumento en la fosforilación de ATF-2 en los grupos tratados con MPTP de un 33% siendo estadísticamente significativo con respecto al grupo control. La administración de 10 mg/Kg de beta-cariofileno provoca una disminución en los niveles de expresión de la proteína ATF-2 de un 150% respecto al grupo tratado con MPTP. El grupo tratado con SB previo a la administración de MPTP provoca una disminución en los niveles de expresión de esta proteína, siendo estadísticamente significativo. En los grupos tratados únicamente con beta- cariofileno y sb203580 no se observan diferencias con respecto al grupo control (gráfica 9).

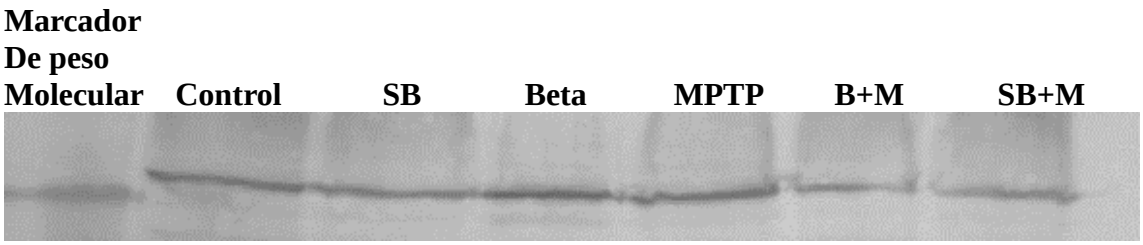


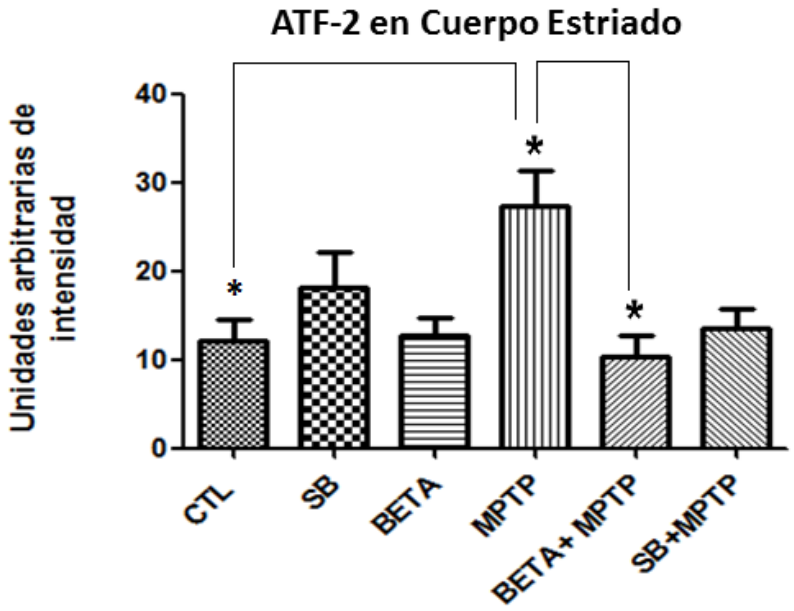


Gráfica 9. Evaluación de la presencia del producto de p38 fosforilada en Sustancia Nigra, ATF-2. Se evaluó la presencia de ATF-2 que es un producto de la activación de p38 fosforilada, que activa las vías de apoptosis de las células en general por la vía de las MAPK, se realizó mediantes western blot cuantificando la intensidad de la banda de cada uno de los grupos de estudio mediante un software especializado que maneja unidades arbitrarias de intensidad de acuerdo a un control estandarizado, se analizó la media de grupos mediante Anova y posthoc de Tuckey. Diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control versus el grupo MPTP con una *p<0.001, diferencia estadísticamente significativa entre el grupo SB y MPTP VS BETA + MPTP con una *p<0.001.

Expresión de ATF-2 en *Sustancia Nigra* y Cuerpo Estriado.

La gráfica 10 muestra los niveles de expresión de ATF-2 que es el sustrato de la fosforilación de la vía p38 MAPK en cuerpo estriado, los resultados muestran un aumento en la fosforilación de ATF-2 en los grupos tratados con MPTP de un 125% siendo estadísticamente significativo con respecto al grupo control. La administración de 10 mg/Kg de beta-cariofileno provoca una disminución en los niveles de expresión de la proteína ATF-2 de un 170% respecto al grupo tratado con MPTP. El grupo tratado con SB previo a la administración de MPTP provoca una disminución en los niveles de expresión de esta proteína, siendo estadísticamente significativo. En los grupos tratados únicamente con beta- cariofileno y sb203580 no se observan diferencias con respecto al grupo control (gráfica 10).





Gráfica 10. Evaluación de la presencia del producto de p38 fosforilado en Cuerpo Estriado, ATF-2. Se evaluo la p´resencia de ATF-2 que es un producto de la activación de p38 fosforilado, que activa las vias de apoptosis de las células en general por la vía de las MAPK, se realizo mediantes wester blot cuantificando la intensidad de la banda de cada uno de los grupos de estudio mediante un sofwatreespecializado que maneja unidades arbitrarias de intensidad de acuerdo a un control estandarizado, se analizo la media de grupos mediante Anova y posthoc de Tuckey. Diferencia estadisticamente significativa entre el grupo control versus el grupo MPTP con una *p<0.001, diferencia estadisticamente significativa entre el grupo MPTP VS BETA + MPTP con una *p<0.001.

DISCUSIÓN

Modelo de parkinsonismo y Células neuronales dopaminérgicas.

El desarrollo del modelo murino de caracterisitcas crónicas, fue desarrollado sin anormalidades, no se presentó ningun deceso de la n muestral, a diferencia de los demas modelos donde se utiliza ratas y otros tipo de neurotoxina, el raton negro BL6 tiene especial suceptibilidad por el metabolito MPP+. Su carga genética le confiere predisposición al daño por esta neurotoxina al presentar alto contenido de neuromelanina, subproducto del metabolismo de dopámina, quele confiere una coloración “peculiar negruzca” a las áreas y células que contiene y metabolizan dopamina. Los ratones ancianos de esta clase de ratones tambien presentan un mayor daño en sus mitocondrias, aunque se desconoce la causa. En este estudio se demostro que con la dosis empleada de 30 mg/kg de MPTP, aplicado durante 5 dias, se produce un modelo de parkinsonismo murino efectivo para evaluar las variables de movimiento, activacion, astro-microglial y activación de la via p38.

La presencia del compuesto de Betacariofileno, previa a la administración de la tóxina neurodegenerativa de MPTP, demostró generar protección de las células neuronales dopaminérgicas evitando el daño motriz y poniendo en evidencia el efecto neuroprotector que este compuesto puede generar, rivalizando con la efectividad de la actividad farmacologica del inhibidor SB203580 el cual, como lo mencionamos anteriormente, impide la activación de la enzima p38 MAPK inhibiendo su fosforilación, por tanto deducimos de acuerdo a las pruebas realizadas, que al tener una baja en la expresion de ATF-2, producto de p38 MAPK fosforilada, Se

confirmó la inhibición de esta vía por la cual el beta-cariofileno ejerce su función neuroprotectora inhibiendo la apoptosis de las neuronas dopaminérgicas (Turu G. 2010), estos mismos autores mencionan en su revisión que distintas estirpes celulares reaccionan diferente a la activación de los receptores dopaminergicos. Algunas células neuronales corticales ejercen la activación de la vía de sobrevida ERK1/2 y otras la via de apoptosis p38 y JNK, de acuerdo al grado de madurez que tengan o el secuestro o no de la proteína Gi/o. En este caso en particular, de las células dopaminergicas estimuladas por betacariofileno mediante su receptor CB2, podemos aseverar que se activa la proteina Gi/o, inhibiendo la adenilcyclasa lo cual inhabilita la cascada abajo la activación o fosforilación de P38 y JNK, impidiendo la apoptosis de las neuronas y activando la vía de sobrevida ERK1/2. El papel de los cannabinoides, especialmente el beta-cariofileno se debe de ampliar mas ya que no hay datos disponibles respecto a su actividad en diversas estirpes celulares y si al igual que otros cannabinoides desempeña un papel de neuroprotección al inhibir la vía p38 o al intervenir en procesos de estrés oxidativo, neuroinflamación, e isquemias cerebales o un papel de acción antitumoral como en diversos linfomas, cancer de mama, carcinoma de piel, epitelioma tiroideo u otros estirpes neuronales, entre otros (Guzman 2003, Caffarel 2012). Y determinar si dentro de las propiedades farmacologicas de beta-cariofileno encontramos esta dualidad.

Comportamiento de astrocitos y microglia.

Respecto al comportamiento de astrocitos y microglia con la activación de los receptores CB2 por el beta-cariofileno, podemos inferir que al inhibir la fosforilación de p38 se ve disminuida la activación de células microcliales. Ya que cuando se

administró el inhibidor SB203580 se logro evitar la activación de dichas células y se obtuvo el efecto inverso en los tejidos donde el daño era mayor y la actividad de algun inhibidor de p38 ausente. Algunos autores mencionana que la micloglia en reposo expresa solamente el receptor CB1, mientras que la microglia activada posee ambos receptores en su membrana, incluso se menciona un receptor parecido a cannabinoide o receptor cannabinoide no CB1, no CB2 que puede ser el que regula el proceso de activación; y el cambio de fenotipo de microglia activada de proinflamatoria a antiflamatoria, y asi regular el proceso de reparación en el tejido cerebral dañado (cabral 2005). Por tanto, la regulación del receptor CB1, CB2 y el receptor parecido al receptor cannabinoide podrian modular favorablemente la microglía activada para llevarla sobre la vía de sobrevida celular ERK1/2 y regular el proceso inflamatorio y de reparación al secretar citocinas antiinflamatorias. Al ser agonizados por beta-cariofileno; en nuestros resultados mostramos en el grupo control la presencia de microglia activa, esto se debe a que hay una actividad basal de esta celula debido a las condiciones de reparación cerebal y apoptosis que se genera como proceso fisiologico, en el grupo de SB se demostró que es capaz de inhibir la actividad basal de estas células inmunes, pero en el grupo Beta-cariofileno no hay una inhibición tan marcada respecto al grupo SB concordando con los resultados de Cabral en 2005, donde la microglia no expresa el receptor CB2, para corroborar esto necesitariamos en un segundo abordaje marcar el receptpr CB2 en los grupos de estudio. En la regulación de astrocitos por parte de la activación de los receptores cannabinoides tipo 1 y 2 encontramos cierto dilema en los resultados, ya que, beta-cariofileno evitó la astrogliosis, pero el inhibidor de p38 SB203580 presentó una alta reactividad de dichas células, en la bibliografia se describe que los

astrocitos despues de una lesion postoperatoria que ocasiona dolor genera la activación de la vía p38 MAPK (Alkaitis 2010). Al administrar en el presente estudio el inhibidor de p38 esperabamos encontrar niveles decendidos de astrogliosis con respecto al grupo problema de MPTP y SB, sin embargo, encontramos niveles de reactividad astrocitica muy similares o ligeramente superior en SB. En el grupo de beta-cariofileno, sí se encontró descenso de gliosis reactiva, esto podria ser explicado por las diastintas vías que se activan al agonizar el receptor CB2, que no solo incluyen ERK1/2 y p38 (zhu 2016), tambien JNK se ve implicada (Yi 2016). Al inhibir p38 con SB203580 dejamos libres las otras vias y esta al ser una estirpe celular diferente a la microglía y tener otro origen podria justificar el diferente proceso de activación. Algunos autores mencionan que, al activar los receptores cannabinoides en diferentes tejidos se obtuvieron diferentes respuestas, algunas propiciaban la vía de sobrevida y otras la vía de apoptosis, al ser el astrocito una celula reparadora y de sosten, tendra un grado de madurez diferente al de la microglia, o incluso que no sea propiamente el agonismo de los receptores el que genere esta diferencia entre SB203580 y beta-cariofileno, sino las propiedades antioxidantes o antiexcitotóxicas que se le atribuyen a nuestra molecula de prueba.

.

Pruebas de evaluación Sensorimotoras

En las pruebas sensorimotoras se demostró la potencia neuroprotectora de ambos compuestos, beta-cariofileno y el inhibidor de p38 SB203580, al demostrar que estos grupos tuvieron un desempeño mejor que el gupo de MPTP. Estos dos grupos presentaron similares resultados en la barra inclinada y fue un poco mas efectivo el de SB203508 poste fijo; debido a que esta prueba exige un movimiento mas fino al

sostenerse del poste al ascender unos centimetros y girar para descender hasta piso. Aunque los demás grupos también tuvieron diferencias estadísticamente significativas contra el grupo que genero más daño motriz (MPTP) vemos que la influencia del inhibidor SB203508 y Beta-cariofileno, previa a la administración de la molécula neurodegenerativa, genera protección del daño demostrando niveles muy parecidos al grupo control y a los grupos controles positivos con solo betacariofileno y SB203508 que carecen de daño motriz. Se comprobó con los metodos descritos (Flemming 2013) la capacidad de las pruebas para evaluar los desordenes neurodegenerativos y parkinsonismo. A pesar de encontrar mejor desempeño de los ratones tratados solo con beta-cariofileno y SB203580 sin lesiones, vemos que los ratones que fueron tratados con estas drogas presentan un desenvolvimiento similar al control evidenciando el papel de ambos grupos como controles positivos..

Con respecto a las células inmunoreactivas al anticuerpo contra tirosin hidroxilasa en *sustrancia nigra* la cantidad de células en el grupo problema con MPTP se encontró con niveles un tercio menores del grupo control y niveles similares al grupo SB. A su vez el grupo control presentó niveles similares al grupo de beta-cariofileno, el grupo de betacariofileno + MPTP presentó niveles por arriba de la mitad del grupo control, dejando en evidencia la clara viabilidad de las células neuronales dopaminérgicas frente a la neurodegeneración de la tóxina. Un hallazgo en esta prueba fueron los niveles de células dopaminérgicas que se encontraron en el grupo SB+ MPTP, que fué más bajo de todos, se esperaba niveles similares al betacariofileno + MPTP, pero la neuroprotección que genera beta-cariofileno respecto a SB es mayor. Probablemente hay alguna otra variable o via en la cual betacariofileno actua y

genera una protección mayor que solo la inhibición de la p38 MAPK. Creemos que podria ser la actividad antioxidante que genera el beta-cariofileno al activar los endocannabinoides y al activarse la astrogliosis por la via JNK esta provoca la neurodegeneración en las células dopaminérgicas en el grupo SB. A pesar de la neurodegeneración en este grupo vemos que se mantiene la actividad motriz al igual que los demas grupos, esto se relaciona a que las células neuronales dopaminérgicas restantes, tras la lesión del MPTP y astrogliosis reactiva, mantienen la capacidad motriz viable por su plasticidad neuronal: aumento de sus prolongaciones axónicas, optimización de la función sinaptica, aumento de la producción de catecolaminas (Calebressi 2007).

Dentro de las fortalezas del estudio encontramos que se evalua la cascada de las MAPK desde la activacion por fosforilación de p38 hasta la activación de las células inmunologicas. seria oportuno complementar en estudios posteriores la investigación midiendo las citocinas proinflamatorias que seria el producto final de la vía de activación de apoptosis celular y activación de las células del sistema inmunologico cerebral, tambien hacer un marcaje para receptor CB2 y corroborar la participación de la via JNK en la astriogliosis y su relación con el beta-cariofileno.

Beta-cariofileno al ser una particula relativamente nueva, esta en constante evaluación de sus variables farmacocinéticas y farmacodinámicas, en el presente estudio no se encontro ningun dato de toxicidad a la adminnistración de la molecula en los ratones, no hubo decesos ni presentaron anormalidades en su comportamiento, Se considera que es un compuesto inocuo, ya que, se consume abundantemente en la dieta en diversos alimentos como son: especias y algunas frutas cítricas o grasas, hiervas de olor, entre otras (Gertsch J.2008) y en el presente

estudio se demostró que no hay efectos que evidencien la toxicidad. Dentro de las capacidades farmacológicas que se le atañen al beta-cariofileno son la antinflamatoria y neuroprotectora, que al inhibir la via p38 y evitar la reactividad de astrocitos y microglia. Se inhibe la secreción de interleucinas pro-inflamatorias, por las células inmunológicas, pero también activa la vía de sobrevida ERK y evita el estrés oxidativo en las neuronas dopaminérgicas, protegiendo la cadena respiratoria y mitocondrias; favoreciendo y propiciando la actividad farmacológica de neuroprotección de beta-cariofileno. Estas propiedades farmacológicas de esta molécula en estudio lo hace un potencial tratamiento para la enfermedad de Parkinson y parkinsonismo secundario, por lo cual se sugiere que pueda ser empleada para estudios clínicos de fase 1, por su actividad prometedora como neuroprotector y su innocuidad y presencia en la dieta común.

Figura 7. Se muestra el daño sobre las neuronas dopaminérgicas cuando se administra MPTP, provocando la muerte neuronal dopaminérgica y en otro grupo la administración previa de betacariofileno, evidenciando la viabilidad de la celula neuronal (neuroprotección).

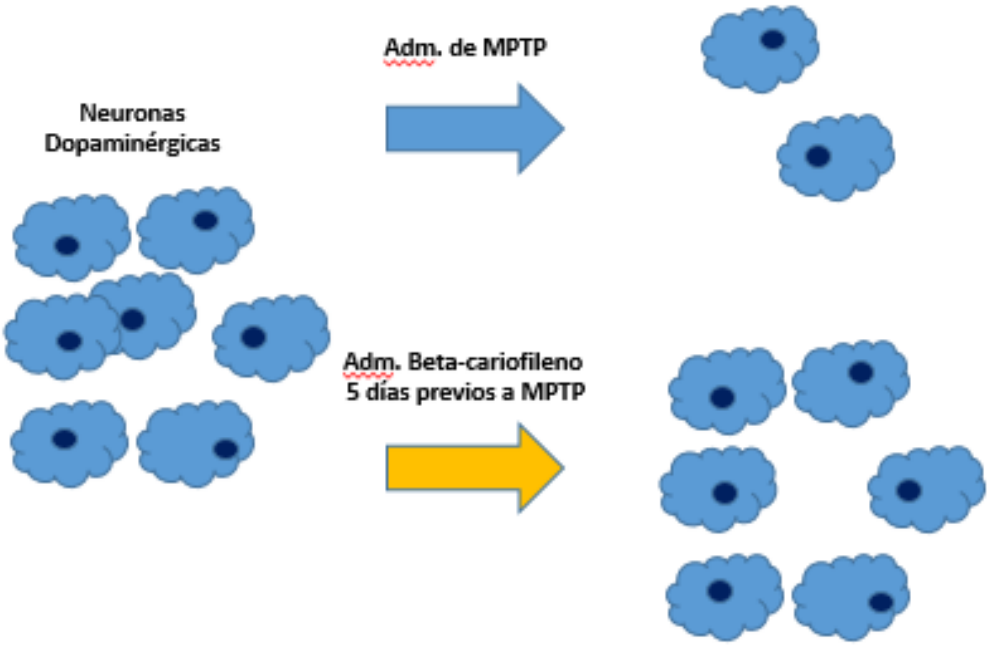


Figura 8. Se muestra la activación de astrocitos y su migración al lugar de daño donde se metaboliza el MPTP y se muestra la inactivación de astrocitos tras la administración 5 dias de beta-cariofileno previa aMPTP.

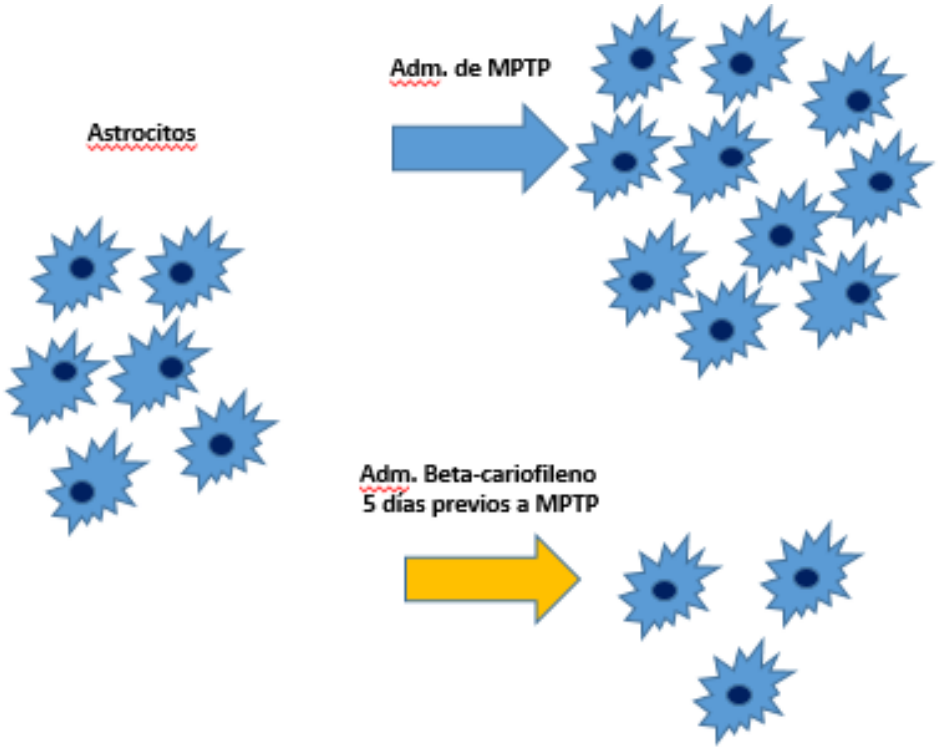
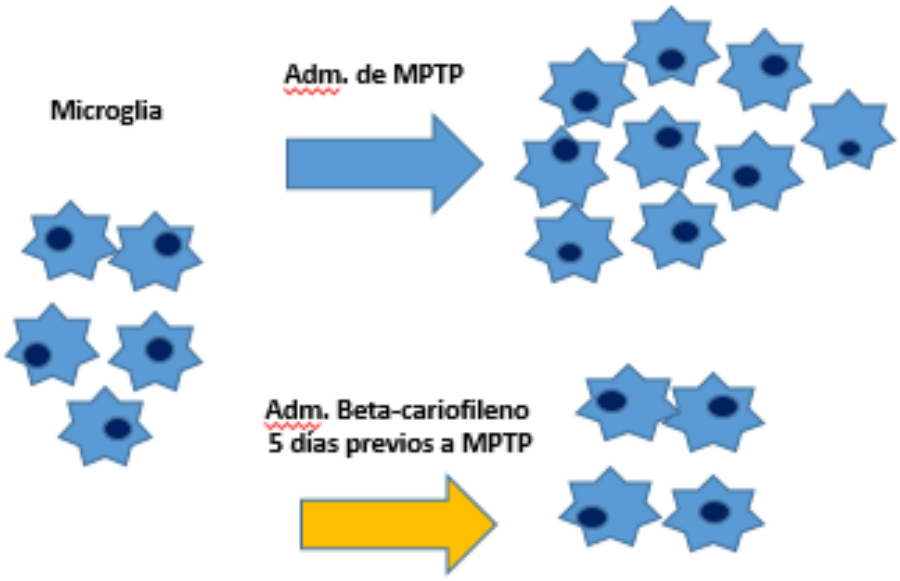


Figura 9. Se muestra la activación de astrocitos y su migración al lugar de daño donde se metaboliza el MPTP y se muestra la inactivación de astrocitos tras la administración 5 dias de beta-cariofileno previa aMPTP.



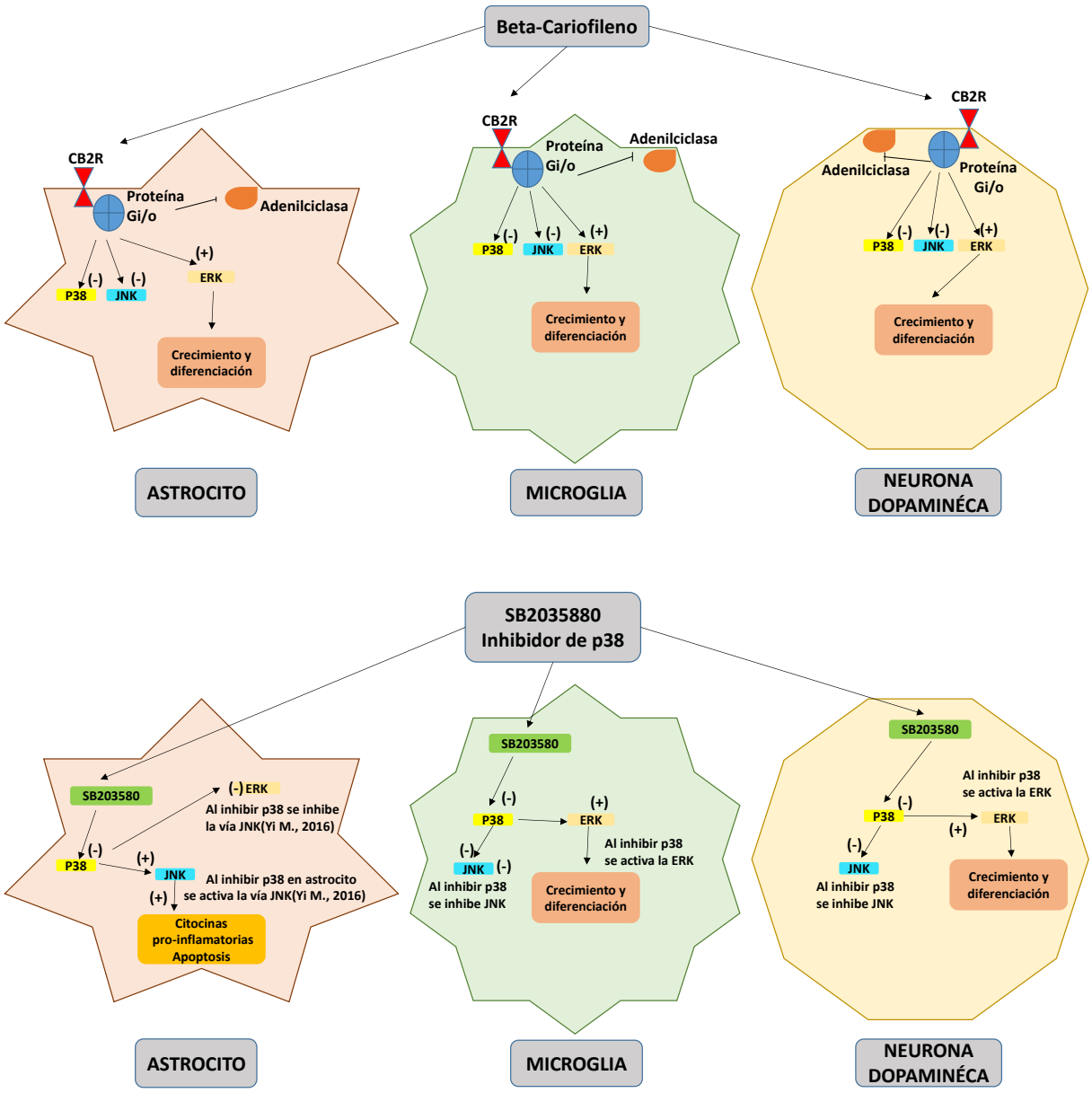


Figura 10. Se muestra la acción farmacológica del beta-cariofileno y el inhibidor SB203580 a nivel molecular. **Superior:** se muestra una célula astrocitica la cual es estimulada al activar el receptor cannabinoide tipo 2 con beta-cariofileno, como respues se inicia una serie de señales donde se inhibe adenilciclasa, p38 y JNK, activandose ERK y la vía de sobrevida celular inhibiendo astrogliosis. Lo mismo sucede con la microglía inhibiendo su activación y con la neurona dopaminérgica activando su sobrevida. **Inferior:** se muestra una célula astrocitica la cual al ingresar a la célula el inhibidor SB203580, como respues se inicia una serie de señales donde se inhibe p38 y como consecuencia se inhibe ERK, pero inferimos (según Yi 2016) que la vía JNK activa la astroglíosis. En microflia tambien se inhibe p38 como respuesta, pero en esta estirpe celular, no se activa JNK como consecuencia y si se activa ERK lo que lelva a sobrevida celular. Con la célula dopaminérgica sucede lo mismo que con microglía.

CONCLUSIONES

1. Beta cariofileno y El inhibidor de p38 SB203580 mantienen y mejoran la coordinación motriz en el modelo murino de parkinsonismo.

2. Beta-cariofileno y el inhibidor de p38 SB203580 inhiben la reactividad de las células de la microglía en un modelo murino de parkinsonismo.

3. Beta-cariofileno protege a las células neuronales dopaminergicas de la citotoxicidad generada por la neurotixina MPTP en un modelo de parkinsonismo.

4. Beta-cariofileno y el inhibidor de p38 SB203580 promueve la sobrevida de las neuronas dopaminergicas, inhibiendo la enzima p38 MAPK que promueve la apoptosis de las células dañadas, en un modelo de parkinsonismo.

5. Beta-cariofileno inhibe la reactividad y activación de astrocitos y microglia, impidiendo la función de la vía P38 MAPK, protegiendo asi la degeneración y muerte celular de neuronas dopaminergicas, en un modelo murino de inducción de parkinsonismo con la neurotoxina MPTP.

PERSPECTIVAS

- Evaluar la Vía JNK en el mismo modelo de parkinsonismo
- Cuantificar la expresión de citocinas proinflamatorias
- Cuantificar niveles de dopamina en el modelo de parkinsonismo

Es necesario la evaluación de la Vía JNK, ya que se demostró que esta implicada en la activacion de los astrocitos. En este estudio se evidenció que los astrocitos continuan activos aun bajo la inhibición de la vía inflamatoria y apoptotica p38, y se infiere que JNK puede ser la causa de este fenómeno (Yi M, 2016). También es importante evaluar el final de la vía inflamatoria p38, si concuerdan los resultados de las pruebas obtenidos con la modificación en la expresión de citocinas proinflamatorias respectoa cada grupo de estudio.

Es importante evaluar los niveles de dopamina y relacionarlos con el desempeño de los distintos grupos de estudios y verificar si la modificación de la expresión de dopamina corresponde a la modificación de la actividad en las pruebas sensorimotoras y a la cantidad de células dopaminérgicas viables.

BIBLIOGRAFÍA

1. *Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. Nat Rev Neurosci. 2006 Jan;7(1):41-53.*

2. *Aizman O. y cols. Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. Nat Neurosci. 2000 Mar;3(3):226-30.*

3. *Alam ZI, y cols. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. J Neurochem. 1997 Sep.; 69(3):1196-203.*

4. *Alkaitis MS. Y cols. Evidence for a Role of Endocannabinoids, Astrocytes and p38 Phosphorylation in the Resolution of Postoperative Pain. PLoS One. 2010; 5(5): e10891.*

5. *Autieri MV. cDNA cloning of human allograft inflammatory factor-1: tissue distribution, cytokine induction, and mRNA expression in injured rat carotid arteries. Biochem Biophys Res Commun. 1996 Nov 1; 228(1):29-37.*

6. *Avruch J y cols. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. Recent Progress in Hormone Research 2001 .56 (1): 127–55.*

7. *Barron KD. Microglia: history, cytology, and reactions. J Neurol Sci. 2003 Mar 15; 207(1-2):98.*

8. *Bekris LM, Mata IF, Zabetian CP. The genetics of Parkinson disease. J Geriatr Psychiatry Neurol. 2010; 23(4):228–42.*

9. *Benarroch E. Endocannabinoids in basal ganglia circuits: implications for Parkinson disease. Neurology. 2007 Jul 17; 69(3):306-9.*

10. *Bezard E, Dovero S. Effects of different schedules of MPTP administration on dopaminergic neurodegeneration in mice. ExpNeurol 1997;148:288-92.*

11. *Blesa J. Classic and new animal models of Parkinson's disease. J Biomed Biotechnol. 2012; 2012:845618.*

12. *Cabral GA. Y cols. Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance. J Leukoc Biol. 2005 Dec; 78(6):1192-7.*

13. *Caffareli MM. y cols, Cannabinoids: a new hope for breast cancer therapy?. Cancer Treat Rev. 2012 Nov; 38(7):911-8.*

14. *Calabresi P. y cols. Neuronal networks and synaptic plasticity in Parkinson's disease: beyond motor deficits. Parkinsonism Relat Disord. 2007; 13 Supple 3:S259-62.*

15. *Carroll CB. Cannabis for dyskinesia in Parkinson disease: a randomized double-blind crossover study. Neurology. 2004 Oct 12; 63(7):1245-50.*

16. *Castagnoli N. y cols. Monoamine oxidase B inhibition and neuroprotection: studies on selective adenosine A2A receptor antagonists. Neurology. 2003 Dec 9; 61(11 Supple 6):S62-8.*

17. *Castañeda -Achutiguí FD y cols, Modelos clásicos de inducción de Parkinson. 2015 sep, eNeurobiología 6(13): 02 09 15.*

18. *Chen Y, Swanson RA. Astrocytes and brain injury. J Cereb Blood Flow Metab. 2003 Feb; 23(2):137-49.*

19. *Cuadrado A, Nebrada AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. Biochem J. 2010 Aug 1; 429(3):403-1.*

20. *Davie CA. review of Parkinson's disease. Br Med Bull. 2008; 86:109-27. 10.*

21. *Del Río Hortega, P. Noticia de un nuevo y fácil método para la coloración de la neuroglia y el tejido conjuntivo.Trab. Lab. Invest. Biol. 1918, 15,367–378.*

22. *Dexter DT. Y cols. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. J Neurochem. 1989 Feb; 52(2):381-9.*

23. *Dheen St y cols, Microglial activation and its implications in the brain diseases. Curr Med Chem. 2007; 14(11):1189-97.*

24. *Dorado, C., Rugerio, C., Rivas, C. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración.* Revista Fac Med UNAM, Vol. 46, No.6*, pp. 229-235.*

25. *Dorsey, y cols. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. 2007. Neurology, 68, 384-6.*

26. *Eddleston M1, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. Neuroscience. 1993 May; 54(1):15-36.*

27. *Eder PS. Characterization of two scleroderma autoimmune antigens that copurify with human ribonuclease P. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Feb 18; 94(4):1101-6.*

28. *Farreras, Rozman. 1995. Medicina Interna. 13ava edición. Editorial Mosby Doyma Libros Vol. II. España.*

29. *Fernandez-Espejo E. Pathogenesis of Parkinson's disease: prospects of neuroprotective and restorative therapies. Mol Neurobiol. 2004 Feb; 29(1):15-30.*

30. *Fleming, S. M., Ekhator, O. R., Ghisays, V. Assessment of Sensorimotor Function in Mouse Models of Parkinson's Disease. J. Vis. Exp. (76), e50303, doe: 10.3791/50303 (2013).*

31. *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 Jan; 70(1):268-75.*

32. *Fu J. Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. Nature. 2003 Sep 4; 425(6953):90-3.*

33. *Gertsch J. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid.Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jul 1; 105(26):9099-104.*

34. *Grundy RI. Cannabinoids and neuroprotection. Mol Neurobiol. 2001 Aug-Dec; 24(1-3):29-51.*

35. *Guzman M. Neurons on cannabinoids: dead or alive? Br J Pharmacol. 2003 Oct; 140(3): 439–440.*

36. *Hald A, Lotharius J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? Exp Neurol. 2005 Jun; 193(2):279-90.*

37. *Hornykiewicz O. Biochemical aspects of Parkinson's disease. Neurology. 1998 Aug; 51(2 Supple 2):S2-9.*

38. *Hunot S. y cols. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) gene expression in the human brain: a post mortem in situ hybridization study with special reference to Parkinson's disease. J Neural Transm. 1996; 103(8-9):1043-52.*

39. *Jackson-Lewis V. Time course andmorphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-etrahydropyridine. Neurodegeneration.1995;4:257-69.*

40. *Jackson-Lewis V, Przedborski S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. Nat Protoc. 2007;2(1):141-51.*

41. *Kim SR. Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates cell death of mesencephalic dopaminergic neurons in vivo and in vitro. J Neurosci. 2005 Jan 19; 25(3):662-71.*

42. *Kim SU, de Vellis J. Kim SU1, de Vellis J. J Neurosci Res. 2005 Aug 1;81(3):302-13.*

43. *Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci. 1996 Aug; 19(8):312-8.*

44. *Langston JW, y cols. The biotransformation of MPTP and disposition of MPP+ the effects of aging. Life Sci. 1987; 40:749-754.*

45. *Lastres-Becker I. Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. Neurobiol Dis. 2005 Jun-Jul; 19(1-2):96-107.*

46. *Lau, Lonneke ML y cols. Epidemiology of Parkinson's disease. The Lancet Neurology. 2006, Volume 5, Issue 6, 525 – 535.*

47. *Lortet S. y cols. Striatal molecular signature of subchronic subthalamic nucleus high frequency stimulation in parkinsonian rat. PLoS One. 2013 Apr 4; 8(4):e60447. Doi: 10.1371/journal.pone.0060447. Print 2013.*

48. *Luong, T. N., Carlisle, H. J., Southwell, A., Patterson, P. H. Assessment of Motor Balance and Coordination in Mice using the Balance Beam. J. Vis. Exp. (49), e2376, doi: 10.3791/2376 (2011).*

49. *Mandavilli BS, y cols. DNA damage in brain mitocondria caused by aging and MPTP treatment. Brain Res.2000;885:45-52.*

50. *Marinelli S. N-arachidonoyl-dopamine tunes synaptic transmission onto dopaminergic neurons by activating both cannabinoid and vanilloid receptors. Neuropsychopharmacology. 2007 Feb; 32(2):298-308. Epub 2006 Jun 7.*

51. *Markey SP. Y cols. MPTP: a neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome. Med Res Rev. 1986 Oct-Dec; 6(4):389-429.*

52. *Marsicano G. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. J Neurochem. 2002 Feb; 80(3):448-56.*

53. *McGeer EG, McGeer PL. The role of anti-inflammatory agents in Parkinson's disease. CNS Drugs. 2007; 21(10):789-97.*

54. *Mc Geer y cols. Microglia in degenerative neurological disease, Glia; 2003 7: 84-92.*

55. *Moraga- Amaro R. y cols. Role of astrocytes in memory and psychiatric disorders. J Physiol Paris. 2014 Sep-Dec; 108(4-6):240-5.*

56. *Morris CM, Edwardson JA. Iron histochemistry of the substantia nigra in Parkinson's disease. Neurodegeneration. 1994 Dec; 3(4):277-82.*

57. *Mrass P, Weninger W. Immune cell migration as a means to control immune privilege: lessons from the CNS and tumors. Immunol Rev. 2006 Oct; 213:195-212.*

58. *Nebreda AR, Porras A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. Trends Biochem Sci. 2000 Jun; 25(6):257-60.*

59. *Nemoto S. Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38beta mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem. 1998 Jun 26; 273(26):16415-20.*

60. *Nieto, A., Torrero, C., Salas, M. Estudio comparativo de la densidad de la neuromelanina en el locus ceruleus y la sustancia negra en algunos*

mamíferos, incluyendo al hombre. Revista de Psicopatología, 1997 17 (4): 162-167.

61. *Ohsawa K y cols. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. J Neurochem. 2004 Feb; 88(4):844-56.*

62. *Pakkenberg B. y cols. The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1991 Jan; 54(1):30-3.*

63. *Perea G, Araque A. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. Science. 2007 Aug 24; 317(5841):1083-6.*

64. *Perry VH, Cunningham C, Holmes C. Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. Nat Rev Immunol. 2007 Feb; 7(2):161-7. Epub 2007 Jan 15.*

65. *Perry VH. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. Brain Behav Immun. 2004 Sep; 18(5):407-13.*

66. *Poewe W. Diagnosis and management of Parkinson's disease dementia. Int J Clin Pract. 2008 Oct; 62(10):1581-7.*

67. *Raingeaud J. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. J Biol Chem. 1995 Mar 31; 270(13):7420-6.*

68. *Raivich G. y cols. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. Brain Res Brain Res Rev. 1999 Jul; 30(1):77-105.*

69. *Rodríguez De Fonseca F. Role of the endogenous cannabinoid system as a modulator of dopamine transmission: implications for Parkinson's disease and schizophrenia. Neurotox Res. 2001 Jan; 3(1):23-35.*

70. *Santello M., Volterra A. Neuroscience: Astrocytes as aide-mémoires. 2010. Jan; Nature 463, 169-170.*

71. *Schmidt N, Ferger B. Neurochemi cal findings in the MPTP model of Parkinson's disease. J Neural Transm. 2001;108:1263-82.*

72. *Sedelis M, y cols. MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. Behav Genet. 2000;30: 171-182.*

73. *Segovia G. Effects of CB1 cannabinoid receptor modulating compounds on the hyperkinesia induced by high-dose levodopa in the reserpine-treated rat model of Parkinson's disease. Mov Disord. 2003 Feb; 18(2):138-49.*

74. *Sofic E. y cols. Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. J Neural Transm. 1988; 74(3):199-205.*

75. *Spranger y Fontana (1996) "Activation of microglia: a dangerous interlude in inmune function in the brain" The neuroscientist; 2: 293-299*

76. *Tolosa E1, Wenning G, Poewe W. The diagnosis of Parkinson's disease. Lancet Neurol. 2006 Jan; 5(1):75-86.*

77. *Turu G. HunyadyJ. Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. Journal of Molecular Endocrinology. 2010 44, 75–85*

78. *Ungerstedt. U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. Eur J Pharmacol.1968; 5: 107-110.*

79. *Yang, Min y cols. Multiple mechanisms that prevent excessive brain inflammation. J Neurosci Res. 2007 Aug 15; 85(11):2298-305.*

80. *Yi M y cols. Activation of the KCa3.1 channel contributes to traumatic scratch injury-induced reactive astrogliosis through the JNK/c-Jun signaling pathway. Neurosci Lett. 2016 May 6; 624:62-71.*

81. *Zhu W. y cols. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor attenuates inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced neural stem cells by regulating NF-κB and phosphorylation of p38-MAPKs pathways. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2016 Jun; 38(3):205-13.*

82. *Zimmer y cols. The cannabinoid CB2 receptor-selective phytocannabinoid beta-caryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. Eur Neuropsychopharmacol. 2014 Apr; 24(4):608-20.*