



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.

2014 B - 2019 B

210618886

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



“Evaluación del efecto neuroprotector del Veneno de Abeja en combinación con L-DOPA en ratones hemiparkinsonianos”

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A:

MARCO ANTONIO NORIEGA RUIZ



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Secretaría Académica
Coordinación de la carrera de Biología

C. Marco Antonio Noriega Ruiz
210618886

Presente

Manifestamos a usted que, con esta fecha, ha sido **aprobado** su tema de titulación en la modalidad de Tesis, Tesina e Informes, opción específica Tesis con el trabajo intitulado: **"Evaluación del efecto neuroprotector del Veneno de Abeja en combinación con L-DOPA en ratones hemiparkinsonianos"**, para obtener el título de licenciado en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptada como Directora de tesis a la Dra. Silvia Josefina López Pérez.

Sin más por el momento, aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"

"Año de la Transición Energética en la Universidad de Guadalajara"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. 4 de agosto de 2020.

COMITÉ DE
TITULACIÓN


Biol. JESÚS ISRAEL HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



LICENCIATURA
EN BIOLOGIA


DRA. NIDIA JANNETTE CARRILLO GONZÁLEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN





**M.C. MARGARITO MORA-NÚÑEZ
 PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
 LICENCIATURA EN BIOLOGÍA
 CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
 UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
 PRESENTE:**

Por este conducto nos permitimos informar a Usted que habiendo revisado el trabajo de titulación **"Evaluación del efecto neuroprotector del Veneno de Abeja en combinación con L-DOPA en ratones hemiparkinsonianos"** modalidad **Tesis, Tesina e Informes**, opción específica: **Tesis** del Reglamento General de Titulación de la Universidad de Guadalajara, que realizó el pasante: **Marco Antonio Noriega Ruiz** con código: **210618886** consideramos que ha quedado debidamente concluido para su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.



Dra. Silvia Josefina López Pérez
 Directora del trabajo

Grado y nombre completo del sinodal	Código	Firma	Fecha
Dra. Marisela Hernández González	9426973		21 julio 2020
Dra. Nidia Jannette Carrillo González	2113694		21 julio 2020
Dra. Kenia Pardo Peña	2944034		21 julio 2020
<i>M.C. Sergio Alvarado Borrero</i>	<i>8514321</i>		<i>21 Julio /2020</i>

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neuroquímica del Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, bajo la dirección de la Dra. Silvia Josefina López Pérez

Todo el esfuerzo que este trabajo significa está dedicado a mi persona favorita del universo.

Lucero Mora.

Estoy infinitamente agradecido por todo el apoyo y amor que me brindas, no lo podría haber hecho sin ti. Solo tú y yo sabemos el esfuerzo que dedicamos a este trabajo.

Lefluovb.

AGRADECIMIENTOS

Sra. Ma. Del Carmen Vázquez, por cuidarme y formar mi persona. Gracias por ser la primera persona que creyó en mí.

A mis padres, Sr. Hilario Noriega y Sra. María Soledad Ruiz; y hermanos, Fernando Noriega, Paulina Noriega y Mariana Noriega, por su apoyo incondicional.

Dra. Silvia Josefina López-Pérez, estaré eternamente agradecido con usted por todos los conocimientos brindados que nunca se limitaron a ser académicos, y por darme la confianza para realizar este trabajo, sé que esto significó una gran inversión de su tiempo, esfuerzo y dinero. En especial agradezco su amistad.

M.F. Francisco Ruiz, Sra. Marcela Ruiz y Sr. Ramón Rangel, por su ayuda para realizar este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	01
INTRODUCCIÓN	02
Enfermedad de Parkinson	02
Dopamina	05
Neuronas dopaminérgicas.....	10
Vías dopaminérgicas	11
Ganglios basales	13
Modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson	15
<i>6-hidroxidopamina</i>	16
Veneno de abeja	17
ANTECEDENTES	19
Neuroinflamación.....	19
Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo	20
Veneno de abeja en el contexto de la neuroinflamación y el estrés oxidativo	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	26
Objetivo general	26
Objetivos específicos.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Variables independientes	27
Variables dependientes	27
Animales.....	27

Cirugía.....	27
Administración de tratamientos	28
<i>Administración de L-3,4 dihidroxifenilalanina</i>	28
<i>Administración de veneno de abeja</i>	28
<i>Administración combinada de L-3,4 dihidroxifenilalanina y veneno de abeja</i>	28
Pruebas conductuales	29
<i>Prueba de reconocimiento de objeto novedoso</i>	29
<i>Prueba del cilindro</i>	30
<i>Prueba del corredor</i>	31
Inmunohistoquímica para astrocitos	32
<i>Preparación de tejido</i>	32
<i>Marcaje inmunofluorescente por flotación</i>	33
<i>Análisis de densidad óptica</i>	33
Análisis estadístico	34
LIMITACIONES DEL TRABAJO	35
DIAGRAMA EXPERIMENTAL	36
RESULTADOS.....	37
Validación de modelo	37
Pruebas conductuales	37
<i>Prueba de reconocimiento de objeto novedoso</i>	38

<i>Prueba del cilindro</i>	40
<i>Prueba del corredor</i>	44
Inmunohistoquímica para astrocitos	45
<i>Cuerpo estriado</i>	46
<i>Sustancia negra</i>	48
<i>Hipocampo</i>	50
<i>Corteza prefrontal</i>	53
DISCUSIÓN	55
El veneno de abeja protege la memoria de corto plazo	56
El veneno de abeja preserva la capacidad motora	58
El veneno de abeja disminuye la activación astrogliar	60
CONCLUSIÓN	64
PERSPECTIVAS	65
REFERENCIAS	66

ABREVIATURAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
AC	Adenilato ciclasa
ATP	Adenosín trifosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro, del inglés: <i>brain-derived neurothophic factor</i>
Ca²⁺	Ion de calcio
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
Cl⁻	Ion de cloruro
COMT	Enzima catecol-O-metiltransferasa
CRYAB	Proteína αβ-crystallin
DA	Dopamina
DAérgicas	Dopaminérgicas
DAT	Transportador de dopamina
DE	Día embrionario
DOPAC	Ácido dihidroxifenilacético
EP	Enfermedad de Parkinson
GB	Ganglios basales
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GP	Globo pálido
GPe	Globo pálido externo

GPI	Globo pálido interno
HVA	Ácido homovanílico
ID	Índice de discriminación
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
IP	Intraperitoneal
K⁺	Ion de potasio
L-DOPA	L-3,4 dihidroxifenilalanina
DLP	Depresión a largo plazo
PLP	Potenciación a largo plazo
mAHP	Pos-hiperpolarización de fase media
MAO-A	Enzima monoamino-oxidasa A
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógeno
MCD	Péptido desgranulador de mastocitos
MCP	Memoria de corto plazo
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina
MSNs	Neuronas espinosas medianas
NA	Núcleo accumbens
Na⁺	Ion de sodio
NMDAR	Receptor de N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
O₂	Oxígeno molecular

OB	Bulbo olfatorio
OD	Densidad óptica
PBS	Buffer fosfato salino
PDQL	Cuestionario de calidad de vida
PFC	Corteza prefrontal
Pitx3	Factor de transcripción del homeodominio pareado 3
PKA	Proteína quinasa A
ROS	Especies reactivas de oxígeno, del inglés: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
SC	Subcutánea
SK	Canales de K ⁺ activados por conductancias pequeñas de Ca ²⁺
SN	Sustancia negra
SNC	Sistema nervioso central
SNCA	Gen synuclein alpha
SNCB	Gen synuclein beta
SNP	Sistema nervioso periférico
SNpc	Sustancia negra <i>pars compacta</i>
SNpl	Sustancia negra <i>pars lateralis</i>
SNpr	Sustancia negra <i>pars reticulata</i>

STN	Núcleo subtalámico
STR	Cuerpo estriado
TH	Tirosina hidroxilasa
TRPV1	Receptor de potencial transitorio V1, del inglés: <i>Transient Receptor Potential Cation Channel 1</i>
VA	Veneno de abeja
VMAT2	Transportador vesicular de monoamina 2
VTA	Área tegmental ventral

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP), afecta principalmente a adultos mayores, con una tasa de incidencia que puede llegar al 3%. El sello distintivo de esta enfermedad, son las afectaciones motoras, como la pérdida del control del movimiento o el temblor en reposo. Esto se origina por la disminución cerebral del neurotransmisor dopamina (DA), debido a que existen procesos celulares (como la neuroinflamación) que comprometen la integridad de las neuronas ubicadas en la sustancia negra *pars compacta* (SNpc). El tratamiento más utilizado para mitigar estos síntomas es la administración de L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA), sin embargo, este fármaco no detiene el transcurso de la enfermedad, ni tampoco mejora los síntomas no motores, como el deterioro cognitivo. Recientemente, estudios han demostrado que el veneno de abeja (VA) podría tener capacidades antiinflamatorias, lo cual podría ser prometedor para el tratamiento de la EP. El presente estudio evaluó la combinación de VA y L-DOPA en ratones modelo de la EP, mediante pruebas conductuales, en las que se estudió su capacidad para preservar la memoria de corto plazo (MCP), el inicio y el control de movimientos, además de analizar los cambios en la activación de astrocitos tras su administración durante 17 días. Los resultados mostraron que la combinación de VA y L-DOPA preserva la MCP, así como las capacidades motoras, lo cual se relacionó con la regulación negativa de astrocitos que se observó, por lo que el VA parece ser un buen candidato para ser utilizado como un antiinflamatorio en el tratamiento contra la EP.

INTRODUCCIÓN

Enfermedad de Parkinson

La EP, es un padecimiento neurológico que se caracteriza principalmente por afectaciones motoras, como temblor en reposo, rigidez, acinesia, bradicinesia, inestabilidad postural y postura flexionada, sin embargo, también es acompañado de síntomas no motores, como deterioro cognitivo, depresión, apatía y anhedonia, que hasta hace algunos años no se tomaban en cuenta para el diseño de tratamientos (Sveinbjornsdottir, 2016; Tíbar y cols., 2018; Poewe, 2008). Esta enfermedad se asocia con la degeneración de neuronas dopaminérgicas (DAérgicas) en la SNpc, con el posterior agotamiento de DA en el cuerpo estriado (STR) (Poewe y cols., 2017). En pacientes y modelos animales se ha identificado que la alteración de procesos celulares, como la acumulación de proteínas mal plegadas, disfunción mitocondrial, incremento de estrés oxidativo e inflamación, contribuyen a la muerte celular (Maiti y cols., 2017), por lo que regular estos procesos se ha convertido en un blanco terapéutico (Burbulla y cols., 2017).

Uno de los registros más antiguos de la EP se encontró en papiros egipcios de la Dinastía XIX (1500-1200 a. C.) en el que se describe el caso de un rey que presenta algunos de los síntomas (Stern, 1989), pero no es hasta el año de 1817 que se publica la primera descripción formal de la enfermedad, en el trabajo titulado '*An essay on the shaking palsy*', desarrollado por el médico inglés James Parkinson, en el que describe algunos síntomas motores que en la actualidad aún son utilizados para el diagnóstico. No obstante, con más de 200 años de publicado su trabajo, ya se han logrado identificar síntomas no motores asociados al padecimiento, que actualmente se intentan utilizar para lograr un diagnóstico temprano, ya que se ha observado que se presentan inclusive antes que los síntomas motores, como son depresión, ansiedad, fatiga y desordenes del sueño por nombrar solo algunos (Tabla 1) (Reichmann, 2017; Rodríguez-Violante y cols., 2017; Tíbar y cols. 2018). Estos síntomas permanecen durante el transcurso de la enfermedad, contribuyendo a la pobre calidad de vida de los pacientes y al desarrollo de demencia (Aarsland y cols., 2017).

Tabla 1. Síntomas en la enfermedad de Parkinson. En el desarrollo de la enfermedad se presentan síntomas motores y no motores. Actualmente se están diseñando protocolos para utilizar los síntomas no motores como marcadores tempranos de la enfermedad. Modificado de Jankovic (2008).

Síntomas motores	Síntomas no motores
Temblor, bradicinesia, rigidez, inestabilidad postural	Deterioro cognitivo, bradifrenia (pensamiento lento, reducción de reflejos mentales)
Hipomimia, disartria, disfagia, sialorrea	Depresión, apatía, anhedonia, fatiga, otros problemas conductuales y psiquiátricos
Disminución del balanceo del brazo, marcha lenta, temblor activo durante la marcha, giros en la cama	Síntomas sensoriales: anosmia, ageusia (alteración en el sentido del gusto), dolor (hombro, espalda), parestesias
Dificultad en la escritura (caligrafía pequeña), dificultad para cortar alimentos e ingerirlos, dificultar para asearse, actividades lentas de la vida diaria	Disautonomía (hipotensión ortostática, estreñimiento, disfunción urinaria y sexual, sudoración anormal, seborrea), pérdida de peso
Reflejo glabellar, blefaroespasmos, distonía, deformidad estriatal, escoliosis, camptocormia	Trastornos del sueño (trastorno del comportamiento REM, sueños vívidos, somnolencia diurna, fragmentación del sueño, síndrome de piernas inquietas)

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor incidencia mundial, después de la enfermedad de Alzheimer (de Lau y Breteler, 2013; Tysnes y Storstein, 2017; Willis, 2013), afectando del 1-2% de la población mayor de 60 años, y el 3% mayor de 80 años, de los cuales aproximadamente el 90% de los casos son de origen idiopático (de Lau y Breteler, 2013). Por lo que comúnmente se asocia como principal factor de riesgo la edad, pese a ello, existen casos de EP juvenil que llegan a presentarse antes de los 21 años y están asociados a causas genéticas (Anwar y cols., 2019).

La pérdida progresiva de neuronas DAérgicas inicialmente ocurre en un nivel ventro-lateral en la SNpc, acompañada de una pérdida neuronal más generalizada en otras regiones del cerebro (Greenamyre y Hastings, 2004; Zeng y cols., 2018), además de la formación de agregados de la proteína presináptica α -sinucleína en el citoplasma de las neuronas, debido a una mutación en el gen SNCA (synuclein alpha) o en el gen SNCB (synuclein beta), lo que causa el mal plegamiento de la proteína, promoviendo su agregación a modo de fibrillas, lo que también se conoce como cuerpos de Lewy (Maiti y cols., 2017); siendo esta una característica que la EP comparte con diferentes trastornos parkinsonianos, que inclusive pueden presentarse sin patología de α -sinucleína (Tabla 1). La agregación de α -sinucleína, el estrés oxidativo, el daño mitocondrial y neuroinflamación, aunque no son características específicas de la EP, sí son consideradas como la causa de los síntomas.

Tabla 2. Clasificación de los trastornos principales asociados con el parkinsonismo, según las características patológicas moleculares. Tomado de Dickson y cols. (2009).

<p>α-sinucleinopatías</p> <ul style="list-style-type: none">• Enfermedad de Parkinson• Demencia con cuerpos de Lewy• Atrofia del sistema múltiple• Neurodegeneración con acumulación de hierro en el cerebro <p>Sin α-sinucleinopatías</p> <p>Taupatías</p> <ul style="list-style-type: none">• Parálisis supranuclear progresiva• Degeneración corticobasal• Demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17• Complejo Guam Parkinson-demencia• Demencia pugilística

Tabla 2. Continuación.

Proteinopatías TDP-43

- Degeneración lobular frontotemporal con inclusiones de TDP-43
- Síndrome de Perry

Degeneración inespecífica en el SNpc

- Parkinsonismo juvenil autosómico recesivo
- Algunos casos de parkinsonismo debido a mutaciones en LRRK2

Tras descubrir que la administración de L-DOPA en pacientes con EP reduce la acinesia ([Birkmayer y Hornykiewicz, 1961](#)), se convirtió en el tratamiento farmacológico más utilizado, sin embargo, en la actualidad se sabe que su uso no elimina por completo los síntomas, además, se ha documentado que puede producir movimientos involuntarios descontrolados (discinesia inducida por L-DOPA) debido a la sobre estimulación de los receptores para DA ([Nagatsua y Sawadab, 2009](#); [Figge y cols., 2016](#); [Sharma y cols., 2015](#)), lo que en conjunto provoca que la calidad de vida de las personas que sufren este padecimiento no sea óptima, generando la necesidad de desarrollar nuevas terapias que sean más efectivas.

Dopamina

Las catecolaminas son un grupo de neurotransmisores que cumplen funciones en el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP), este grupo está conformado por la DA, noradrenalina y epinefrina. La síntesis de catecolaminas comienza a partir del aminoácido L-tirosina, al cual se le adiciona un grupo hidroxilo en posición meta, mediante la enzima tirosina hidroxilasa (TH), utilizando oxígeno molecular (O₂) como sustrato y tetrahidrobiopterina como cofactor, formando así, L-DOPA. Es a partir de L-DOPA que la enzima DOPA descarboxilasa, o también llamada descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos (dependiente de fosfato de piridoxal), cataliza la eliminación del grupo carboxilo formando DA, en las neuronas DAérgicas este es el paso final de la vía de L-Tirosina (Figura 1). Los pacientes con EP se tratan farmacológicamente con la administración de L-DOPA, para incrementar los niveles de

DA en los terminales axónicos. Tanto la conversión de L-Tirosina a L-DOPA, y esta a su vez en DA ocurre en el citosol, posteriormente la DA se internaliza en vesículas de almacenamiento mediante un mecanismo dependiente de adenosín trifosfato (ATP), vinculado a una bomba de protones (Kuhar y cols., 2006).

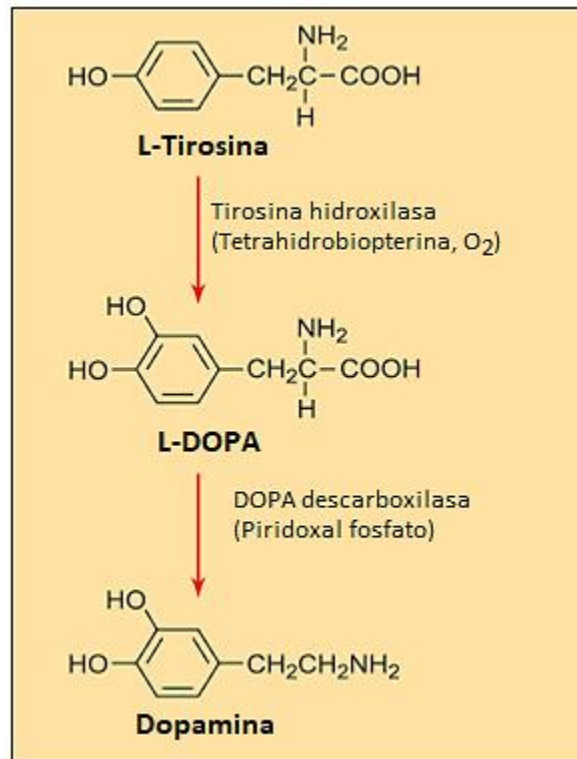


Figura 1. Síntesis de dopamina. La dopamina es sintetizada a partir del aminoácido L-Tirosina, en este proceso la enzima limitante es tirosina hidroxilasa. Modificado de Kuhar y cols. (2006).

Para la liberación de DA, las vesículas cumplen una doble función, mantienen un suministro listo para su liberación en los terminales nerviosos de la neurona presináptica, a la vez que median el proceso de liberación (Kuhar y cols., 2006). Cuando una descarga eléctrica alcanza el potencial de acción de la neurona presináptica, se abren canales para el ion de calcio (Ca²⁺), lo que permite su entrada en los terminales. Es el incremento de la concentración de Ca²⁺ intracelular lo que promueve que las vesículas se fusionen con la membrana presináptica para la liberación del contenido de DA en la hendidura sináptica (Figura 2) (Kuhar y cols., 2006).

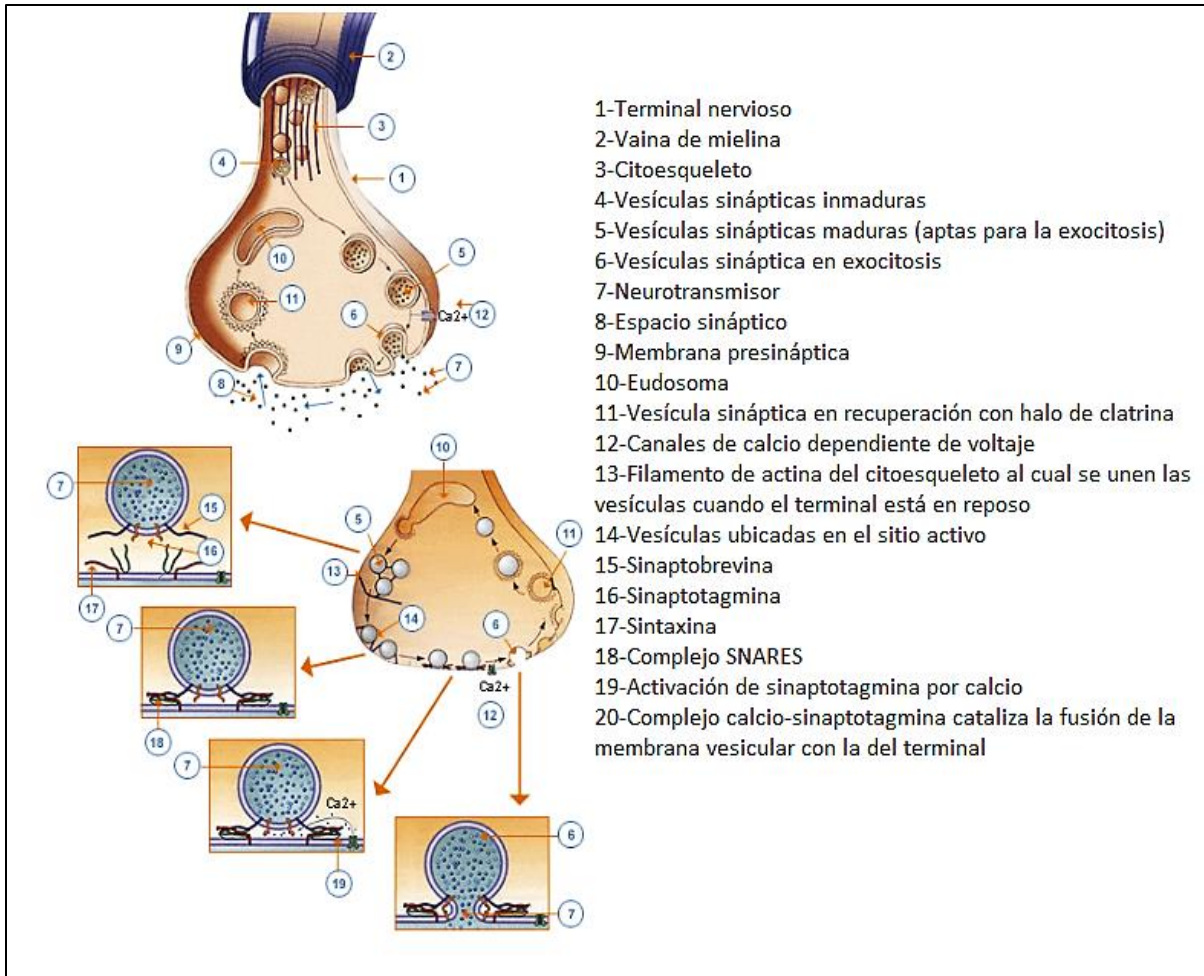


Figura 2. Liberación de dopamina. La liberación del neurotransmisor está mediada por vesículas, mediante el proceso de exocitosis, el cual inicia por el incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólico. Modificado de <http://www7.uc.cl>.

Una vez que la DA se encuentra en la hendidura sináptica, cuenta con cinco subfamilias de receptores para su actividad: D1, D2, D3, D4 y D5. Estos receptores son metabotrópicos acoplados a proteínas G, conformados por un extremo amino extracelular, una porción transmembranal y un extremo carboxilo citosólico. La densidad relativa en el SNC de la rata adulta de los receptores es $D1 > D2 > D3 > D5 > D4$ (Missale y cols., 1996). Los receptores son clasificados en dos familias, los receptores D1 y D5 conforman la familia D1, en los que la subunidad α de la proteína G es de tipo s (estimuladora, del inglés: *stimulates*), la cual incrementa la actividad de la enzima adenilato ciclasa (AC), aumentando la formación de adenosín monofosfato cíclico (cAMP), nucleótido que fosforila la proteína quinasa A (PKA) (Figura 3-A), para la activación de distintas vías de señalización, por ejemplo, la liberación de las vesículas

de DA del citoesqueleto al fosforilar las sinapsinas I y II (Bahena-Trujillo y cols., 2000). Estos receptores también modulan los canales iónicos de sodio (Na⁺), potasio (K⁺), y Ca²⁺ activados por voltaje, y canales de K⁺ activados por conductancias pequeñas de Ca²⁺ (SK). Por el contrario, la familia D2, en la que se encuentran los receptores D2, D3 y D4, la subunidad α de la proteína G es de tipo i (inhibidora, del inglés: *inhibiting*), por lo que inhiben la actividad de la AC, para disminuir los niveles de cAMP (Figura 3-B), además los receptores D2 que se encuentran en la neurona presináptica, y que funcionan como autorreceptores en las zonas somatodendríticas y terminales del axón, reducen la excitabilidad neuronal, la síntesis, el empaquetamiento y liberación de DA (Mishra y cols., 2018), ya que inducen el cierre de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Ledonne y Mercuri, 2017) e inhiben la fosforilación de las sinapsinas I y II, por lo que tienen una capacidad reguladora. Distintas funciones fisiológicas, motoras y cognitivas se han asociado a los distintos tipos de receptores, las cuales pueden estar mediadas por más de un tipo de receptor, como se muestra en la Tabla 3 (Mishra y cols., 2018).

Tabla 3. Clasificación de los receptores de dopamina, localización y funciones. Los receptores dopaminérgicos tienen localización diversa, pero están presentes básicamente en todo el encéfalo, con funciones complementarias de acuerdo a las proteínas G asociadas a ellos. Tomado de Mishra y cols. (2018).

Receptor	D1	D5	D2	D3	D4
Localización	Estriado, núcleo accumbens, bulbo olfatorio, hipocampo, amígdala, sustancia negra, hipotálamo, corteza frontal.	Corteza, sustancia negra, hipotálamo.	Estriado, área tegmental ventral, bulbo olfatorio, corteza cerebral.	Estriado, Islas de Calleja, córtex.	Corteza frontal, amígdala, hipotálamo, núcleo accumbens.
Tipo	Acoplado a G _{αs} .	Acoplado a G _{αi} .	Acoplado a G _{αi} .	Acoplado a G _{αi} .	Acoplado a G _{αi} .
Mecanismo	Aumento del nivel intracelular de AMPc por la activación de adenilato ciclasa.	Adenilato ciclasa ↑	Disminución del nivel intracelular de AMPc por la inactivación de adenilato ciclasa.	Adenilato ciclasa ↓.	Adenilato ciclasa ↓.
Función	Locomoción, aprendizaje y memoria, atención, control de impulsos, sueño, regulación de la función renal.	Cognición, atención, toma de decisiones, aprendizaje motor, secreción de renina.	Locomoción, aprendizaje y memoria, atención, sueño, comportamiento reproductivo.	Locomoción, cognición, atención, control de impulsos, sueño, regulación de la ingesta de alimentos.	Cognición, control de los impulsos, atención, sueño, comportamiento reproductivo.

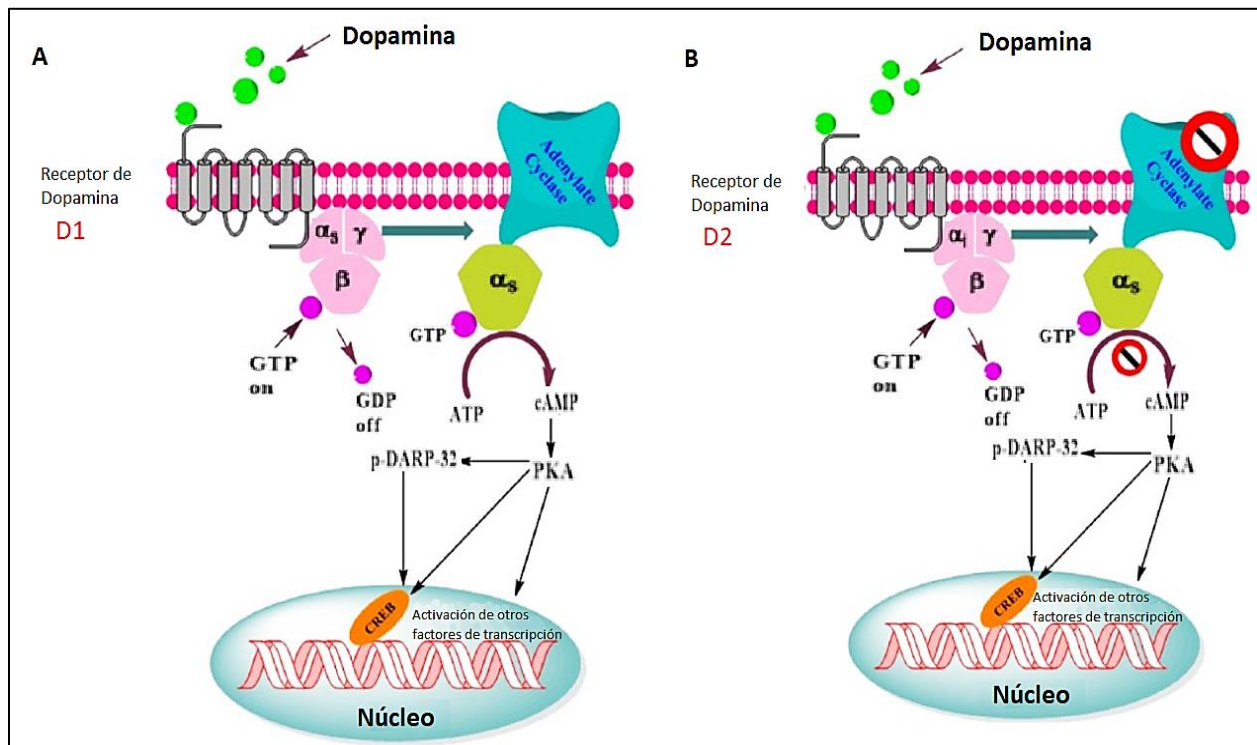


Figura 3. Función de los receptores para dopamina. Esquematización de la inhibición y activación de la enzima adenilato ciclasa tras la interacción de dopamina con los receptores D1 (A) y D2 (B). Abreviaturas: GTP-guanosín trifosfato, GDP-guanosín difosfato, ATP-adenosín trifosfato, cAMP-adenosín trifosfato cíclico, PKA- proteína quinasa A, p-DARP32-fosfoproteína regulada por dopamina y adenosín trifosfato cíclico de peso molecular 32,000. Tomado de Mishra y cols. (2018).

La actividad de DA está modulada espacial y temporalmente por el transportador de DA (DAT) al impulsar la recaptura del neurotransmisor a las mismas terminales de liberación, con el cotransporte de dos Na^+ y un ion de cloruro (Cl^-) (Vaughan y Foster, 2013). El DAT es una proteína integrada en la membrana de la neurona presináptica (Figura 4), que tiene un papel muy importante para el correcto funcionamiento fisiológico, ya que niveles anormales de este transportador se asocia a enfermedades como Parkinson, depresión y trastorno bipolar (Vaughan y Foster, 2013; Palermo y cols., 2020). Este transportador es parte de la familia SLC6 (Prمود y cols., 2013), y es importante mencionar que es responsable de la captura de las neurotoxinas 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) y 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Bahena-Trujillo y cols., 2000).

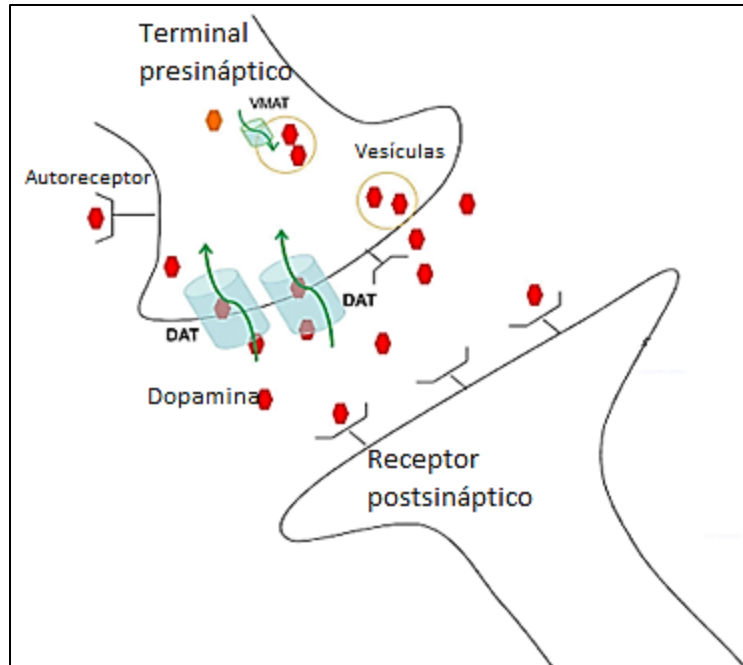


Figura 4. Recaptura de dopamina. Los transportadores de dopamina recapturan el neurotransmisor del espacio extracelular al interior de la célula. Abreviaturas: DAT-transportador de dopamina, VMAT- transportador vesicular de monoamina. Modificado de Palermo y Ceravolo (2019).

Una vez recapturada, la DA es convertida en ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) por la enzima monoamino-oxidasa A (MAO-A). DOPAC es liberado al exterior de la terminal para ser convertido en ácido homovanílico (HVA) por la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT). La DA no capturada por el DAT es metabolizada en HVA por la acción secuencial de las enzimas COMT y MAO-A. En ratas, el principal metabolito es DOPAC, mientras que en los primates es HVA, ambos son utilizados como indicador de la actividad DAérgica (Bahena-Trujillo y cols., 2000).

Neuronas dopaminérgicas

Durante el neurodesarrollo, las neuronas DAérgicas de la SNpc y del área tegmental ventral (VTA) surgen del cerebro medio, en la flexión mesencefálica ventral, ubicada en las proximidades de los centros de señalización del límite mesencéfalo-cerebro posterior y de la placa del piso de la línea media ventral del mesencéfalo (Orme y cols., 2009). En ratas, la neurogenia máxima se observa en el día embrionario (DE) 12, y al DE 14 ya se muestran proyecciones axonales de más de 1 milímetro hacia el prosencéfalo ventral; aunque se desconoce con exactitud el día en que inicia en humanos la ontogenia de

estas neuronas, se estima que ocurre en el día 40 posterior a la fecundación (Clancy y cols., 2007).

La especificación de las neuronas DAérgicas se lleva a cabo por cascadas de señales de proteínas a través de etapas, en primera instancia, se define la región ventral a través de patrones espacio-temporales específicos de expresión génica, en la que participan genes como *orthodenticle homolog 2* (OTX2) para la región anterior y media del cerebro, y el gen *gastrulation brain homeobox 2* (Gbx2) para la región posterior. La expresión de estos dos genes homeobox es necesaria para la definición de los límites de ambos dominios, en donde se forma el cerebro posterior medio, que expresa factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y proteínas de la familia Wnt, que son importantes en la especificación de las neuronas DAérgicas (Orme y cols., 2009). Posteriormente se produce un grupo de células progenitoras en esta región, las cuales mantienen el estado pluripotencial y responden a proteínas de señalización, es de estas señales, que se producen las neuronas DAérgicas. Finalmente, las neuronas recién formadas maduran para ser funcionales (Orme y cols., 2009).

La placa del piso ventral del mesencéfalo es otro centro de señalización importante para la especificación de las neuronas DAérgicas, en el que se expresa la proteína Sonic hedgehog, que es un morfógeno que parece ser requerido para determinar la región precisa de la que surgirán las neuronas DAérgicas del cerebro medio (Roussa y Krieglstein 2004; Ye y cols. 1998).

Vías dopaminérgicas

Las técnicas actuales que se utilizan para identificar a las neuronas DAérgicas en el cerebro, utilizan como marcador a la enzima TH, al transportador vesicular de monoamina 2 (VMAT2), a la enzima DOPA descarboxilasa, y en un estado maduro, mediante la expresión del factor de transcripción del homeodominio pareado 3 (Pitx3), el cual está involucrado en la diferenciación terminal de estas neuronas (Smidt y Burbach, 2007). Gracias a estas técnicas, en el cerebro embrionario y adulto de rata se han identificado nueve grupos de neuronas DAérgicas (Figura 5), que son denominados

desde A8 hasta A16, nomenclatura introducida por Dahlstrom y Fuxe (1964), misma que es utilizada en la actualidad.

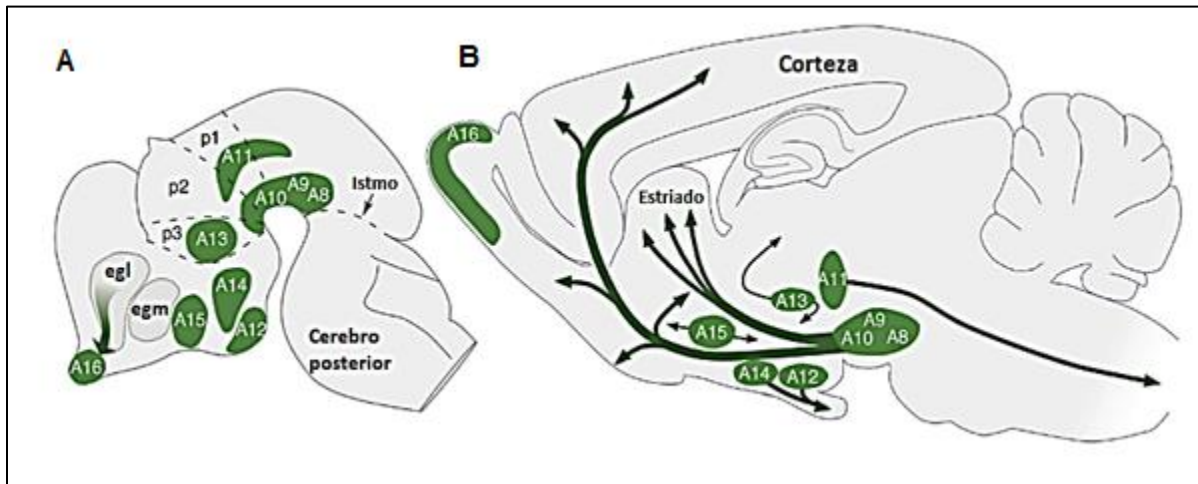


Figura 5. Distribución de las neuronas dopaminérgicas en el cerebro de rata. A) Cerebro en desarrollo (13.5 días después de la fecundación), B) Cerebro adulto. Las flechas ilustran las proyecciones neuronales. Abreviaturas: egl-eminencia ganglionar lateral, egm-eminencia ganglionar medial, p-prosómeros (1, 2 y 3). Modificado de Björklund y Dunnett (2007).

De todos los grupos identificados de neuronas DAérgicas, en la parte ventral del mesencéfalo es donde se albergan el mayor número de células, se estima que aproximadamente el 90% residen en esta área (Chinta y Andersen, 2005), por lo que son la principal fuente de DA del SNC. Es entonces del mesencéfalo de donde surgen las vías DAérgicas que probablemente son las más estudiadas en humanos: la vía nigroestriada, la vía mesolímbica y la vía mesocortical (Figura 6-C), estas dos últimas surgen a partir de neuronas ubicadas en el VTA. Las neuronas de la vía mesolímbica se proyectan mayormente hacia el núcleo accumbens (NA) y el bulbo olfatorio (OB), pero también inervan el tabique, la amígdala y el hipocampo. Por otra parte, la vía mesocortical inerva la corteza prefrontal (PFC), cingulada y perirrinal, ambas vías están involucradas en el comportamiento basado en emociones, incluida la motivación y la recompensa. Finalmente, la vía nigroestriada que se origina a partir de células ubicadas en la sustancia negra (SN), proyecta sus terminales hacia el STR dorsal, el cual juega un papel esencial en el control del movimiento voluntario en conjunto con el resto de los ganglios basales (GB) (Chinta y Andersen, 2005; Ledonne y Mercuri, 2017). En el cerebro de la rata

existen las mismas vías, con disposición anatómica y conexiones equivalentes al humano (Figura 6 A y B).

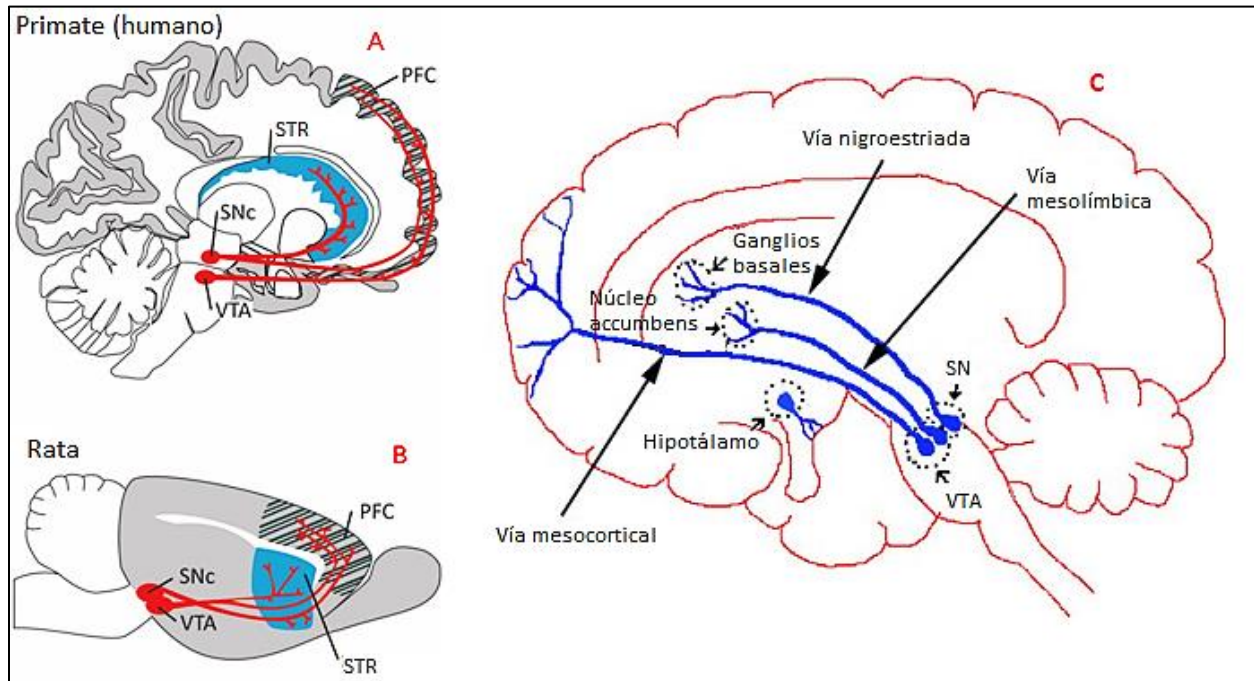


Figura 6. Vías dopaminérgicas. Proyecciones dopaminérgicas desde el área tegmental ventral (VTA) y la sustancia negra pars compacta (SNpc) hacia la corteza prefrontal y el cuerpo estriado en el cerebro de un primate (humano) (A) y una rata (B), en el que se muestran que las vías mantienen homología. C) En el cerebro humano son de gran interés la vía nigroestriada, la vía mesolímbica y la vía mesocortical, las cuales se encuentran en el mesencéfalo cumpliendo funciones motoras, cognitivas y emocionales. Abreviaturas: STR-estriado, PFC-corteza prefrontal, SNc-sustancia negra compacta, VTA-área tegmental ventral, SN-sustancia negra. A) y B) Tomado de Puig y cols., (2014), C) tomado de Chinta y Andersen (2005).

Ganglios basales

El STR, globo pálido (GP), núcleo subtalámico (STN, ubicado en el diencefalo), la SN (en el mesencéfalo) y núcleo pedunculopontino (el puente de Varolio) conforman los GB. Estas estructuras se pueden clasificar como núcleos de entrada, intrínsecos y de salida. El STR y el STN son núcleos de entrada, por lo que reciben información, principalmente de origen cortical, talámico y nigral. El globo pálido interno (GPI) y la sustancia negra pars reticulata (SNpr), son núcleos de salida, estos envían información al tálamo. El globo pálido externo (GPe) y la SNpc, son núcleos intrínsecos y se ubican entre los núcleos de entrada y salida regulando la información (Lanciego y cols., 2015).

Para la EP, son de particular interés el STR y la SN. Se han identificado tres grupos neuronales dentro de la SN (Figura 7): en la SNpc las células son de tamaños medianos a grandes, y están densamente empaquetadas, la SNpr es una división más difusa y pobre en células, que contiene neuronas pequeñas y medianas, y la sustancia negra pars lateralis (SNpl) es un grupo pequeño de células medianas que se extiende rostrocaudalmente a lo largo del borde lateral de la SNpc y la SNpr (González-Hernández y cols., 2009). Las neuronas DAérgicas en la parte ventral de la SN se proyectan al STR dorsal, con su campo terminal ubicado preferentemente en estriosomas, mientras que la SN dorsal y el VTA se proyectan hacia el STR ventral y la matriz del STR dorsal (González-Hernández y cols., 2009).

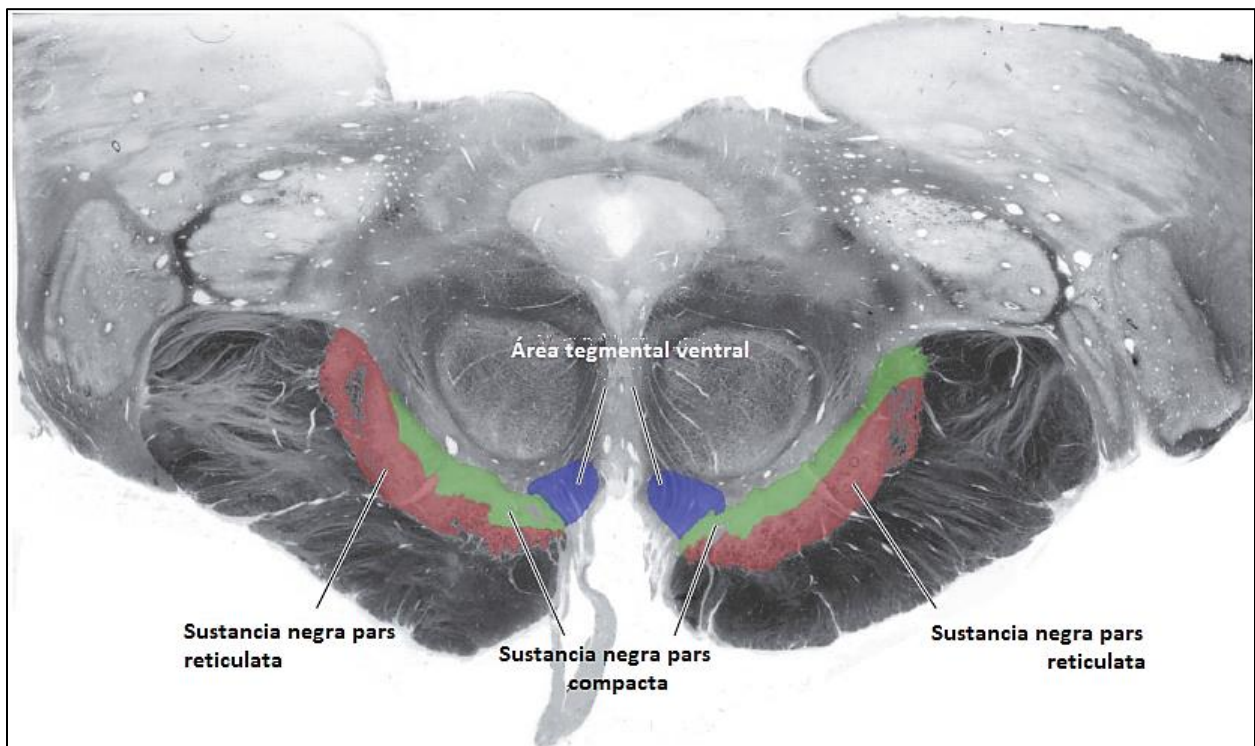


Figura 7. Divisiones de la sustancia negra. En rojo se muestra el área pars reticulata y en verde el área pars compacta de la sustancia negra. Tomado de <https://web.duke.edu/>.

El STR es un núcleo GABAérgico, constituido en un 90% por neuronas de proyección y en 10% por interneuronas. La mayoría de las neuronas ubicadas en el STR son llamadas neuronas espinosas medianas (MSNs), por su peculiar morfología, estas neuronas se pueden clasificar en dos tipos: las primeras inervan el GPe y expresan el

receptor para DA tipo D2, dando lugar a la vía indirecta del movimiento (STR-GPe-STN-GPi/SNr), mientras que las MSNs que proyectan al GPi y SNr, expresan receptores tipo D1 y dan lugar a la vía directa del movimiento (Figura 8 A) (Nelson y Kreitzer, 2014).

En la EP existe la pérdida del control de la actividad neuronal estriatal, y por lo tanto se pierde la inhibición sobre el GP y el tálamo, este último se vuelve más excitable activando a la corteza motora de manera descontrolada, lo que es observable en los síntomas motores de la enfermedad (Figura 8 B) (Maiti y cols., 2017).

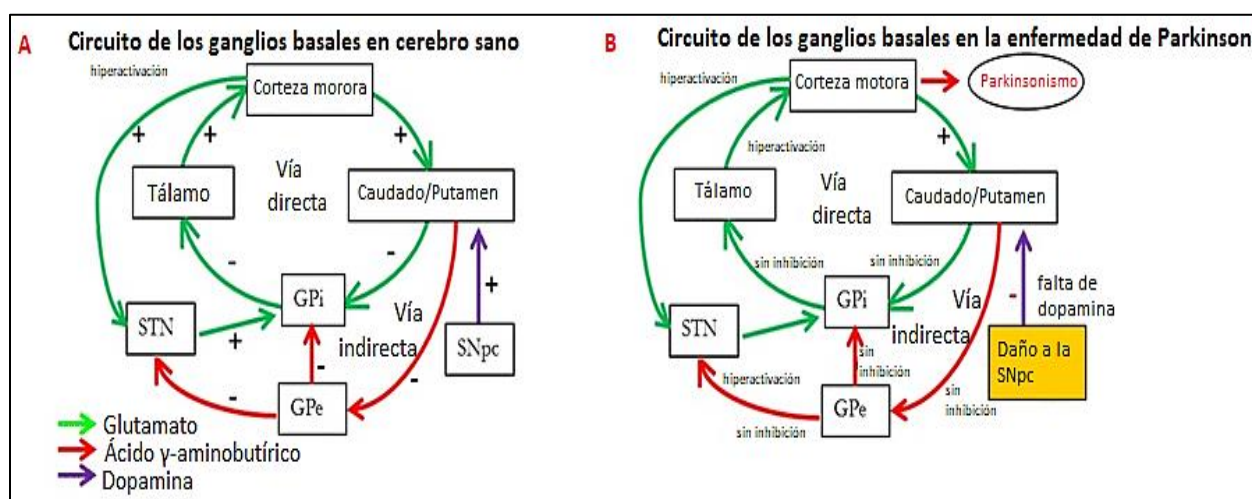


Figura 8. Vías de comunicación de los ganglios basales. A) vías de comunicación en un cerebro sano. B) vías de comunicación en un paciente con enfermedad de Parkinson, en los que no hay una correcta regulación de la actividad de la corteza motora debido a la pérdida de dopamina. La vía directa del movimiento está influenciada por la actividad del receptor de DA de la familia D1, mientras el receptor de la familia D2 el responsable de la actividad de la vía indirecta. El símbolo - significa inhibición, el símbolo + significa activación. Abreviaturas: GPi-globo palido interno, STN-núcleo subtalámico, GPe-globo pálido externo, SNpc-sustancia negra pars compacta. Tomado de Maiti y cols. (2017).

Modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson

En la actualidad, existen diversos estudios que han intentado generar un modelo animal de la EP con la mayor analogía posible con el padecimiento humano; para esto se han utilizado pesticidas como la rotenona (Mulcahy y cols., 2011) y el paraquat (Nisticò y cols., 2011), así como modelos genéticos (Creed y Goldberg, 2018; Kim y cols., 2005; Zarranz y cols., 2004; Zhu y cols., 2007), aunque los modelos más utilizados se basan en el uso de toxinas como el MPTP (Davis y cols., 1979) y la 6-OHDA (Thoenen y Tranzer, 1968). El MPTP se administra de manera intraperitoneal (IP), ya que atraviesa

la barrera hematoencefálica, por lo que además del daño a la vía nigroestriatal, provoca pérdida de neuronas GABAérgicas estriatales, pérdida de neuronas del VTA, del núcleo retrorubral y alta actividad de gliosis reactiva (Hernandez-Baltazar y cols., 2017); por otra parte, la 6-OHDA no atraviesa la barrera hematoencefálica, debe administrarse intracerebralmente, lo que la hace más selectiva para las neuronas DAérgicas de la SN causando su degeneración, es por ello, el modelo seleccionado para este estudio.

6-hidroxidopamina

En el año de 1968, Thoenen y Tranzer demostraron que la administración intracerebral de la 6-OHDA induce la degeneración de la vía nigroestriatal. Desde entonces se ha utilizado esta toxina intentando entender cómo es que se lleva a cabo el proceso degenerativo de las neuronas DAérgicas en el transcurso de la EP. En la actualidad, existen tres hipótesis que describen el posible mecanismo por el cual la 6-OHDA causa sus efectos, la primera menciona que se lleva a cabo un proceso de auto-oxidación intra o extracelular de la 6-OHDA, que favorece la producción de peróxido de hidrógeno y de radicales superóxido e hidroxilo (Blum y cols., 2001; Hanrott y cols., 2006); la segunda hipótesis indica que se lleva a cabo la degeneración celular por medio de la formación de peróxido de hidrógeno, por el efecto de las monoamino oxidasas (Chiba y cols., 1984; Heikiila y Cohen, 1971); por último se postula que se lleva a cabo por la inhibición del complejo I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial (Glinka y cols., 1996; Glinka y Youdim, 1998; Jenner y cols., 1992; Youdim y Glinka, 1995). A pesar de que aún existen diversas hipótesis sobre el posible mecanismo de acción, es muy probable que estos eventos actúen de manera simultánea o secuencial.

Para la inducción de un modelo de la EP con 6-OHDA, se ha utilizado la infusión en el haz medial del cerebro anterior, y la infusión intranigral directa, ambos procedimientos generan un daño agudo, el cual muestra de manera rápida los efectos de la neurotoxina. De forma alternativa se ha desarrollado la infusión intraestriatal, que tiene la ventaja de generar una pérdida progresiva y lenta de las neuronas DAérgicas, asemejándose más al proceso que se lleva a cabo en los humanos, además de que se puede realizar de manera bilateral o unilateral. La ventaja de utilizar el modelo unilateral es que los animales presentan conductas muy particulares, como es la selección

lateralizada y la acinesia del miembro anterior contralateral, con estas conductas se intenta inferir el nivel de daño inducido por la droga (Björklund y Dunnett, 2019; Dowd y cols., 2005; Glajch y cols., 2012; Grealish y cols., 2010).

Veneno de abeja

El VA es un conjunto de enzimas, proteínas, aminoácidos, catecolaminas, azúcares y minerales, entre otros (Tabla 4). Sus componentes más estudiados son la melitina, apamina y fosfolipasa A₂, esto se debe a que son los más abundantes. La sensación de dolor es causada principalmente por melitina, a través de dos mecanismos: por medio de la vía directa, que activa canales nociceptivos térmicos como TRPV1 (Receptor de potencial transitorio V1, del inglés: *Transient Receptor Potential Cation Channel 1*), a través de los metabolitos de fosfolipasa A₂-lipoxigenasa/ciclooxigenasa, mientras que la vía indirecta se basa en la formación de poros en la membrana celular, que permiten la liberación de sustancias que inducen el dolor y el daño tisular, como H⁺, ATP y la 5-hidroxitriptamina (5-HT) de los mastocitos, y provocan la activación de los receptores del dolor. A su vez, estos mecanismos implican la fosforilación de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), y la activación de los receptores transitorios purinérgicos P2X y P2Y activados por ATP (Chen y cols., 2016; Pucca y cols., 2019; Wehbe y cols., 2019). El mayor alérgeno de el VA es la fosfolipasa A₂ que cataliza la hidrólisis del enlace éster de los fosfoglicéridos, que entre otras cosas, al adherirse a las membranas de los glóbulos rojos puede producir hemólisis. La citotoxicidad del veneno se debe a la melitina, por la formación de poros anteriormente descrita, (Oller-Salvia y cols., 2013), sin embargo, se ha descubierto que existen al menos nueve polimorfismos en el gen de melitina y cada uno de ellos presenta diferente actividad biológica (Park y cols., 2014; Sciani y cols., 2010), por lo que existe la posibilidad de analizar cada una de las isoformas y determinar la más segura para tratamientos humanos. Además de las isoformas naturales, algunos de los componentes del VA han sido sintetizados, tal es el caso de Orn13,14, una isoforma de apamina, en la que se han sustituido los residuos Arg13 y Arg14, por Ornitina (Cosand y Merrifield, 1977), consiguiendo con ello eliminar la toxicidad y manteniendo su función biológica.

Tabla 4. Componentes del veneno de abeja. Se han logrado identificar más de 60 compuestos, de los cuales el más abundante es la melitina, seguida por la fosfolipasa A₂, ambas conforman cerca del 70% del peso seco. Modificado de Azam y cols. (2018).

Clase de moléculas	Componentes
Enzimas	Fosfolipasa A ₂ Ácido hialuronato Fosfomonoesterasa Lisofosfolipasa glucosidasa
Péptidos	Melitina Apamina Péptido desgranulador de mastocitos Secapin Procamina Adolapina Inhibidor de proteasa Tertiapina
Aminas activas	Histamina Dopamina Noradrenalina
Aminoácidos	Ácido aminobutírico
Azúcares	Glucosa Fructosa
Compuestos volátiles	Éteres complejos
Minerales	P, Ca, Mg

ANTECEDENTES

Neuroinflamación

La neuroinflamación es un proceso que ocurre en varias enfermedades, se define como la inflamación que se desarrolla en el cerebro y la médula espinal, mediada principalmente por células gliales, específicamente por la microglía y los astrocitos (Leonoudakis y cols., 2017), activadas por medio de receptores membranales *Toll like* (Carpentier y cols., 2008; Kielian, 2006), los cuales no solo participan en procesos infecciosos, sino también, juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Kielian, 2006; Yang y Zhou, 2019).

La activación de astrocitos y microglía, en primera instancia, es un mecanismo de protección, sin embargo, también favorecen el daño de células neuronales ya que producen citocinas proinflamatorias como IFN- α , IFN- β , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 y TNF- α (Yang y Zhou, 2019), así como especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés: *Reactive Oxygen Species*) y segundos mensajeros (DiSabato y cols., 2016). Estas señales proinflamatorias interactúan con las señales antiinflamatorias, en donde, el destino del tejido nervioso estará determinado por los diversos fenotipos de las células gliales que estén interaccionando.

En la actualidad, se desconoce si la neuroinflamación es el desencadenante principal de la EP, sin embargo, se ha reconocido que la inflamación crónica es un sello distintivo de la enfermedad. Inicialmente se observó en la SNpc de tejido *post mortem* de humano, microglía activada (McGeer y cols., 1988; Toulorge y cols., 2016), recientemente, gracias a técnicas actuales, sabemos que la microgliosis ocurre en distintas regiones del cerebro (Bartels y cols., 2010; Gerhard y cols., 2006), además, esto también ocurre en distintos modelos animales de la EP (Meredith y cols., 2005; Pinho y cols., 2003). La microglía en condiciones fisiológicas normales se mantiene inactiva por medio de inmunomoduladores producidos principalmente por células neuronales, pero en modelos animales de la EP se ha observado, por ejemplo, que la disfunción en la señalización del inmunomodulador CD200, en conjunto con su receptor CD200R

exacerba la degeneración de las neuronas DAérgicas (Wang y cols., 2011; Zhang y cols., 2011).

La activación de astrocitos, caracterizada por el aumento de los niveles de expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), y la hipertrofia del soma y las extensiones celulares, se han descrito en varios modelos animales de EP (Kuter y cols., 2018; Ransom y cols., 1987). Al igual que la microgliosis, la astrogliosis se ha identificado en tejido *post mortem* de pacientes con EP (Yamada y cols., 1992). Es posible que la DA tenga una participación en la astrogliosis, dado que se ha encontrado en ratones *knock-out* para el receptor D2 astroglial presentan astrogliosis elevada, mayor expresión de RNAm (ácido ribonucleico mensajero) de mediadores inflamatorios, y poca expresión de CRYAB (proteína $\alpha\beta$ -crystallin), una proteína de choque térmico con propiedades antiinflamatorias, específica de los astrocitos (Shao, 2012). Estos resultados se reportaron tanto en la SN *in vivo*, de ratones en edad avanzada (16 meses), como en cultivos celulares astrocitarios, lo que lleva a pensar que, dado que el sistema DAérgico, y por ende la dinámica de expresión de receptores dopaminérgicos disminuye con la edad (Antonini y Leenders, 1993; Hemby y cols., 2003), es posible que menos receptores D2 en los astrocitos contribuyan a la aceleración de las manifestaciones inflamatorias en las etapas tardías de la EP

Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo

Se define como estrés oxidativo el desequilibrio entre los niveles celulares de ROS y la capacidad para eliminarlos, lo que conlleva al daño celular (Dias y cols., 2013). Resultados previos indican que las neuronas de la SNpc tienen una especial vulnerabilidad a la degeneración, la cual se ha relacionado con su arborización axonal altamente elaborada (Pacelli y cols., 2015), ya que esto implica una mayor demanda de energía basal, lo que lleva a un estrés oxidativo crónicamente elevado, que hace a estas neuronas susceptibles a perturbaciones relacionadas con el envejecimiento o la exposición a tóxicos. En ese sentido, datos obtenidos de tejido humano, concuerdan con lo encontrado en modelos animales (Ali y cols., 1994; Rodríguez-Pallares y cols., 2007).

La información disponible en la actualidad muestra que, en el establecimiento de la EP, el daño oxidativo y la disfunción mitocondrial tienen un papel importante, aunque no se ha logrado definir concretamente la causa del inicio de estos eventos. Se identificó la disfunción del complejo I (Schapira y cols., 1989), lo cual se respalda por la reducción del consumo mitocondrial y total de O₂ que se encontró en tejido *post mortem* de pacientes con EP, además de un incremento en las concentraciones de citocromo C (Navarro y cols., 2009), el cual se libera tras el daño en los complejos III y IV. Más recientemente se propuso como factor etiológico la oxidación de DA, que conlleva al estrés oxidativo mitocondrial y resulta en una actividad enzimática glucocerebrosidasa reducida, disfunción lisosómica y acumulación de α -sinucleína (Burbulla y cols., 2017).

Veneno de abeja en el contexto de la neuroinflamación y el estrés oxidativo

Con respecto al VA, se ha utilizado desde décadas atrás en la medicina alternativa para tratar distintos padecimientos, pero en los últimos años, se han desarrollado estudios controlados para evaluar las características de este veneno para tratar enfermedades como es el caso de la artritis reumatoide, en la que el VA parece ser benéfico (Chen y cols., 2018). Aunque aún no existe una dosis establecida, en Corea la dosis terapéutica utilizada en humanos es de 5 μ g/kg (Kim y cols., 2004), y no se han observado respuestas adversas al incrementar la dosis 100 o 200 veces (Kim y cols., 2004), por lo que, en roedores muestra ser un tratamiento seguro. Estudios sugieren que el VA podría tener efectos antioxidantes y antiinflamatorios (Doo y cols., 2009; Kim y cols., 2011), eventos que tienen un papel relevante en la etiopatogénesis de la EP.

Se ha reportado que la administración solo de melitina o del VA completo, tienen la capacidad de inhibir la expresión de óxido nítrico (NO) y de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) en la microglia estimulada por lipopolisacáridos de manera dependiente de la dosis (Moon y cols., 2007). El VA, también ha demostrado ser capaz de suprimir la expresión de marcadores de microglía en el tronco encefálico y la médula espinal en un modelo de esclerosis lateral amiotrófica (ratones transgénicos hSOD1) (Yang y cols., 2010).

Algunas de las observaciones sobre la capacidad del VA en la EP son que, en el modelo de MPTP puede reducir la infiltración de células CD4T en el tejido cerebral, al aumentar la proporción de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Tregs), que juegan un papel esencial en el mantenimiento de la tolerancia inmune en condiciones fisiológicas (Chung y cols., 2012). En el mismo modelo el VA logró disminuir la activación microglial en la SNpc (Kim y cols., 2011; Kim y cols., 2019). Así mismo, resultados obtenidos en un modelo de rotenona, en el que se administró VA en el punto de acupuntura GB34, muestran que hay una disminución de citocinas proinflamatorias y genes apoptóticos, esta mejora se observó inclusive en comparación con animales tratados con L-DOPA, además, los resultados indican que tiene la capacidad de reducir la expresión de marcadores de estrés oxidativo, como es el caso del Malondialdehído (resultado de la peroxidación lipídica de ácidos grasos poliinsaturados) (Khalil y cols. 2015). Algunos de los estudios mencionados, han utilizado por separado compuestos del VA, como la melitina o la fosfolipasa A2, sin embargo, parece ser que el VA completo tiene mejores resultados (Wehbe y cols., 2019).

Finalmente, resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que una sola dosis de VA es capaz de mejorar la actividad motora, y protege a las neuronas DAérgicas de la degeneración causada por 6-OHDA (Lomelí, 2019).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La estrategia terapéutica más utilizada para tratar la EP consta de la administración del precursor de DA (L-DOPA), además de agonistas específicos para los receptores de DA (pramipexol, ropinirol, rotigotina, apomorfina), sin embargo, se sabe que estos fármacos no logran detener la degeneración neuronal, y por lo tanto los síntomas motores y no motores siguen presentes, además de que se ha observado que después de un uso crónico (5 -10 años aproximadamente) los pacientes ya no muestran respuesta benéfica al tratamiento y surgen complicaciones como es la discinesia, fluctuaciones motoras, alucinaciones y somnolencia ([Figge y cols., 2016](#); [Orme y cols., 2009](#); [Rascol y cols., 2000](#); [Verhagen Metman, 2002](#)). En la actualidad no se ha logrado establecer concretamente el proceso etiopatogénico de la EP, sin embargo, se reconoce que la inflamación, el estrés oxidativo y el daño mitocondrial son de gran relevancia para el establecimiento de la enfermedad, por lo que se han convertido en blancos terapéuticos para el control de la enfermedad.

JUSTIFICACIÓN

Trabajos previos muestran que los componentes del VA (enzimas y péptidos), tienen resultados prometedores en modelos de inflamación y estrés oxidativo, eventos importantes en la etiopatogénesis de la EP, estos resultados se atribuyen a la capacidad antiinflamatoria y antioxidante que muestra el VA. Por otro lado, la terapia farmacológica a base de L-DOPA es de largo plazo, y no es posible suspenderla a pesar de las complicaciones que su uso implica. Este trabajo propone utilizar VA como un coadyuvante al tratamiento convencional de la EP, lo que podría resultar en la potenciación del efecto de L-DOPA.

HIPÓTESIS

La combinación de L-DOPA con VA aumenta la eficacia del fármaco para controlar deficiencias motoras y cognitivas, y reducir la actividad inflamatoria presentes en un modelo animal hemiparkinsoniano.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la capacidad de la combinación de L-DOPA y VA para regular la neuroinflamación, mejorar la actividad motora y la capacidad cognitiva en un modelo de la EP.

Objetivos específicos

En ratones macho adulto de la cepa CD-1:

- Estimar la capacidad de la combinación de L-DOPA y VA para preservar la MCP.
- Evaluar la capacidad de la combinación de L-DOPA y VA para mejorar el inicio y el control de movimientos.
- Analizar la capacidad de la combinación de L-DOPA y VA para inhibir la activación de astrocitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio es experimental, teniendo en consideración las siguientes variables:

VARIABLES INDEPENDIENTES:

Peso de los roedores;
Dosis de fármacos;
Duración de las pruebas conductuales;
Días de evaluación conductual;
Áreas de análisis inmunohistoquímico.

VARIABLES DEPENDIENTES:

Tiempo de exploración dedicado al objeto familiar y novedoso;
Número de contactos del miembro anterior contralateral en 5 minutos;
Número de arrastres del miembro anterior contralateral en 5 minutos;
Número de recuperaciones de alimento contralaterales;
Densidad óptica por área.

Animales

Se utilizaron ratones CD-1 machos con 12 semanas de edad (n=30) y pesos de 35 a 40 gramos al momento de la cirugía, mantenidos bajo condiciones controladas: ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas y temperatura de $22 \pm 3^\circ \text{C}$, con acceso libre a agua y alimento. Se asignaron cinco grupos distintos de seis individuos: Grupo SHAM, Grupo 6-OHDA, Grupo 6-OHDA+L-DOPA, Grupo 6-OHDA+VA y Grupo 6-OHDA+L-DOPA+VA. Todos los animales se sometieron a las pruebas conductuales e inmunohistoquímica.

Cirugía

Para la administración de 6-OHDA los animales se anestesiaron con Ketamina (ANESKET®, PiSA Agropecuaria) y Xilacina (PROCIN®, PiSA Agropecuaria) con una dosis de 100 mg/kg y 10 mg/kg respectivamente por vía IP, y asegurados en un marco estereotáxico (Stoelting, modelo 51600, Wood Dale, USA). Para evitar la afectación de neuronas noradrenérgicas se inyectaron 25 mg/kg de Imipramina

(Sigma-Aldrich, USA, cat. I0899) por vía subcutánea (SC), 15 minutos antes de iniciar la cirugía. La inyección intracerebral en el STR se llevó a cabo en las coordenadas: AP +0.3, LM -1.8 y DV -2.9 (Paxinos y Frankiln, 2019), donde se realizó un trepano en el cráneo y utilizando una microjeringa de 250 µl (Hamilton Company, Nevada, USA) conectada a una bomba de infusión (Fusion 200, Chemyx, Inc., USA) con flujo de 2 µl/minuto, durante 6 minutos se administró una única dosis de 3 µg de 6-OHDA hidroc্লorida (Sigma-Aldrich, USA, cat. H4381) disuelta en solución salina al 0.9% con ácido ascórbico al 0.01%, a 4° C y protegida de la oxidación por luz. Antes de ser retirada la aguja se mantuvo en su lugar por 4 minutos extras para asegurar la absorción de la neurotoxina por el tejido cerebral. Los animales del grupo SHAM se sometieron al mismo procedimiento, pero solo se les administró el vehículo. Para corroborar que la infusión de 6-OHDA se realizó en el STR, se tiñeron cortes aleatorios de cada grupo utilizando la técnica de Nissl. Ninguno de los animales perdió peso después de la cirugía y se tuvo una tasa de supervivencia mayor al 96%, con solo una muerte.

Administración de tratamientos

La administración de los tratamientos se resume en la Tabla 5.

Administración de L-3,4 dihidroxifenilalanina

Transcurridos 13 días después de la cirugía, se comenzó con la inyección de L-DOPA combinada con Carbidopa (CLOISONE®, PSICOFARMA), vía IP, a una dosis de 10 mg/kg y 1 mg/kg, respectivamente, en solución salina al 0.9%, utilizando una jeringa de calibre 30 G x 13 mm, cada 24 horas durante 17 días.

Administración de veneno de abeja

Una vez transcurridos 13 días postoperatorios, se comenzó con la inyección de VA (natural y liofilizado), vía SC, a una dosis de 1.2 mg/kg en solución salina al 0.9% por medio de una jeringa de calibre 30 G x 13 mm cada 48 horas durante 17 días.

Administración combinada de L-3,4 dihidroxifenilalanina y veneno de abeja

En el grupo con tratamiento combinado, se iniciaron las inyecciones a los 13 días postoperatorios, utilizando las mismas cantidades, tiempos, vías de administración

y jeringas, anteriormente descritos. En los días que la inyección de ambos tratamientos coincidía, primero se administraba L-DOPA, seguido del VA, manteniendo un lapso de 1 hora entre cada inyección.

Tabla 5. Tratamientos de los grupos.

Grupo	Tratamiento	Día de administración
6-OHDA	X	X
SHAM	X	X
L-DOPA	10 mg/kg de L-3,4 dihidroxifenilalanina por vía ip	Cada 24 horas durante 17 días
	1 mg/kg de Carbidopa por vía ip	Cada 24 horas durante 17 días
VA	1.2 mg/kg de veneno de abeja por vía sc	Cada 48 horas durante 17 días
VA + L-DOPA	1.2 mg/kg de veneno de abeja por vía sc	Cada 48 horas durante 17 días
	10 mg/kg de L-3,4 dihidroxifenilalanina por vía ip	Cada 24 horas durante 17 días
	1 mg/kg de Carbidopa por vía ip	Cada 24 horas durante 17 días

Pruebas conductuales

Las pruebas conductuales se realizaron en tres tiempos distintos: 13 días postoperatorios (T1, sin ninguna administración de tratamiento), 21 días postoperatorios (T2, cuando los animales cumplieron 9 días con tratamiento) y 30 días postoperatorios (T3, cuando los animales cumplieron 18 días con tratamiento). La prueba del corredor, solo se realizó a los 30 días postoperatorios.

Prueba de reconocimiento de objeto novedoso

La prueba se llevó a cabo en una cámara de acrílico de piso transparente, con medidas de 30 x 37 centímetros, con un espejo por debajo inclinado a 45° con respecto al piso de la cámara, que se utiliza para realizar las videograbaciones. Los animales se habituaron a la cámara sin objetos durante 10 minutos, media hora antes de la fase de entrenamiento, en la que se colocaron dos objetos idénticos en

esquinas contrarias de la cámara y se ingresaron a los animales al centro. Posteriormente se inició con el registro de prueba que consistió en tres fases: F1, F2 y F3. En la F1, uno de los objetos del entrenamiento se conservó y se ingresó un nuevo objeto. Este procedimiento se repitió en F2 y F3, manteniendo uno de los objetos constante. El entrenamiento y cada fase duró 5 minutos, y una vez terminada cada una, los animales eran regresados a una caja de mantenimiento por 10 minutos. Tanto los objetos como la cámara de acrílico fueron limpiados con alcohol al 70% entre cada fase para eliminar olores que pudieran influenciar los resultados.

Lo que se obtiene del análisis es el índice de discriminación (ID) que representa el tiempo dedicado a explorar el objeto novedoso entre el tiempo total de exploración, por cien (Ecuación 1) (Lueptow, 2017).

$$d = \frac{n}{t} \times 100 \quad (1)$$

donde:

d es el índice de discriminación;

n es el tiempo en segundos que el animal dedicó a explorar el objeto novedoso;

t es el tiempo en segundos que el animal dedicó a explorar el objeto novedoso y el objeto familiar.

Prueba del cilindro

Esta prueba evalúa el uso y el arrastre del miembro anterior contralateral a la lesión. Se llevó a cabo en un cilindro de acrílico transparente de 20 centímetros de alto y 13 centímetros de diámetro, que cuenta con un espejo por debajo, inclinado a 45° con respecto al piso para realizar las videograbaciones. Los animales no fueron habituados al cilindro, y se grabaron durante 5 minutos, entre cada individuo el cilindro de acrílico era limpiado con alcohol al 70%.

Los datos se expresan mediante dos ecuaciones: el uso del miembro anterior contralateral se muestra como el porcentaje de apoyos contralaterales en relación con el total de apoyos realizados con ambas extremidades (Ecuación 2), y el arrastre del miembro contralateral se muestra como el porcentaje de arrastres en relación con el total de apoyos (Ecuación 3) (Roome y Vanderluit, 2015).

$$a = \frac{a1}{t} \times 100 \quad (2)$$

donde:

a es el índice de asimetría de la extremidad anterior;

$a1$ es el número de apoyos contralaterales a la lesión

t es el número total de apoyos (ipsilaterales, contralaterales y ambas extremidades).

$$A = \frac{A1}{t} \times 100 \quad (3)$$

donde:

A es el índice de arrastre del miembro contralateral

$A1$ es el número de arrastres del miembro contralateral

t es el número total de apoyos (ipsilaterales, contralaterales y ambas extremidades).

Prueba del corredor

Es una herramienta que se utiliza para evaluar la asimetría del contenido de DA entre los hemisferios cerebrales. Se llevó a cabo a los 30 días posteriores a la cirugía (18 días con tratamiento), utilizando un corredor de acrílico de 60 centímetros de largo, 6 centímetros de ancho y 30 centímetros de alto, con 10 pares de contenedores de 1 centímetro de diámetro, colocados de manera adyacente a intervalos de 5 cm a lo largo del corredor. En los contenedores se colocaron 4-5 gránulos de galleta (20 a 25 mg), y las grabaciones se realizaron desde una vista

aérea. Los animales se habituaron al corredor sin los contenedores durante dos días previos a la prueba, por un lapso de 5 minutos, a partir del segundo día de entrenamiento y hasta el día de prueba se les privó de alimento (24 horas).

Se registró el número de recuperaciones ipsilaterales y contralaterales a la lesión hasta que realizaron un total de 20 recuperaciones. Una recuperación se consideró como la exploración en uno de los contenedores independientemente si el animal se come o no el gránulo de galleta, y solo se considera como una nueva recuperación cuando cambia de contenedor. Los datos se expresan como el porcentaje de recuperaciones contralaterales en relación al total de recuperaciones (Ecuación 4) (Dowd y cols., 2005).

$$r = \frac{r1}{t} \times 100 \quad (4)$$

donde:

r es el índice de recuperaciones contralaterales

$r1$ es el número de recuperaciones contralaterales

t es el número total de recuperaciones (ipsilaterales y contralaterales)

Inmunohistoquímica para astrocitos

Preparación de tejido

El sacrificio de los animales se realizó 31 días postoperatorios, se anestesiaron con pentobarbital sódico (PISABENTAL®, Pisa Agropecuaria) con una dosis de 200 mg/kg por vía IP, para ser perfundidos por vía intracardiaca, inicialmente con solución lavadora (solución salina fisiológica) y posteriormente con una solución fijadora (paraformaldehído al 4%, pH 7.2). Una vez endurecido el tejido, se extrajo el cerebro completo y se conservó en paraformaldehído al 4% a 4° C. Se realizaron cortes del tejido del hemisferio ipsilateral a la lesión de 40 µm, en un vibratomo

(Leica VT1000S), a nivel del STR, hipocampo (C1 y C2), PFC y SN, manteniendo el tejido cortado en buffer fosfato salino (PBS) 1x a 4° C hasta procesar.

Marcaje inmunofluorescente por flotación

Para procesar el tejido, se permeabilizó con PBS al 1x (pH 7.4) adicionado con Tritón X-100 al 0.2% durante 30 minutos, enseguida se pasó el tejido a una solución bloqueadora de albúmina al 0.5% en PBS 1x por 30 minutos, seguida de 3 lavados con PBS 1x de 10 minutos, para pasar a la incubación con el anticuerpo primario GFAP-mouse (Cat. MAB360, Millipore) diluido 1:1000 en PBS 1x Tween 20 al 0.2% (PBS-T) a 4° C durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS-T de 10 minutos y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario anti-mouse IgG488 Alexa (Cat. A11001, Termofisher) diluido 1:5000 en PBS-T, durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad, seguido de 3 lavados con PBS-T de 10 minutos. Finalmente, el tejido procesado se montó en portaobjetos con medio conservador de fluorescencia (VECTASHIELD, Cat. H-1000, Vector Laboratories), sellándose con un cubreobjetos y barniz de uñas. Las fotografías del tejido se realizaron en un microscopio de epi-flouescencia Olympus BX53 (lámpara Lumen Dynamics X-Cite series 120 Q, cámara QImaging MicroPublisher 5.0 RTV, adaptador para cámara U-TV0.5XC-3).

Análisis de densidad óptica

El análisis de la densidad de fluorescencia de astrocitos se realizó utilizando el software ImageJ (v. 1.52 A) calculando el logaritmo del cociente entre la intensidad de luz que incide sobre sobre la imagen y la intensidad de luz que se refleja de la imagen, también conocido como densidad óptica (OD) (Ecuación 5).

$$OD = \log 10 \frac{I}{T} \quad (5)$$

donde:

OD es densidad óptica

I es la intensidad de la luz incidente

t es la intensidad de la luz emergente

Análisis estadístico

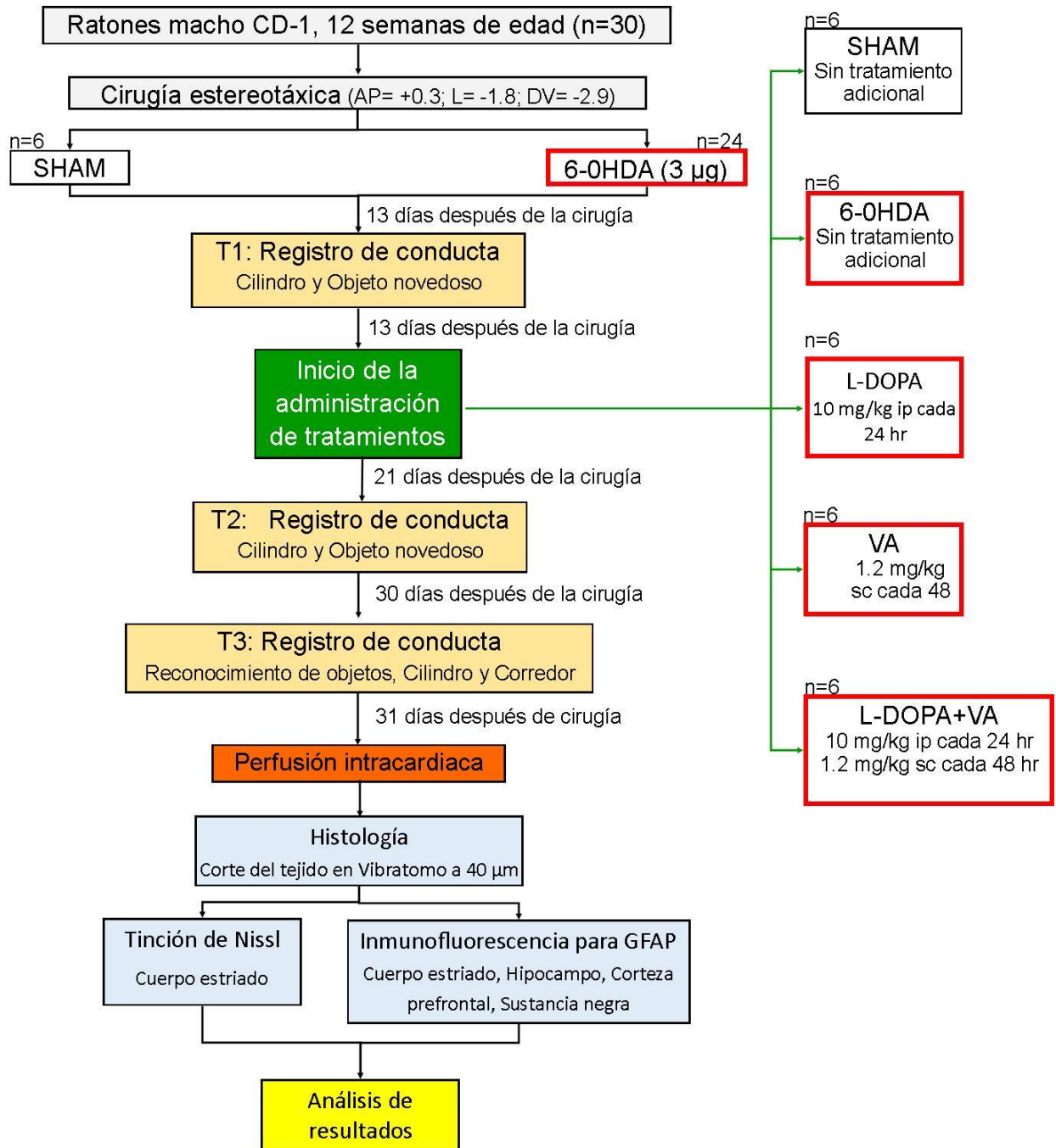
Tanto los datos de las pruebas conductuales como los de OD se analizaron mediante prueba de ANOVA, con post-hoc de Tukey, considerando diferencias significativas con $\alpha < 0.05$, mediante el software estadístico Minitab 17.

LIMITACIONES DEL TRABAJO

El uso de modelos animales para el estudio de padecimientos es aceptado, sin embargo, tiene ciertas limitaciones, ya que es difícil reproducir todas las características que se presentan en humanos. El modelo de 6-OHDA es uno de los más utilizados, no obstante, se debe de considerar que la EP tarda años en manifestarse, por lo que en la actualidad se desconocen las causas de su inicio. Con este modelo, al administrarse una neurotoxina que produce la degeneración rápida de las neuronas DAérgicas, se pierde la dimensión temporal propia del padecimiento, además es importante mencionar que se carece de la aparición de cuerpos de Lewy, que son característicos en la enfermedad en humanos.

También, es de considerar que en este trabajo se utilizó VA en su forma natural liofilizada, del cual existen distintos estudios en el que se analizan sus componentes, por lo que se pueden inferir las cantidades que se inyectaron de cada componente, sin embargo, es un dato que no se tiene con exactitud.

DIAGRAMA EXPERIMENTAL



RESULTADOS

Validación de modelo

Para validar el modelo, se verificó que las coordenadas estereotáxicas utilizadas correspondieran al área de interés. La tinción de Nissl mostró que la inyección de 6-OHDA se logró generar correctamente en el STR derecho, en el que se observa el característico barrido de células en el recorrido de la aguja (Figura 9).

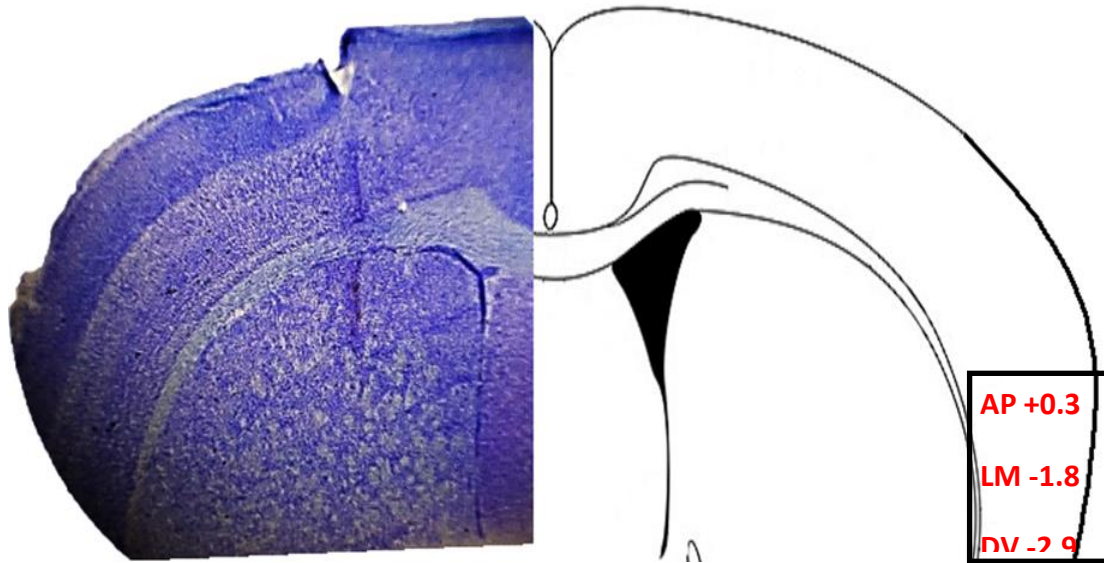


Figura 9. Tinción de Nissl. Se validó que las coordenadas estereotáxicas utilizadas correspondieran a la región de interés, para la correcta administración de 6-OHDA en el estriado.

Pruebas conductuales

Prueba de reconocimiento de objeto novedoso

La prueba de reconocimiento de objeto novedoso realizada se ajustó para la evaluación de la MCP. Esta prueba consta de una primera fase de entrenamiento, en la cual los animales exploran dos objetos que son idénticos, y varias fases posteriores en las que uno de los objetos familiares es cambiado por uno nuevo, por lo tanto, un animal que no presenta algún tipo de daño que afecte el proceso de aprendizaje o memoria tendrá la capacidad de recordar el objeto familiar, y por su conducta exploratoria innata dedicará más tiempo explorando el objeto nuevo. Sin embargo, cuando existe algún tipo de daño que afecte los procesos de memoria, se observa que los animales no logran recordar el objeto que se les había presentado

anteriormente, por lo que dedican tiempos muy similares explorando ambos objetos, o inclusive dedican mayor tiempo explorando el objeto familiar. Para el análisis de esta prueba se utiliza el ID, que muestra si los roedores logran distinguir entre el objeto familiar y novedoso, al realizar el cálculo se obtienen valores que oscilan entre -1 y +1, los valores cercanos a +1 se obtienen cuando logran identificar el objeto familiar, por lo que dedican casi todo el tiempo de la prueba explorando el objeto novedoso; cuando dedican tiempos similares explorando ambos objetos, es porque no logran discriminar el objeto familiar, y se obtienen valores positivos o negativos que son cercanos a 0; finalmente, cuando se obtienen valores cercanos a -1 es porque el animal dedica casi todo el tiempo explorando el objeto familiar. Es entonces que este índice da una referencia del nivel de afectación en la MCP, por lo que se puede utilizar para demostrar si algún tratamiento tiene efectos positivos, no obstante, se debe de tomar en cuenta que ninguna prueba realizada en este estudio es una escala de intervalo.

El análisis de datos muestra que todos los grupos a los 13 días después de la lesión (T1) lograban discriminar el objeto familiar, y dedicaban el mayor tiempo explorando el objeto novedoso (Figura 10), por lo que aún no había indicios medibles por esta prueba que indicaran que los animales presentaban pérdida de MCP. Sin embargo, a los 21 y 30 días postoperatorios (T2 y T3, respectivamente) los grupos 6-OHDA y L-DOPA en cada una de las fases dedicaron tiempos similares explorando ambos objetos, y algunos de los individuos pasaron la mayor parte del tiempo interactuando con el objeto familiar, mientras que los grupos SHAM, VA y L-DOPA+VA preservaron la capacidad de recordar el objeto familiar en todas los tiempos, sin diferencia significativa entre ellos (Figura 11 y 12).

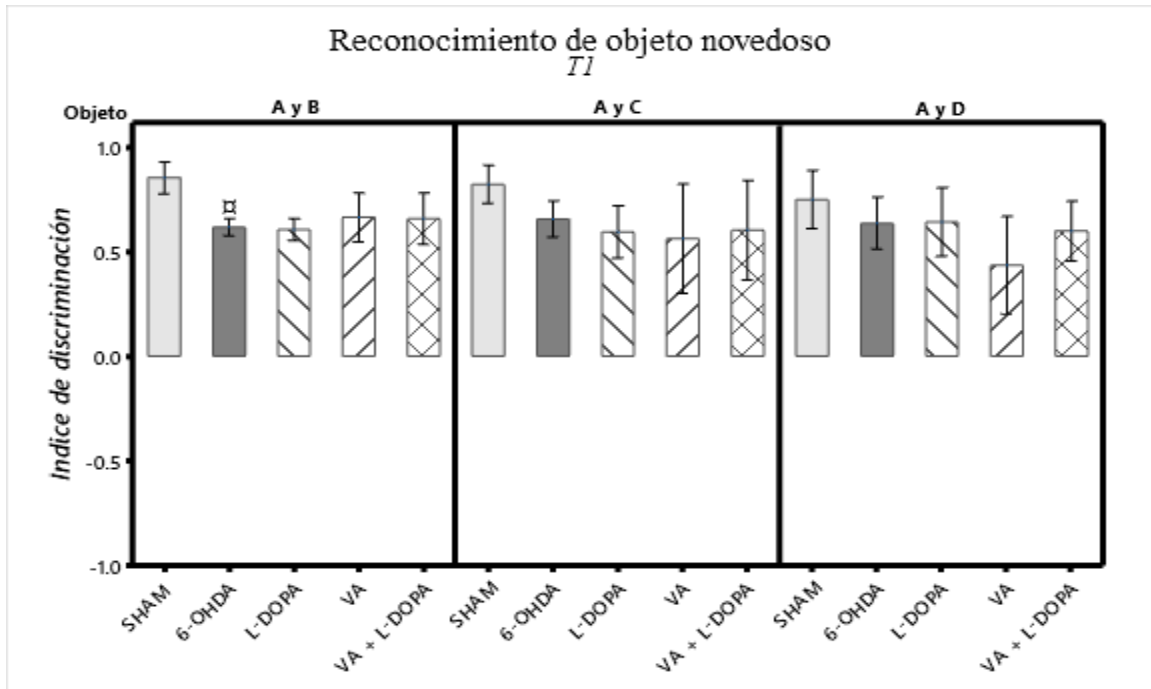


Figura 10. Prueba de reconocimiento de objeto novedoso en T1. Transcurridos 13 días posteriores a la cirugía estereotáxica y sin ningún tratamiento adicional, todos los grupos obtuvieron ID cercanos a 1, lo que indica que mantienen intacta su memoria de corto plazo. A: objeto familiar, B, C y D: objeto novedoso. $p < 0.05$ vs SHAM por ANOVA + Tukey.

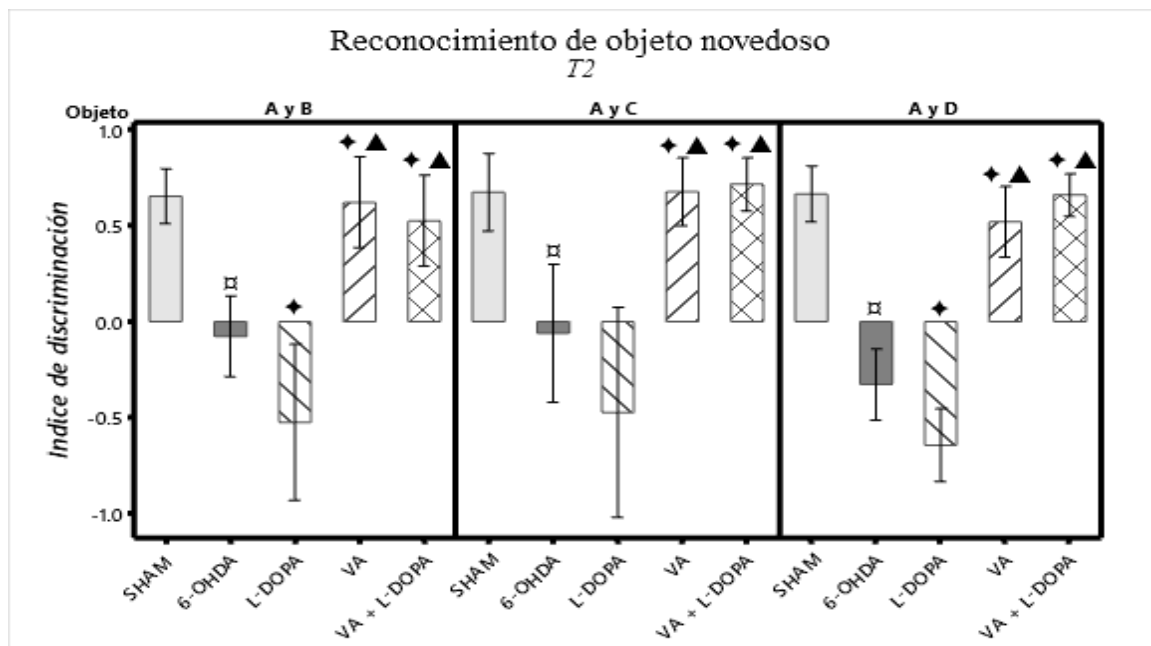


Figura 11. Prueba de reconocimiento de objeto novedoso en T2. Los animales con inyección de 6-OHDA, sin tratamiento o con tratamiento de L-DOPA, muestran a los 21 días ID negativos, que indican dificultad para recordar objetos, sin embargo, los animales con tratamiento de VA y L-DOPA+VA logran preservar el recuerdo

del objeto familiar, obteniendo mejores resultados en el ID. A: objeto familiar, B, C y D: objeto novedoso. \square $p < 0.05$ vs SHAM; \star $p < 0.05$ vs 6-OHDA; \blacktriangle $p < 0.05$ vs L-DOPA por ANOVA + Tukey.

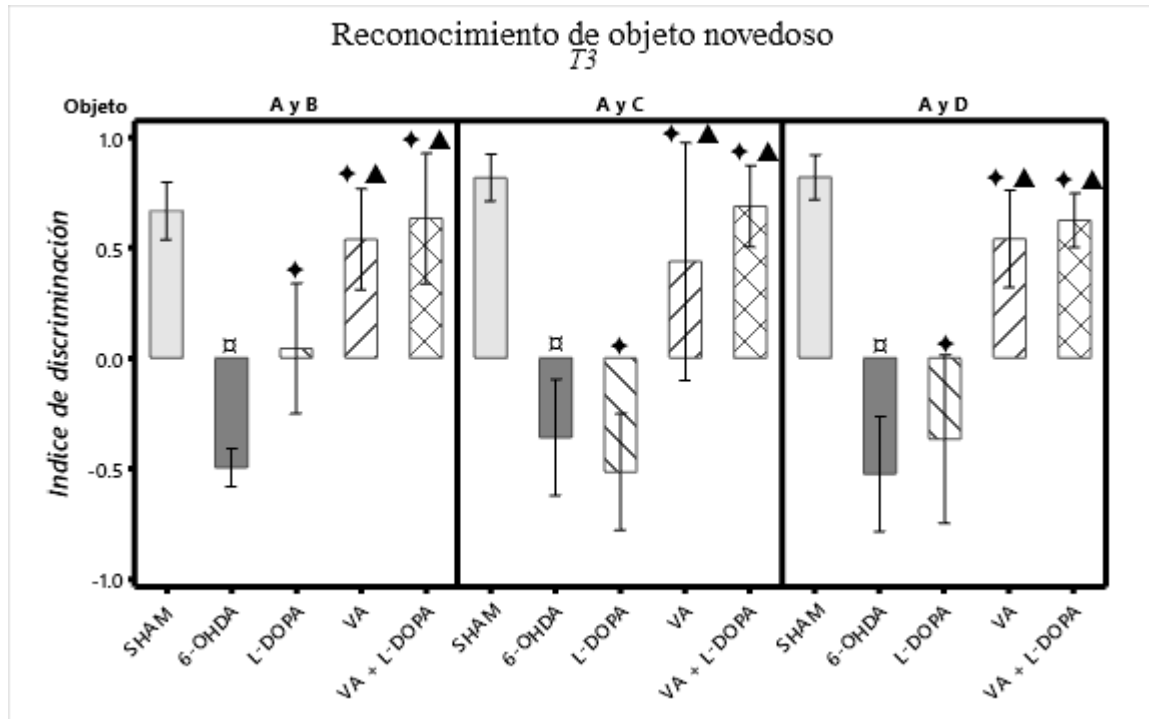


Figura 12. Prueba de reconocimiento de objeto novedoso en T3. Las diferencias observadas en el ID a los 21 días postoperatorios se mantienen a los 30 días, sugiriendo que tanto los animales del grupo 6-OHDA y L-DOPA presentan dificultad para conservar el recuerdo del objeto familiar, mientras que el grupo VA y L-DOPA obtuvieron resultados similares al grupo SHAM. A: objeto familiar, B, C y D: objeto novedoso. \square $p < 0.05$ vs SHAM; \star $p < 0.05$ vs 6-OHDA; \blacktriangle $p < 0.05$ vs L-DOPA por ANOVA + Tukey.

Prueba del cilindro

El modelo de daño unilateral con 6-OHDA tiene como ventaja la aparición de conductas motoras lateralizadas. En el caso de los miembros anteriores, se observa que el número de contactos realizados en la pared del cilindro con la pata contralateral a la lesión con 6-OHDA, disminuye en un 10-30% en relación con el número total de contactos realizados con ambas extremidades (Glajch y cols., 2012). Se ha demostrado en modelos animales, que medicamentos antiparkinsonianos mejoran los resultados en esta prueba, por lo que validan su uso para la detección de tratamientos efectivos (Cenci y Lundblad, 2005). Los resultados muestran que todos los animales en el tiempo T1 logran utilizar ambas extremidades en proporciones muy similares y sin diferencia estadística entre los grupos, sin

embargo, en el tiempo T2, el grupo 6-OHDA redujo significativamente el número de apoyos realizados con el miembro contralateral en comparación con los demás grupos, condición que continuó presentándose en el tiempo T3, lo que concuerda con el daño esperado por la presencia de la droga. Con respecto al grupo L-DOPA, a los 30 días el número de apoyos de la pata contralateral es mayor que el grupo 6-OHDA, sin embargo, este resultado es significativamente menor en comparación con los grupos VA y VA+L-DOPA, los cuales tuvieron resultados similares al grupo SHAM en todos los tiempos, indicando una recuperación que puede atribuirse al tratamiento (Figura 13).

Por otra parte, el arrastre se presenta cuando los animales tienen en contacto ambas extremidades delanteras con la pared del cilindro, y la pata contralateral a la lesión es contraída hacia su línea media o hacia abajo con un ligero temblor, mientras que la pata ipsilateral continua en contacto con el cilindro (Figura 14). Esta conducta se presenta en animales tras el daño en la corteza motora (Roome y Vanderluit, 2015), daño que sucede en pacientes con la EP (Thickbroom y cols., 2006) y en animales tras la administración de 6-OHDA (Rios y cols., 2019). El análisis de los datos del T1 muestra que, a excepción del grupo SHAM, todos los animales presentaron la conducta de arrastre, indicando la afectación motora esperada. Sin embargo, en los tiempos T2 y T3, los grupos L-DOPA, VA y VA+L-DOPA muestran reducción en el número de arrastres, resultado que es significativamente diferente en comparación con el grupo 6-OHDA, el cual obtuvo valores muy similares en todos los tiempos (Figura 15).

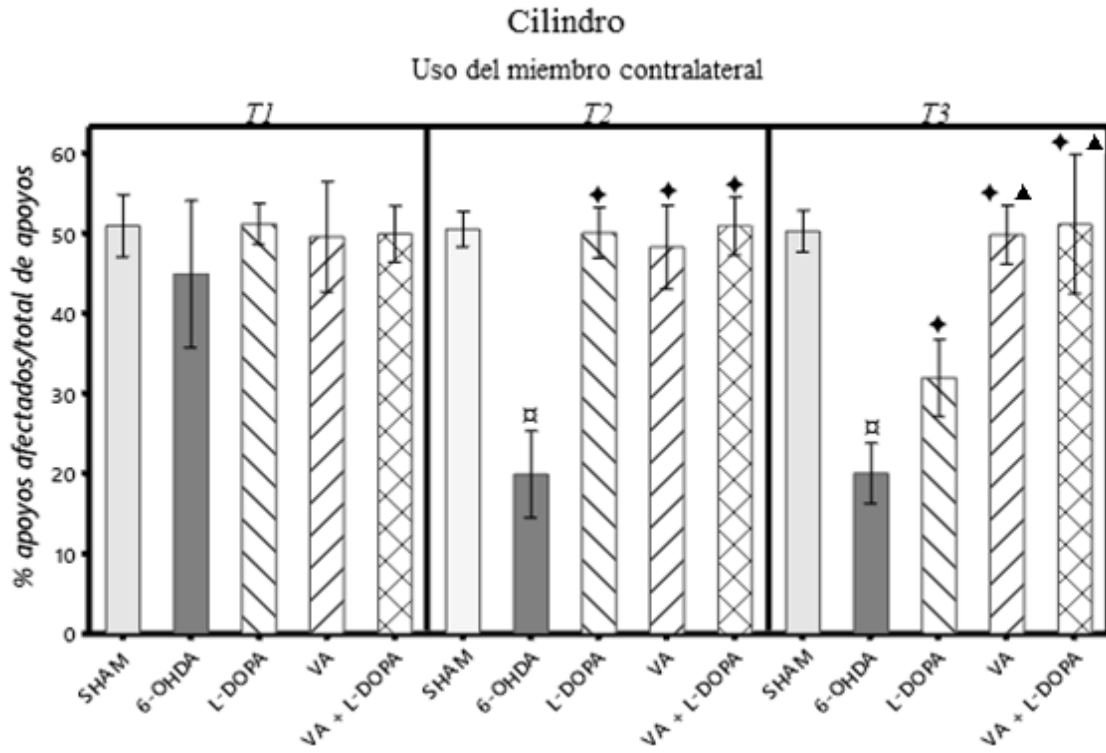


Figura 13. Prueba del cilindro: uso del miembro contralateral. Los animales del grupo 6-OHDA ya presentan una actividad reducida del miembro anterior contralateral a la lesión a los 21 días posteriores al daño (T2 y T3). Esto se observó también en los animales tratados con L-DOPA después de 30 días del daño (T3), mientras que los tratados con VA solo o en combinación mantienen resultados al nivel del grupo SHAM. $\#p < 0.05$ vs SHAM; $\star p < 0.05$ vs 6-OHDA; $\blacktriangle p < 0.05$ vs L-DOPA por ANOVA + Tukey.

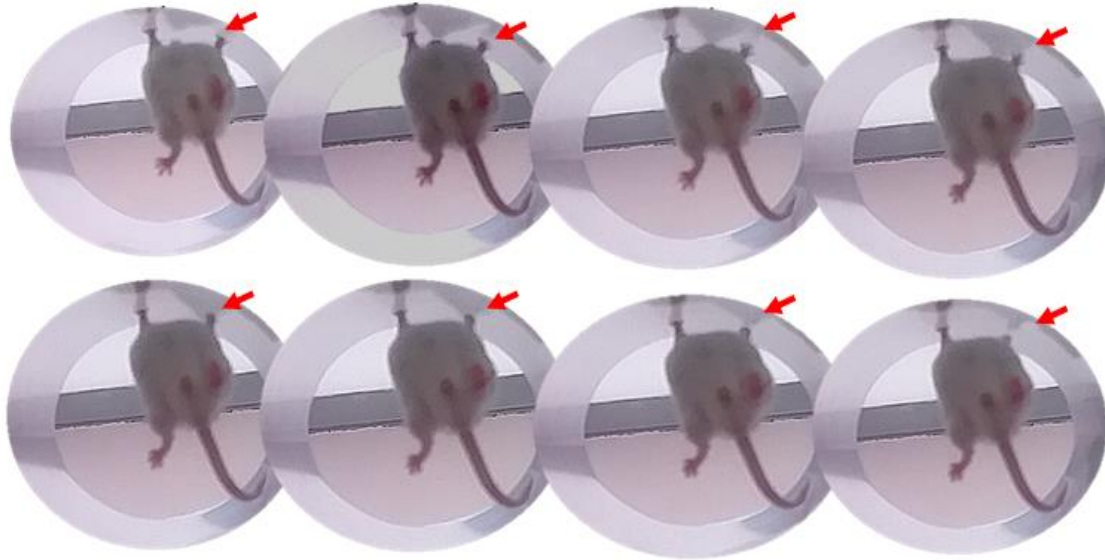


Figura 14. Arrastre del miembro contralateral. Secuencia del arrastre del miembro anterior de un animal con lesión unilateral. Se presenta cuando el animal apoya la extremidad en la pared del cilindro, seguida por la retracción con ligero temblor.

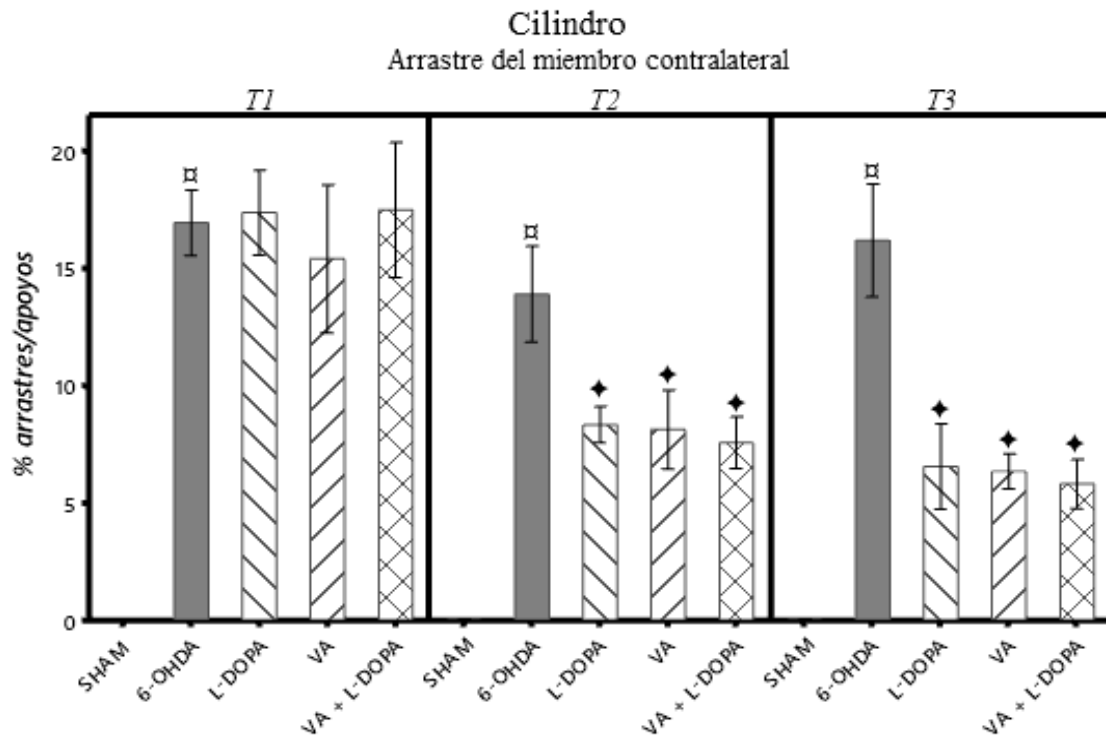


Figura 15. Prueba del cilindro: arrastre del miembro contralateral. Al día 13 (*T1*) los animales con 6-OHDA ya presentan la conducta de arrastre, que en el grupo SHAM no se observa en ningún tiempo evaluado. Dicha conducta se atenúa a los 21 días después del daño (*T2*) tras el tratamiento con L-DOPA, VA o la combinación

de ambos, y a los 30 días postoperatorios aún se preservan estos resultados. $\#p < 0.05$ vs SHAM; $\#p < 0.05$ vs 6-OHDA por ANOVA + Tukey.

Prueba del corredor

La aparición de conductas lateralizadas en el modelo de 6-OHDA se presentan debido al agotamiento de DA en el STR ipsilateral a la lesión, por lo que hay un incremento de los receptores para DA en comparación con el hemisferio contralateral. Esto generalmente se evalúa utilizando anfetaminas, que tras su administración IP genera una conducta de giro automático que permite evaluar la asimetría del contenido de DA entre ambos hemisferios, y obtener así una referencia del nivel de daño presente en el STR lesionado. Sin embargo, no se ha encontrado alguna cepa de ratón que presente esta conducta, por lo que Dowd y cols. (2005) desarrollaron la prueba del corredor (Figura 16), que cumple la misma función que la prueba de rotación inducida, con la ventaja de no utilizar drogas para su realización.

Los resultados muestran que los animales del grupo 6-OHDA en el tiempo T3 presentan una marcada incapacidad por recuperar el alimento del lado contralateral, al contrario de los grupos SHAM, L-DOPA, VA y L-DOPA+VA, que logran tomar el alimento de manera indiscriminada en ambos lados (Figura 17), lo que indica que el contenido de DA del hemisferio ipsilateral se ha recuperado.

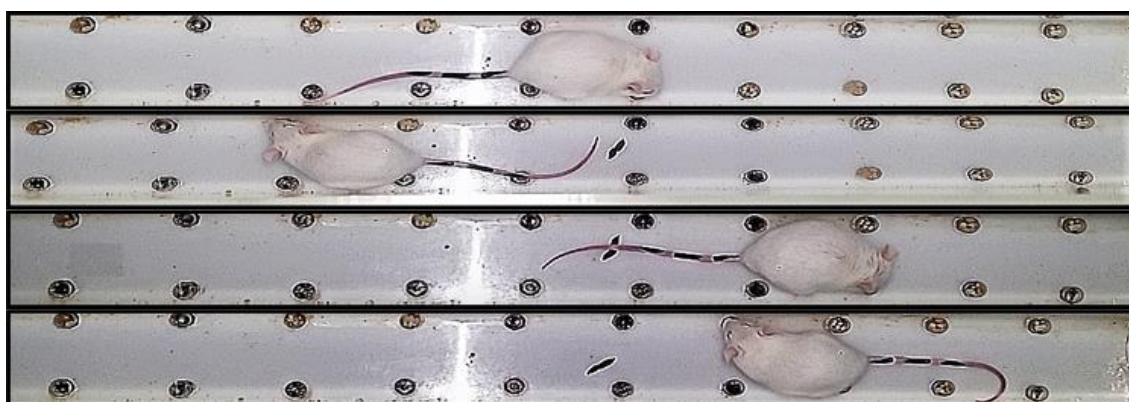


Figura 16. Recorrido en el corredor. Secuencia del recorrido a través del corredor de un animal con lesión dopaminérgica unilateral, que recupera el alimento mayormente del lado ipsilateral a la lesión debido al desbalance en el contenido de DA de ambos hemisferios.

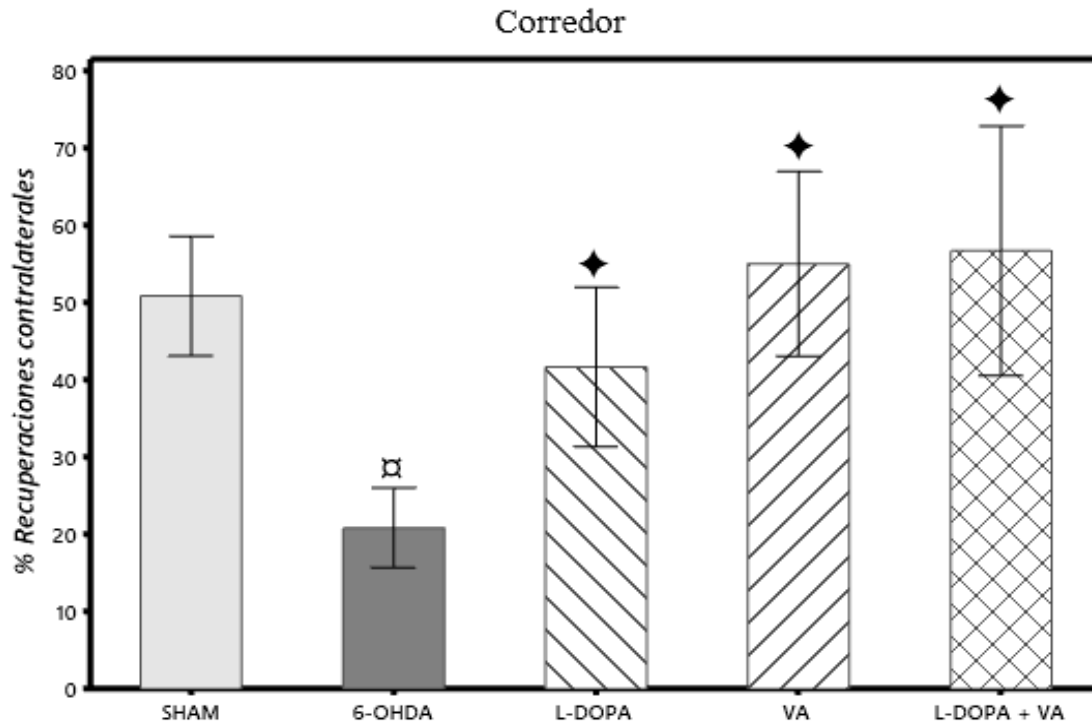


Figura 17. Prueba del corredor. El grupo 6-OHDA a los 30 días posteriores a la lesión presentó una marcada preferencia por la recuperación del alimento del lado ipsilateral. Los grupos L-DOPA, VA y L-DOPA+VA mostraron una atenuación de esta conducta, con mejor ejecución en los animales con administración de VA. □p <0.05 vs SHAM; ◆p <0.05 vs 6-OHDA por ANOVA + Tukey.

Inmunohistoquímica para astrocitos

Los resultados que se obtienen tras el análisis de la OD dependen de la iluminación del microscopio, del objetivo utilizado, y de la configuración de la cámara, por lo tanto, se calibró la densitometría óptica, procedimiento que consiste en establecer una correspondencia entre los valores de gris de la imagen digital y sus valores correspondientes de densidad óptica. La calibración se realizó utilizando los valores de la Figura 18 y se graficó la media de la OD.



Figura 18. Calibración de densitometría óptica. La figura muestra los valores utilizados para generar la curva de calibración en el software ImageJ, con la que se analizaron las fotografías digitales de atrociitos para el cálculo de la OD.

Cuerpo Estriado

Los resultados obtenidos muestran que la inyección estriatal de 6-OHDA induce la activación astrogliar local, evento que ya se había reportado anteriormente (Henning y cols., 2008; Pinho y cols., 2003). Adicionalmente, se observó que en los animales con inyección de 6-OHDA y posterior tratamiento con L-DOPA, VA o L-DOPA+VA hay una disminución en la activación astrocítica, obteniendo valores similares a los animales del grupo SHAM (Figura 19). Debe mencionarse que, en el grupo SHAM se presentó activación de astrocitos, en las zonas cercanas a la inyección, pero esta puede atribuirse al daño mecánico por la cirugía estereotáxica. Esto refuerza la importancia de incluir un grupo SHAM y no un grupo intacto como control, ya que se pueden sobrevalorar los resultados.

GFAP

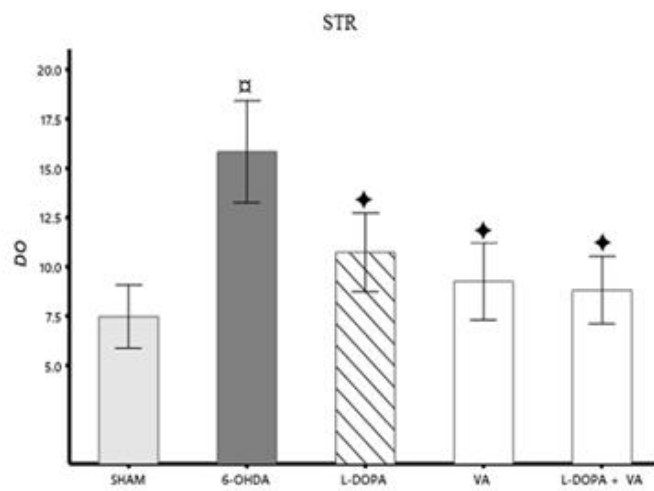
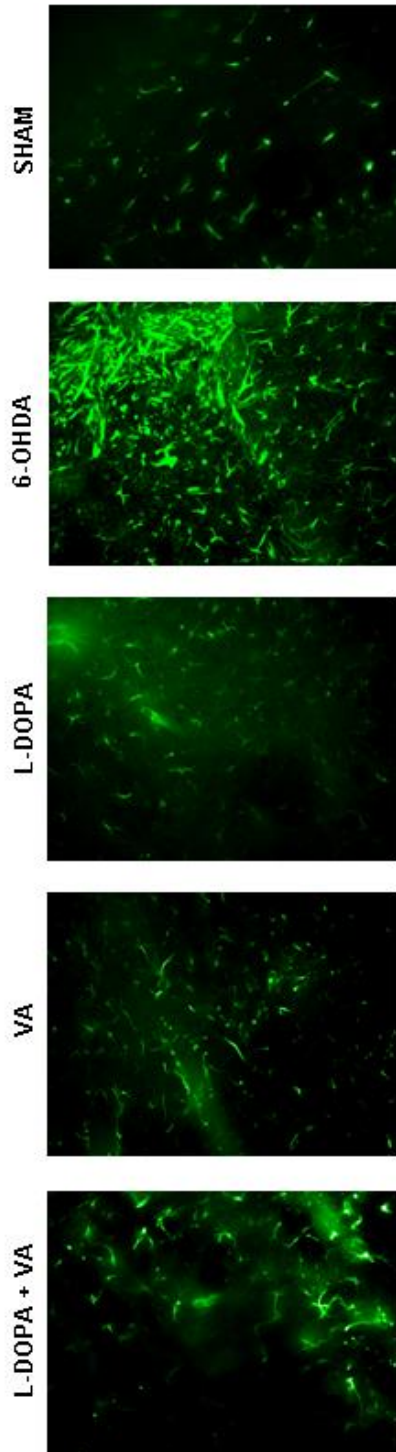


Figura 19. Densidad óptica de astrocytos en cuerpo estriado. El grupo 6-OHDA presentó una alta actividad astrogliosa en comparación con el grupo SHAM, sin embargo, en los grupos que tras la inyección de 6-OHDA tuvieron alguno de los tratamientos, se observó que la astrogliosis disminuye. □ $p < 0.05$ vs SHAM; ◆ $p < 0.05$ vs 6-OHDA por ANOVA + Tukey.

Sustancia negra

La administración de 6-OHDA en el STR genera el daño retrógrado en la SN, denominado de esta manera debido a que el daño celular ocurre inicialmente en las proyecciones neuronales y concluye en el soma (Lee y cols., 1996), este daño induce la activación astrogial en la SN (Pinho y cols., 2003).

El análisis estadístico muestra que la OD de astrocitos en la SN ipsilateral incrementó con la lesión de 6-OHDA, sin embargo, los animales que fueron tratados con L-DOPA, VA o L-DOPA+VA mostraron una menor activación, siendo estos dos últimos significativamente diferentes en comparación con el grupo 6-OHDA y L-DOPA (Figura 20).

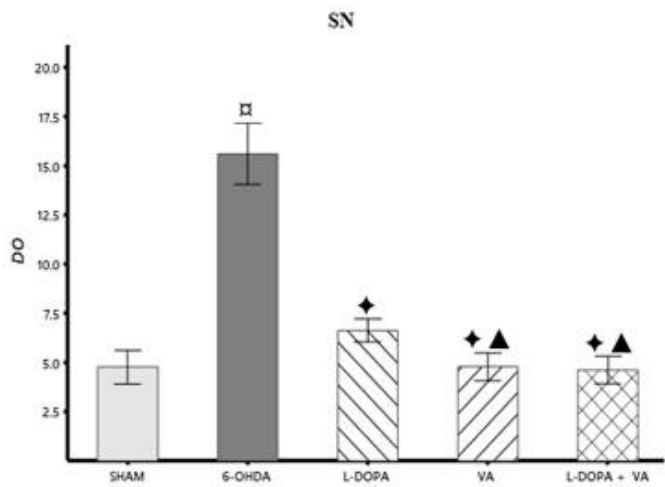
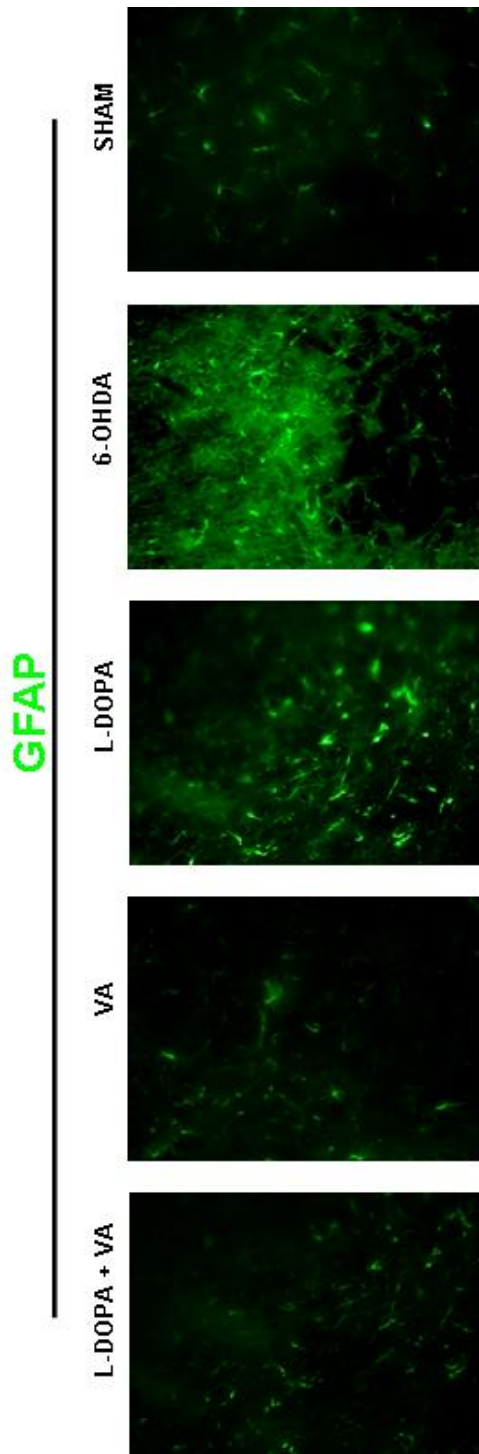


Figura 20. Densidad óptica de atrociitos en la sustancia negra. La degeneración retrógrada de las neuronas dopaminérgicas produjo la activación astrogliol en la sustancia negra en el grupo 6-OHDA, sin embargo, el tratamiento con L-DOPA redujo la astrogliosis y en mayor medida el tratamiento con VA, solo o en combinación. $\square p < 0.05$ vs SHAM; $\blacklozenge p < 0.05$ vs 6-OHDA; $\blacktriangle p < 0.05$ vs L-DOPA por ANOVA + Tukey.

Hipocampo

Para dimensionar la extensión del daño por 6-OHDA, se incluyó el análisis de OD en regiones fuera de los GB, que representan campos terminales de la circuitería básica, y que también participan en los mecanismos de memoria y aprendizaje, como son el hipocampo y la PFC. Los resultados muestran que la lesión estriatal con 6-OHDA induce astrogliosis que se extiende a las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, caracterizada por la alta OD positiva para GFAP. En contraste, en los animales que tuvieron alguno de los tratamientos se presentó una menor activación astrogliosa, obteniendo valores muy similares al grupo SHAM (Figura 21 y 22).

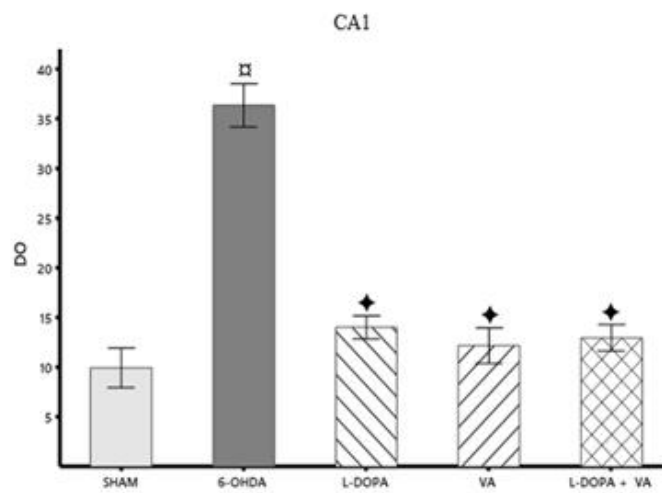
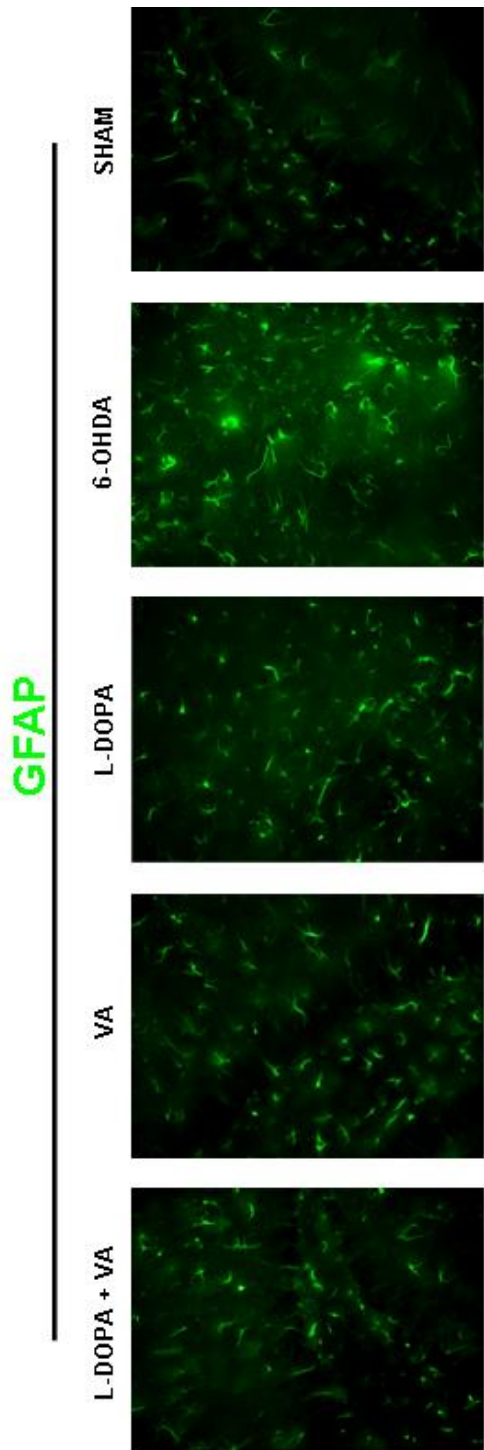


Figura 21. Densidad óptica de astrocitos en la región CA1 del hipocampo. Tras la inyección de 6-OHDA, se observó un incremento en la activación astrogliar en comparación con el grupo SHAM, este fenómeno no se presentó en los animales con tratamiento. \square $p < 0.05$ vs SHAM; \blacklozenge $p < 0.05$ vs 6-OHDA por ANOVA + Tukey.

GFAP

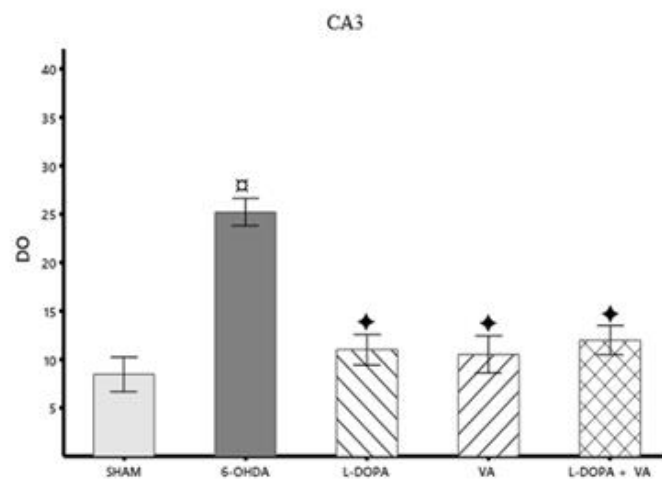
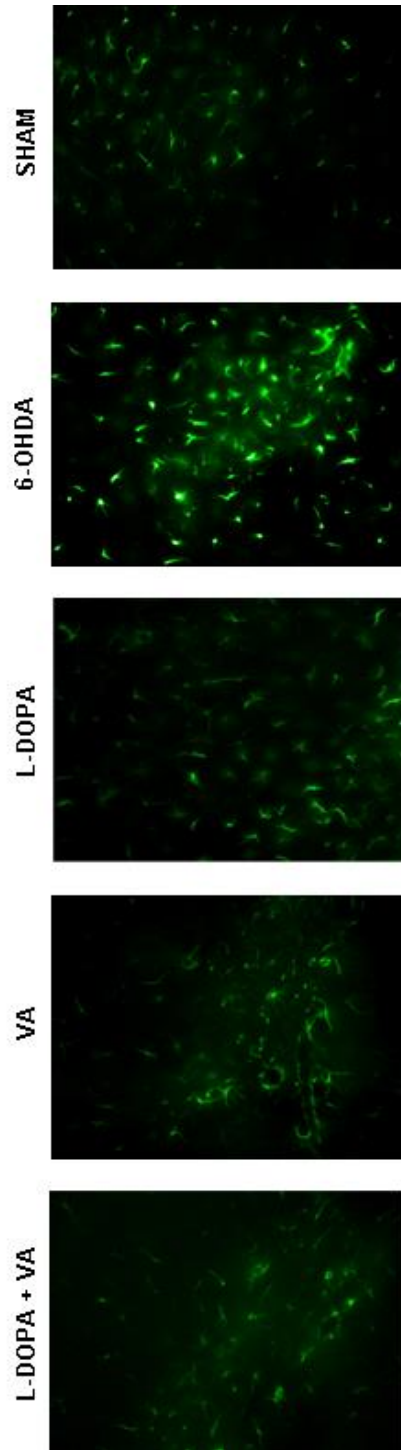


Figura 22. Densidad óptica de astrocitos en la región CA3 del hipocampo. La activación de astrocitos incrementó tras la lesión dopaminérgica en esta el área, mientras que en todos los grupos con tratamiento se observó una respuesta similar al grupo SHAM. $\#p < 0.05$ vs SHAM; $\blacklozenge p < 0.05$ vs 6-OHDA por ANOVA + Tukey.

Corteza prefrontal

La prueba de reconocimiento de objeto novedoso utilizada en este trabajo evalúa la función hipocampal, no obstante, la PFC juega un papel importante en la consolidación del aprendizaje, por lo que creímos oportuno analizar si la activación astrogliar inducida por el daño estriatal con 6-OHDA se podría extender a esta área. El análisis de los resultados muestra que no hay diferencia entre los grupos (Figura 23), lo cual muy probablemente se debe a que la PFC se encuentra muy lejana a la zona de lesión.

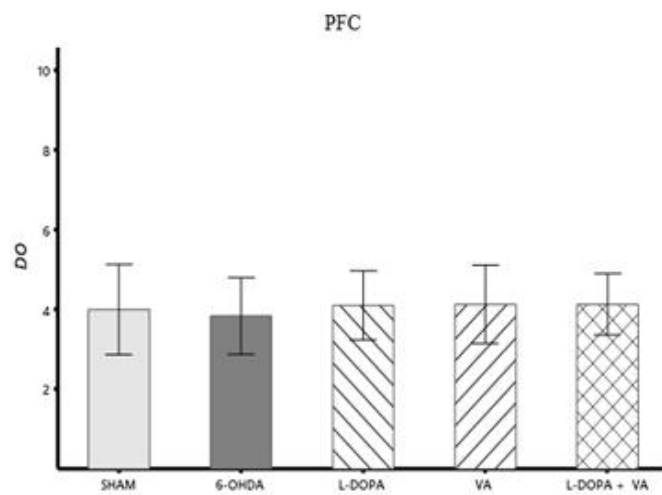
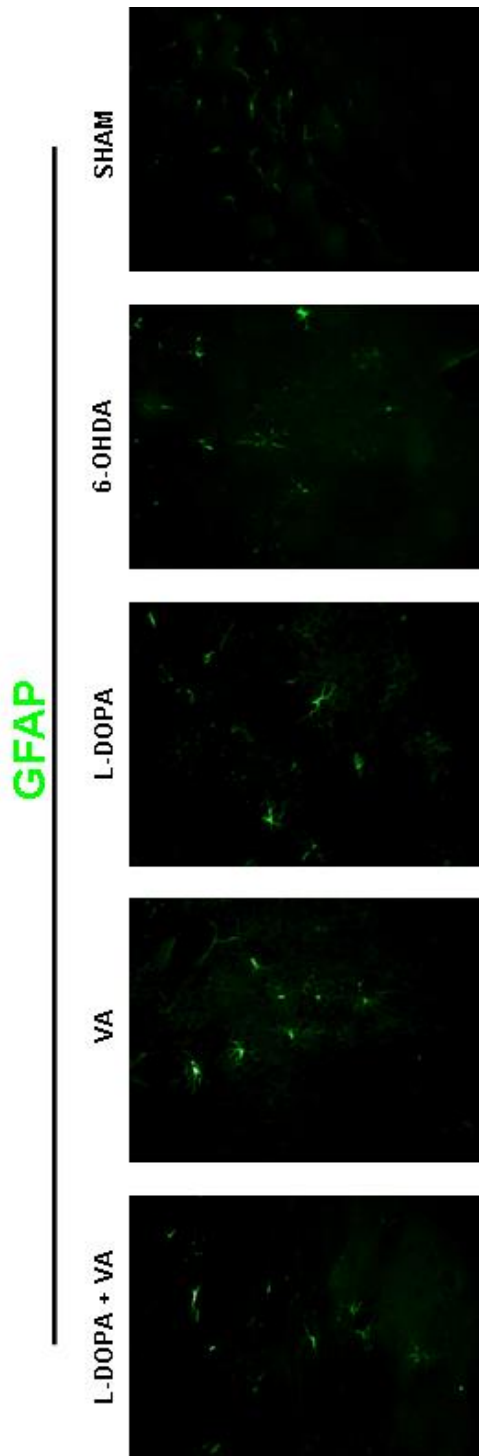


Figura 23. Densidad óptica de atrociitos en corteza prefrontal. La inyección estriatal de 6-OHDA no produjo la activación de astrociitos en la PFC en comparación con el grupo SHAM, a su vez ninguno de los tratamientos mostró cambios estadísticamente significativos.

DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la capacidad del VA natural liofilizado, para actuar solo y en combinación con L-DOPA sobre el daño DAérgico inducido por la inyección intra-estriatal de 6-OHDA. Los resultados muestran que el VA solo o en combinación administrado por vía IP, logra preservar la MCP evaluada por la prueba de reconocimiento de objeto novedoso, además de preservar la capacidad motora, que se demuestra por el uso indiscriminado de ambas extremidades anteriores en la prueba del cilindro y la reducción significativa de arrastres. Adicionalmente, la prueba del corredor muestra que el VA protege contra la pérdida de DA, que se observa en los animales lesionados con 6-OHDA, los cuales tienen la incapacidad de recuperar alimento del lado contralateral a la lesión. La inmunotinción para GFAP mostró que tras la lesión con 6-OHDA existe un incremento en la activación astrogial en STR, SN, CA1 y CA3 del hipocampo, que es atenuado con la administración de VA. Sorpresivamente, encontramos que, en general, el VA muestra la misma eficacia solo o en combinación con L-DOPA.

En el modelo de la EP inducido por MPTP, se encontró que la capacidad de la fosfolipasa A₂ para preservar la función motora y las neuronas DAérgicas es dependiente de la dosis (Kim y cols., 2019), además, en este mismo modelo se examinaron las vías de administración de fosfolipasa A₂, intramuscular, intravenosa, IP y SC, los resultados mostraron que la vía SC fue la mejor para preservar la capacidad motora y las propias neuronas DAérgicas, y para mantener niveles bajos de marcadores para microglia activa (Baek y cols., 2018), por lo que en este estudio se decidió utilizar la vía SC para la administración del VA. Aunque actualmente se desconoce el mecanismo que utiliza el VA para ingresar al SNC, se ha propuesto un mecanismo de transcitosis a través del endotelio (Oller-Salvia y cols., 2013 y 2016), y existe evidencia consistente de ello (Cai y cols., 2017; Gati y cols., 2012; Vincent y cols., 1975). Para este trabajo se tomó la decisión de utilizar el contenido completo del VA, para preservar la acción de los componentes que facilitan el ingreso al SNC, al incrementar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y actuar sobre componentes celulares específicos (Maurice y cols., 2015).

El veneno de abeja protege la memoria de corto plazo

La MCP es la capacidad de mantener una cantidad limitada de información en un estado activo, de fácil disponibilidad y por un corto lapso, aunque aún se discute cual es el límite de información para almacenar y el límite de duración de almacenamiento para ser definida como MCP (Cowan, 2009; Sausseureau y cols., 2014). El estudio para entender el proceso que se lleva a cabo en el establecimiento de la memoria ha demostrado que el bloqueo de los canales SK tiene efectos positivos (Tzounopoulos y Stackman, 2003; Wulff y cols., 2007). En general, este mecanismo incluye la participación del receptor para glutamato del tipo NMDA, cuya activación permite la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula, que entre otras cosas, conlleva a la activación de canales SK, que a su vez participan en el control de la frecuencia de disparo neuronal a través de la salida de K^+ durante la fase de hiperpolarización del potencial de acción (Faber y Sah, 2007; Pedarzani y Stocker, 2008). Cuando se bloquean estos canales se favorecen los procesos de potenciación y depresión de largo plazo (PLP y DLP respectivamente) que son procesos celulares que permiten el aprendizaje y la memoria, al mantener activo el potencial de acción (Lynch, 2004; Sweatt, 2010; Tzounopoulos y Stackman, 2003). Estos canales SK se expresan en altos niveles en la neocorteza y las áreas CA1 y CA3 del hipocampo, así como en el área reticular del tálamo, núcleo supraóptico y núcleo olivar inferior (Stocker y Pedarzani, 2000), y se ha demostrado que la apamina derivada del VA logra el bloqueo de los tres subtipos de canales SK presentes en el tejido cerebral (Grunnet y cols., 2001; Wulff y cols., 2007). Por consiguiente, se han realizado diversos estudios para evaluar la capacidad que tiene la apamina en la memoria y el aprendizaje, y lo que se ha encontrado es que mejora la memoria espacial evaluada en el laberinto acuático de Morris en animales con daño hipocampal (Ikonen y cols., 1998; Ikonen y Riekkinen, 1999); previene la amnesia en animales que tuvieron la administración de minoxidil, pinacidil, cromakalim o que se les aplicó un choque electroconvulsivo (Ghelardini y cols., 1998; Inan y cols., 2000); en animales sanos se encontró que mejora la codificación de la memoria espacial y no espacial dependiente de hipocampo en la prueba del laberinto acuático de Morris, y en una prueba de reconocimiento de objeto novedoso

requirieron menor tiempo para codificar el recuerdo del objeto (Stackman y cols., 2002). Resultados semejantes se observaron también en animales con daño por 6-OHDA (Chen y cols., 2014). Lo que se propone es que el efecto de apamina se debe al bloqueo de los canales SK y se lleva a cabo especialmente en la región CA1 del hipocampo en las primeras fases de la memoria (Stackman y cols., 2002). En contraste, en la EP el deterioro cognitivo es evidente, y nuestros resultados son prometedores, ya que se logró preservar la MCP en un modelo animal que mimetiza algunas de las características más importantes de la enfermedad, y este efecto benéfico es muy probable que se obtenga a través del bloqueo directo de los canales SK del hipocampo por la apamina presente en el VA.

Sin embargo, debe considerarse que la memoria y el aprendizaje son fenómenos complejos, que no pueden ser explicados mediante la sola activación de un componente celular. Tomando esto en consideración, es seguro que el VA active otros mecanismos asociados a estos procesos. En este sentido, Gu y cols. (2015) reportaron que el VA inhibe la pérdida de memoria inducida con lipopolisacárido en ratones, y esto fue asociado con la inhibición de la vía NF-kappaB (factor nuclear que regula la transcripción de varios genes inflamatorios, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, iNOS, entre otros). Otra idea viene de los resultados obtenidos de animales con demencia vascular que fueron tratados con VA, que mostraron un mejor desempeño que el grupo sin tratamiento, en el laberinto en Y, junto con menor pérdida neuronal en el área CA1 del hipocampo y mayor expresión de BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) (Cai y cols., 2016). La prueba de reconocimiento de objetos que se utilizó en este trabajo aporta información novedosa respecto a la capacidad de MCP, que en principio se considera una función hipocampal (Cohen y Stackman Jr., 2015; Lueptow, 2017), que aunado a las observaciones que han sido obtenidas de otras investigaciones, sugieren que el daño inducido con 6-OHDA alcanza otras regiones fuera del circuito nigro-estriado de los ganglios basales, y que el efecto benéfico del VA implica su interacción con elementos fuera de este circuito.

El veneno de abeja preserva la capacidad motora

Debido a que la función motora es la pérdida más evidente en la etapa sintomática de la EP, se tiene amplia información en la literatura respecto de sus causas, mecanismos y formas de tratarla. La prueba del cilindro es una de las más utilizadas en el modelo unilateral de 6-OHDA en roedores para evaluar la capacidad motora, ya que los animales que son lesionados unilateralmente desarrollan acinesia (Glajch y cols., 2012), que es la incapacidad de iniciar un movimiento (Rajput y Rajput, 2007). El proceso fisiopatológico que conlleva a este desorden motor aun no es claro, pero se propone que se presenta por la falta de estimulación de los receptores D1 y D2 causada por la pérdida de DA en el STR después de la pérdida de neuronas DAérgicas nigrales (Calhoon y O'Donnell, 2010; Lindner y cols., 1999), y/o por la pérdida de la función del DAT (Kaasinen y cols., 2014). Nuestros resultados concuerdan con otros estudios, en los que la administración de VA revierte la catalepsia inducida por haloperidol (Maurice y cols., 2015), mejora el funcionamiento de los circuitos de ganglios cortico-basales (Maurice y cols., 2015), protege las neuronas DAérgicas del STR y de la SN de la toxicidad por MPTP (Alvarez-Fischer y cols., 2013; Chung y cols., 2012; Doo y cols., 2009; Kim y cols., 2011; Kim y cols., 2016; Yoon y cols., 2013), incrementa los niveles de DA en el STR después del daño inducido por MPTP (Alvarez-Fischer y cols., 2013), o por 6-OHDA (Lomelí, 2019) y mejora la capacidad motora de animales tratados con rotenona (Khalil y cols., 2015); además, en un trabajo previo en nuestro laboratorio, se observó que animales con 6-OHDA tratados con VA obtienen mejores resultados en la evaluación de la actividad motora fina y gruesa en comparación con animales sin este tratamiento, lo que podría deberse a un desbalance en la expresión de los receptores de DA en el STR (Lomelí, 2019) junto con el incremento de la liberación adrenérgica/noradrenérgica inducida por los canales SK (Alvarez-Fischer y cols., 2013). Por otra parte, también se ha evaluado la actividad individual de algunos componentes del VA como la apamina, que aumenta la excitabilidad de las neuronas DAérgicas (Chen y cols., 2014), favoreciendo su resistencia al daño (Liss y cols., 2005; Michel y cols., 2007); también se ha encontrado que la apamina protege las neuronas DAérgicas de la degeneración e incrementa los niveles de DA

en el STR después del insulto con MPTP (Alvarez-Fischer y cols., 2013). Referente a la fosfolipasa A2, se ha demostrado que logra mejorar la capacidad motora en animales transgénicos mutantes para α -sinucleína (Ye y cols., 2016) y en animales tratados con MPTP (Kim y cols., 2019). Nuestros resultados, junto con los que se han comentado, refuerzan la evidencia de que el VA contrarresta de manera importante la incapacidad motora de las extremidades, aunque no se había reportado en conjunto con el tratamiento con L-DOPA, droga que presenta el problema de perder la efectividad con el tiempo. Nuestros resultados muestran que, en los ratones, el VA es tan eficiente como la L-DOPA para restablecer la capacidad de apoyar las extremidades, así como para disminuir el arrastre, y es muy probable que no presente efectos colaterales indeseables, como se ha observado con L-DOPA (Jankovic y Tarakad, 2017).

El veneno de abeja mantiene el contenido de dopamina estriatal

Para evaluar la asimetría del contenido de DA en el modelo unilateral con 6-OHDA generalmente se utiliza anfetaminas (D-anfetamina) que estimulan la liberación y bloquean la recaptura de DA, también se utilizan agonistas de DA como apomorfina, que actúa en la membrana postsináptica, ambas drogas producen la conducta de giro, herramienta que se ha convertido en la prueba estándar para demostrar la recuperación funcional de las neuronas DAérgicas (Björklund y Dunnett, 2019). Sin embargo, esta prueba no es aplicable en ratones, ya que esta especie no presenta la rotación (Bagga y cols., 2015; Dowd y cols., 2005). Así mismo, se debe considerar que la administración de psicoestimulantes causa cambios en la función sináptica (Glajch y cols., 2012) y no muestra la respuesta fisiológica real de los animales. La prueba del corredor, aunque inicialmente fue diseñada para evaluar ratas, se ha logrado adaptar para la evaluación de ratones (Grealish y cols., 2010). Esta prueba evalúa el comportamiento lateralizado, que se ve afectado tras la administración unilateral de 6-OHDA, por el agotamiento del contenido de DA en un solo hemisferio cerebral, que a su vez produce el incremento de receptores de DA en el hemisferio contralateral, por lo tanto, los animales giran el cuerpo mayormente al lado ipsilateral a la lesión, que es equivalente a la rotación en la prueba de giro inducido, por lo que

pueden tomar el alimento de ese lado. Cabe mencionar que esta prueba logra diferenciar los resultados en relación al daño nigro-estriado ([Grealish y cols., 2010](#)).

Nuestros resultados muestran que el VA preserva el contenido de DA estriatal, resultado que concuerda con observaciones previas obtenidas en nuestro laboratorio, donde una sola dosis de VA evitó el giro inducido por apomorfina en ratas con inyección de 6-OHDA y mejoró los niveles de DA cuantificada por medio de HPLC ([Lomelí, 2019](#)). En conjunto, estos resultados nos permiten inferir que las neuronas DAérgicas efectivamente son protegidas en los animales con VA, y no degeneran por completo después de la inyección de 6-OHDA. Este efecto neuroprotector del VA sobre las neuronas DAérgicas, se ha atribuido principalmente al contenido de apamina, de acuerdo con hallazgos en ratones parkinsonianos con MPTP ([Alvarez-Fischer y cols., 2013](#)); sin embargo, su administración independiente no es suficiente para lograr la protección que se observa con VA completo; en este sentido, es posible que la acción conjunta de varios componentes del VA sea la causa de este efecto, pues se sabe por ejemplo, que la melitina tiene la capacidad de activar la función del sistema ubiquitina-proteosoma, que se ve afectada en las neuronas DAérgicas durante el desarrollo de la EP ([Greenamyre y Hastings, 2004](#)). Otro componente relevante es el péptido MCD (péptido desgranulador de mastocitos), debido a su potente función antiinflamatoria ([Ziai y cols., 1990](#)), que podría estar protegiendo a las neuronas DAérgicas de la muerte por el exceso de mediadores inflamatorios que se observa en la EP. De manera notable, nuevamente observamos resultados equivalentes con VA o con L-DOPA, lo que nos sugiere que solo el VA podría ser suficiente para restablecer el contenido de DA estriatal, y por consiguiente la función motora en los animales.

El veneno de abeja disminuye la activación astrogliol

Analizamos la activación astrogliol inducida por la inyección unilateral de 6-OHDA, no solo en el STR, ya que anteriormente se ha reportado que el daño no se restringe a la región blanco, sino que se puede extender a distintas áreas como es la SN y el GP ([Lee y cols., 1996](#); [Kirik y cols., 1998](#)). Nuestros resultados muestran que tras la lesión estriatal hay un incremento en la activación de atrocitos en el STR, SN, CA1

y CA3 del hipocampo, que es disminuida con la administración de VA solo o en combinación con L-DOPA. Estos resultados son acordes con estudios que demuestran que el VA tiene la capacidad de revertir la producción de TNF- α , que es promovida por la administración de MPTP (Alvarez-Fischer y cols., 2013; Chung y cols., 2012) y por rotenona (Khalil y cols., 2015), así como la de reducir la producción de IL-1 β en animales tratados con rotenona (Khalil y cols., 2015) y en inyectados con MPTP (Chung y cols., 2012); reduce la expresión de genes proapoptóticos, como caspasa-3, Bax y Bcl-2 en el modelo de rotenona (Khalil y cols., 2015); el VA también reduce la presencia de marcadores de la activación de microglía y macrófagos, y la carbonilación de proteínas en la SN en el modelo de MPTP, además de reducir la infiltración de células CD4 T (Chung y cols., 2012; Kim y cols., 2011); en conjunto, estos resultados evidencian la capacidad antiinflamatoria y antioxidante que se le reconoce al VA. Además, la administración de fosfolipasa A₂ en un modelo transgénico mutante para α -sinucleína, mostró la capacidad de reducir la activación microglial e influyó en su polarización para el fenotipo M2, en el que se liberan citocinas antiinflamatorias y neurotrofinas (Ye y cols., 2016). En conjunto, la información muestra que tanto en la EP como en los modelos animales ocurre un proceso inflamatorio mediado por células gliales, que conlleva a la muerte celular por la activación de rutas apoptóticas. La capacidad neuroprotectora que muestra el VA en gran medida se debe a la regulación negativa de la activación glial, evitando así la presencia excesiva de mediadores inflamatorios y oxidantes. Nuestros resultados indican que L-DOPA y VA son igualmente efectivos para contrarrestar la astrogliosis en las regiones estudiadas, y la combinación de ambos no mejora esta capacidad, por lo que en teoría podrían utilizarse indistintamente para lograr este efecto antiinflamatorio y antioxidante. El efecto benéfico que se observó al utilizar L-DOPA en este estudio, probablemente se debe al tiempo de duración, ya que recientemente se reportó en ratones que este fármaco a los 90 días de tratamiento incrementó la DA oxidada, interrumpió la actividad de la GCasa lisosómica y disminuyó de la supervivencia neuronal (Burbulla y cols., 2017).

Los resultados que se presentan en este trabajo, junto con los de otras investigaciones, son alentadores, sin embargo, aún no sabemos por completo cuales son los mecanismos que participan en el efecto neuroprotector del VA. A pesar de ello, existen algunos trabajos clínicos que tratan de evaluar el VA en pacientes con EP, como el estudio realizado por Doo y cols. (2015), que a pesar de sus limitaciones metodológicas, aporta gran información, ya que pacientes con EP que utilizaban L-DOPA como tratamiento recibieron dosis de 0.1 ml de VA diluido al 0.005% en solución salina en los puntos de acupuntura bilaterales GB20, LI4, GB34, ST36 y LR3 dos veces por semana durante 12 semanas. Estos pacientes mostraron mejores resultados en pruebas de bradicinesia, temblor, inestabilidad postural y trastorno de la marcha, así como mejores puntuaciones en el cuestionario de calidad de vida (PDQL), y en la evaluación de las actividades de la vida diaria (parte II) y síntomas motores (parte III) según la escala unificada para la evaluación de la EP (Fahn y Elton, 1987), en comparación con pacientes que tuvieron tratamiento con acupuntura sin VA. Los resultados fueron a tal grado que se ensayó la reducción en la dosis de L-DOPA de uno de los pacientes. Similar al anterior estudio, Ostrovsky y cols. (2019) trabajaron con pacientes con EP que eran tratados farmacológicamente, asignados en tres grupos de doble ciego, el grupo I solo recibió su tratamiento convencional, a los integrantes del grupo II se les administró 0.1 ml de VA diluido en los puntos de acupuntura bilaterales GB20, LI4, GB34, ST36 y LR3, mientras que el grupo III recibió dosis de agua salina (placebo) en los mismos puntos de acupuntura. Los resultados mostraron que los grupos II y III tuvieron mejoras en la escala unificada para la evaluación de la EP parte II y III a las 12 semanas en comparación con el grupo I, y no hubo diferencias significativas entre los grupos I y II lo que demuestra un efecto placebo inicial, después de 8 semanas sin tratamiento los resultados demostraron que el efecto del VA aún persistía, mientras que el grupo III redujo sus puntajes, demostrándose que el VA efectivamente tuvo un efecto benéfico, el cual inclusive puede durar días o semanas posteriores a su administración. En este sentido, la investigación actual en la EP está encaminada a identificar síntomas tempranos, que preceden mucho tiempo a los síntomas motores (Berendse y Ponsen, 2009; Goldman y Postuma, 2014; Miller

y O'Callaghan, 2014; Siderowf y Stern, 2008; Stephenson y cols., 2009), por lo que el uso del VA en estas etapas temprana puede ser adecuado para las personas que padecen la EP.

CONCLUSIÓN

En conclusión, los resultados sugieren que el VA, aplicado por vía SC en dosis repetidas, tiene capacidad neuroprotectora en el modelo de la EP inducido por 6-OHDA en el ratón CD-1, a través de una acción antiinflamatoria mediante la regulación negativa de la activación astrogliar, que contribuye a preservar capacidades motoras y cognitivas. Esta capacidad es tan buena como la que se obtiene con la administración de L-DOPA, lo que sugiere que el VA podría incluso ser utilizado como sustituto de la droga.

PERSPECTIVAS

- Determinar el mecanismo que utiliza el VA para ingresar al SNC;
- Establecer la mejor dosis de VA y el tiempo entre cada administración;
- Diseñar y evaluar vehículos para la administración de VA por medio de la ingesta;
- Evaluar la capacidad del VA para mejorar más síntomas relevantes en la EP, como motivación, demencia, depresión, entre otros;
- Evaluar el efecto del VA en combinación con agonistas de DA en el modelo de degeneración DAérgica con 6-OHDA, mediante pruebas conductuales y celulares semejantes a las presentadas en este trabajo, para evidenciar si existe un mejor efecto que con el precursor de DA;
- Analizar factores neurotróficos que se expresan tras la administración del VA;
- Analizar la expresión de moléculas proinflamatorias y antiinflamatorias después de la administración de VA;
- Analizar a largo plazo el tratamiento con VA para descartar respuestas adversas después del uso crónico;
- Analizar el uso del VA en modelos iniciales de la EP.

REFERENCIAS

- Aarsland, D., Creese, B., Politis, M., Chaudhuri, K. R., Dominic, H. F., Weintraub, D., Ballard, C. (2017). Cognitive decline in Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology*, 3: 217-23.
- Ali, Syed F., David, Stanley N., Newport, Glenn D., Cadet, Jean L., Slikker Jr., W. (1994). MPTP-induced oxidative stress and neurotoxicity are age-dependent: Evidence from measures of reactive oxygen species and striatal dopamine levels. *Synapse*, 18: 27-34.
- Alvarez-Fischer, D., Noelker, C., Vulinović, F., Grünewald, A., Chevarin, C., Klein, C., Oertel, W. H., Hirsch, E. C., Michel, P. P. y Hartmann, A. (2013). Bee Venom and Its Component Apamin as Neuroprotective Agents in a Parkinson Disease Mouse Model. *PLoS ONE*, 8: 1-8.
- Antonini, A., y Leenders, Klauss L. (1993). Dopamine D2 receptors in normal human brain: effect of age measured by positron emission tomography (PET) and [11C]-Raclopride. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 695: 81-85.
- Anwar, A., Saleem, S., Akhtar, A., Ashraf, S., y Ahmed, M. F. (2019). Juvenile Parkinson Disease. *Cureus*, 11: 1-3.
- Azam, M. N. K., Ahmed, M. N., Biswas, S., Ara, N., Rahman, M., Hirashima, A. y Hasan, N. (2018). A Review on Bioactivities of Honey Bee Venom. *Annual Research & Review in Biology*, 30: 1-13.
- Baek, H., Jang, H. Il, Jeon, H. N. y Bae, H. (2018). Comparison of administration routes on the protective effects of Bee Venom Phospholipase A₂ in a mouse model of Parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10: 1-8.
- Bagga, V., Dunnett, S. B. y Fricker, R. A. (2015). The 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease - Terminal striatal lesions provide a superior measure of neuronal loss and replacement than median forebrain bundle lesions. *Behavioural Brain Research*, 288: 107-117.

- Bahena-Trujillo, R., Flores, G., y Arias-Montaño, J. A. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Revista Biomédica*, 11: 39-60.
- Bartels, A. L., Willemsen, A. T. M., Doorduyn, J., de Vries, E. F. J., Dierckx, R. A. y Leenders, K. L. (2010). [11C]-PK11195 PET: Quantification of neuroinflammation and a monitor of anti-inflammatory treatment in Parkinson's disease? *Parkinsonism and Related Disorders*, 16: 57-59.
- Berendse, H. W. y Ponsen, M. M. (2009). Diagnosing premotor Parkinson's disease using a two-step approach combining olfactory testing and DAT SPECT imaging. *Parkinsonism and Related Disorders*, 15: 26-30.
- Birkmayer, W. y Hornykiewicz, O. (1991). The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia. *Wien Klin Wochenschr*, 10: 787-788.
- Björklund, A. y Dunnett, Stephen B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in Neurosciences*, 30: 194-202.
- Björklund, A., y Dunnett, S. B. (2019). The amphetamine induced rotation test: A re-assessment of its use as a tool to monitor motor impairment and functional recovery in rodent models of Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease*, 9: 17-29.
- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M. F., Benabid, A. L., Sadoul, R. y Verna, J. M. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: Contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 65: 135-172.
- Burbulla, L. F., Song, P., Mazzulli, J. R., Zampese, E., Wong, Y. C., Jeon, S., Santos, D. P., Blanz, J., Obermaier, C. D., Strojny, C., Savas, J. N., Kiskinis, E., Zhuang, X., Krüger, R., Surmeier, D. J. y Krainc, D. (2017). Dopamine oxidation mediates mitochondrial and lysosomal dysfunction in Parkinson's disease. *Science*, 357: 1255-1261.

- Cai, M., Lee, J. H. y Yang, E. J. (2017) Bee Venom Ameliorates Cognitive Dysfunction Caused by Neuroinflammation in an Animal Model of Vascular Dementia. *Molecular Neurobiology*, 54: 5952-5960.
- Calhoun, G. G. y O'Donnell, P. (2010). Many roads to motor deficits: Loss of dopamine signaling in direct or indirect basal ganglia pathway leads to akinesia through distinct physiological mechanisms. *Frontiers in Neuroscience*, 4: 1-2.
- Carpentier, Pamela A., Duncan, D'Anne S. y Miller, Stephen. D. (2008). Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22: 140-147.
- Cenci, M. A. y Lundblad, M. (2005). Utility of 6-hydroxydopamine lesioned rats in the preclinical screening of novel treatments for parkinson disease. *Animal Models of Movement Disorders*, Academic Press, 193-208.
- Chen, J., Guan S. M., Sun, W., Fu, H. (2016). Melittin, the Major Pain-Producing Substance of Bee Venom. *Neuroscience Bulletin*, 32: 265-272.
- Chen, L., Deltheil, T., Turle-Lorenzo, N., Liberge, M., Rosier, C., Watabe, I., Sreng, L., Amalric, M. y Mourre, C. (2014). . *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 17: 1295-1306.
- Chen, S. Y., Zhou P. y Qin Y. (2018). Treatment of Rheumatoid Arthritis by Bee-venom Acupuncture. *Zhen Ci Yan*, 43: 251-254.
- Chiba K, Trevor A, y Castagnoli Jr., N. (1984). Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 120: 574-578.
- Chinta, Shankar J., y Andersen, Julie K. (2005). Dopaminergic neurons. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37: 942-946.
- Chung, E. S., Kim, H., Lee, G., Park, S., Kim, H. y Bae, H. (2012). Neuro-protective effects of bee venom by suppression of neuroinflammatory responses in a mouse model

- of Parkinson's disease: Role of regulatory T cells. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26: 1322-1330.
- Clancy, B., Finlay, Barbara L., Darlington, Richard B., y Anand, K. J. S. (2007). Extrapolating brain development from experimental species to humans. *NeuroToxicology*, 28: 931-937.
- Cohen, S. J. y Stackman, R. W. Jr. (2015) Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behavioural Brain Research*, 285: 105-117.
- Cosand, W. L., y Merrifield, R. B. (1977). Concept of internal structural controls for evaluation of inactive synthetic peptide analogs: synthesis of [Orn^{13,14}] apamin and its guanidination to an apamin derivative with full neurotoxic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 2771-2775.
- Cowan, N. (2009). What are the differences between long-term, short-term, and working memory?. NIH Public Access, *Prog Brain Res* 169: 323-338.
- Creed, Rose B., y Goldberg, Matthew S. (2018). New Developments in Genetic Rat Models of Parkinson's Disease. *Journal of Movement Disorders*, 33: 717-729.
- Dahlstrom, A. and Fuxe, K. (1964). Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum*, 222: 1-55.
- Dahlstrom, A. y Fuxe, K. (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, 20: 398-399.
- Davis, G. C., Williams, A. C., Markey, S. P., Ebert, M. H., Caine, E. D., Reichert, C. M. y Kopin, I. J. (1979). Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Research*, 1: 249-254.
- de Lau, L. M. L., Breteler, M. M. B. (2013). Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 5: 54-58.

- Dias, V., Junn, E., y Mouradian, M. Maral. (2013). The role of oxidative stress in parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease*, 3: 461-491.
- Dickson, D. W., Braak, H., Duda, J. E., Duyckaerts, C., Gasser, T., Halliday, G. M., Hardy, J., Leverenz, J. B., del Tredici, K., Wszolek, Z. K. y Litvan, I. (2009). Neuropathological assessment of Parkinson's disease: Refining the diagnostic criteria. *The Lancet Neurology*, 8: 1150-1157.
- DiSabato, Damon J., Quan, N. y Godbout, Jonathan P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of Neurochemistry*, 139: 136-153.
- Doo, A.-R., Kim, S.-T., Kim, S.-N., Moon, W., Yin, C. S., Chae, Y., Park, H.-K., Lee, H. y Park, H.-J. (2009). Neuroprotective effects of bee venom pharmaceutical acupuncture in acute 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced mouse model of Parkinson's disease. *Neurological Research*, 32: 588-591.
- Doo, K.-H., Lee, J.-H., Cho, S.-Y., Jung, W.-S., Moon, S.-K., Park, J.-M., Ko, C.-N., Kim, H., Park, H.-J. y Park, S.-U. (2015). A prospective open-label study of combined treatment for idiopathic Parkinson's disease using acupuncture and bee venom acupuncture as an adjunctive treatment. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 0: 1-6.
- Dowd, E., Monville, C., Torres, E. M. y Dunnett, S. B. (2005). The Corridor Task: A simple test of lateralised response selection sensitive to unilateral dopamine deafferentation and graft-derived dopamine replacement in the striatum. *Brain Research Bulletin*, 68: 24-30.
- Faber, E. L. y Sah, P. (2007). Functions of SK channels in central neurons. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34: 1077-1083.
- Fahn, S. y Elton, R. L. (1987). Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS). *Recent developments in Parkinson's disease, Vol 2. Macmillan Health Care information: Florham Park*, 153-164.

- Falck, Bengt (1964). Cellular localization of monoamines. *Progress in Brain Research*, 8: 28-44.
- Figge, David A., Eskow Jaunarajs, Karen L. y Standaert, David G. (2016). Dynamic DNA methylation regulates Levodopa-induced dyskinesia. *Journal of Neuroscience*, 36: 6514-6524.
- Gati, C. D., Mortari, M. R. y Schwartz, E. F. (2012) Towards therapeutic applications of arthropod venom k(+)-channel blockers in CNS neurologic diseases involving memory acquisition and storage. *Journal Toxicology*, 756358: 1-21.
- Gerhard, A., Pavese, N., Hotton, G., Turkheimer, F., Es, M., Hammers, A., Eggert, K., Oertel, W., Banati, Richard B. y Brooks, David J. (2006). In vivo imaging of microglial activation with [¹¹C] (*R*)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 21: 404-412.
- Ghelardini, C., Galeotti, N. y Bartolini, A. (1998). Influence of potassium channel modulators on cognitive processes in mice. *British Journal of Pharmacology*, 123: 1079-1084.
- Glajch, Kelly E., Fleming, Sheila M., Surmeier, D. James y Osten, P. (2012). Sensorimotor assessment of the unilateral 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*, 230: 309-316.
- Glinka, Y., Tipton, K. F. y Youdim, M. B. H. (1996). Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-Hydroxydopamine. *Journal of Neurochemistry*, 66: 2004-2010.
- Glinka, Yelena Y. y Youdim, Mousa B. H. (1995). Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *European Journal of Pharmacology*, 292: 329-332.
- Glinka, Yelena, Tipton, K. F., y Youdim, M. B. H. (1998). Mechanism of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6- hydroxydopamine and its prevention by desferrioxamine. *European Journal of Pharmacology*, 351: 121-129.

- Goldman, J. G. y Postuma, R. (2014). Premotor and nonmotor features of Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurology*, 27: 434-441.
- González-Hernández, T., Afonso-Oramas D. y Cruz-Muros, I. (2009). Phenotype, compartmental organization and differential vulnerability of nigral dopaminergic neurons. *Birth, Life and Death of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra*, 21-37.
- Grealish, S., Mattsson, B., Draxler, P., y Björklund, A. (2010). Characterisation of behavioural and neurodegenerative changes induced by intranigral 6-hydroxydopamine lesions in a mouse model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*, 31: 2266-2278.
- Greenamyre, J. Timothy y Hastings, Teresa G. (2004). Parkinson's-Divergent causes, convergent mechanisms. *Science*, 304: 1120-1122.
- Greenamyre, J.T. y Hastings, T. G. (2004). *Biomedicine*. Parkinson's-divergent causes, convergent mechanisms. *Science*, 304: 1120-1122.
- Grunnet, M., Jensen, B. S., Olesen, S.-P. y Klaerke, D. A. (2001). Apamin interacts with all subtypes of cloned small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology*, 441: 544-550.
- Gu, S. M., Park, M. H., Hwan, C. J., Song, H. S., Lee, U. S., Han, S. B., Oh, K. W., Ham, Y. W., Song, M. J., Son, D. J. y Hong J. T. (2015). Bee venom ameliorates lipopolysaccharide-induced memory loss by preventing NF-kappaB pathway. *Journal Neuroinflammation*, 12: 1-15.
- Hanrott, K., Gudmunsen, L., O'Neill, M. J. y Wonnacott, S. (2006). 6-Hydroxydopamine-induced apoptosis is mediated via extracellular auto-oxidation and caspase 3-dependent activation of protein kinase C δ . *The Journal of Biological Chemistry*, 281: 5373-5382.

- Heikiila, R. y Cohen, G. (1971). Inhibition of Biogenic Amine Uptake by Hydrogen Peroxide: A Mechanism for Toxic Effects of 6-Hydroxydopamine. *Science*, 172: 1257-1258.
- Hemby, S. E., Trojanowski, J. Q. y Ginsberg, S. D. (2003). Neuron-Specific Age-Related Decreases in Dopamine Receptor Subtype mRNAs. *Journal of Comparative Neurology* 456:176-183.
- Henning, J., Strauss, U., Wree, A., Gimsa, J., Rolfs, A. y Benecke, R. (2008). Differential astroglial activation in 6-hydroxydopamine models of Parkinson's disease. *Neuroscience Research*, 62: 246-253.
- Hernandez-Baltazar, D., Zavala-Flores, L. M. y Villanueva-Olivo, A. (2017). The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurología*, 32: 533-539.
- Ikonen, S. y Riekkinen Jr., P. (1999). Effects of apamin on memory processing of hippocampal-lesioned mice. *European Journal of Pharmacology*, 382: 151-156.
- Ikonen, S., Schmidt, B. y Riekkinen. Jr., P. (1998). Apamin improves spatial navigation in medial septal-lesioned mice. *European Journal of Pharmacology*, 347: 13-21.
- Inan, S. Y., Aksu, F. y Baysal, F. (2000). The effects of some K⁺ channel blockers on scopolamine- or electroconvulsive shock-induced amnesia in mice. *European Journal of Pharmacology*, 407: 159-164.
- Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis Parkinson. *Journal of Neurology Neurosurgery Psychiatry*, 79: 368-376.
- Jankovic, J. y Tarakad, A. (2017). Diagnosis and Management of Parkinson's Disease. *Seminars in Neurology*, 37: 118-126.
- Jenner, P., Schapira, A. H. V., y Marsden, C. D. (1992). New insights into the cause of parkinson's disease. *Neurology*, 42: 2241-2250.

- Kaasinen, V., Joutsa, J., Nojonen, T., & Päivärinta, M. (2014). Akinetic crisis in parkinson's disease is associated with a severe loss of striatal dopamine transporter function: A report of two cases. *Case Reports in Neurology*, 6: 275-280.
- Khalil, W. K. B., Assaf, N., Elshebiney, S. A. y Salem, N. A. (2015). Neuroprotective effects of bee venom acupuncture therapy against rotenone-induced oxidative stress and apoptosis. *Neurochemistry International*, 80: 79-86.
- Kielian, T. (2006). Toll-Like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis tammy. *Journal Of Neuroscience Research*, 83: 711-730.
- Kim, J.-I., Yang, E. J., Lee, M. S., Kim, Y.-S., Huh, Y., Cho, I.-H., Kang, S. y Koh, H.-K. (2011). Bee venom reduces neuroinflammation in the MPTP-induced model of Parkinson's disease. *International Journal of Neuroscience*, 121: 209-217.
- Kim, Jong-In, Yang, Eun J., Lee, Myeong S., Kim, Yong-Suk, Huh, Y., Cho, Ik-Hyun, Kang, S. y Koh, Hyung-Koh (2011). Bee venom reduces neuroinflammation in the MPTP-induced model of Parkinson's disease. *International Journal of Neuroscience*, 121: 209-217.
- Kim, K. H., Lee, S. Y., Shin, J., Hwang, J.-T., Jeon, H. N. y Bae, H. (2019). Dose-dependent neuroprotective effect of standardized bee venom Phospholipase A2 against MPTP-induced Parkinson's disease in mice. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11: 1-9.
- Kim, M. E., Lee, J. Y., Lee, K. M., Park, H. R., Lee, E., Lee, Y., Lee, J. S. y Lee, J. (2016). Neuroprotective effect of bee venom is mediated by reduced astrocyte activation in a subchronic MPTP-induced model of Parkinson's disease. *Archives of Pharmacal Research*, 39: 1160-1170.
- Kim, Raymond H., Smith, Patrice D., Aleyasin, H., Hayley, S., Mount, M. P., Pownall, S., Wakeham, A., You-ten, A. J., Kalia, S. K., Horne, P., Westaway, D., Lozano, A. M., Anisman, H., Park, D. S. y Mak, T. W. (2005). Hypersensitivity of DJ-1-deficient

- mice to and oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 5215-5220.
- Kirik, D., Rosenblad, C. y Björklund, A. (1998). Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Experimental Neurology*, 152: 259-277.
- Kuhar, M. J., Minneman E., K., Muly, C. (2006). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, seventh edition. Catecholamines, 211-225.
- Kuter, K., Olech, Ł., & Głowacka, U. (2018). Prolonged dysfunction of astrocytes and activation of microglia accelerate degeneration of dopaminergic neurons in the rat substantia nigra and block compensation of early motor dysfunction induced by 6-OHDA. *Molecular Neurobiology*, 55: 3049-3066.
- Lanciego, J. L. Luquin, N. y Obeso J. A. (2015). Functional neuroanatomy of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2: 1-19.
- Ledonne, A., y Mercuri, N. B. (2017). Current concepts on the physiopathological relevance of dopaminergic receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11: 1-9.
- Lee, C. S., Sauer, H. y Bjorklund, A. (1996). Dopaminergic Neuronal Degeneration and Motor Impairments Following Axon Terminal Lesion by Intrastriatal 6-hydroxydopamine In the Rat. *Neuroscience*, 72: 641-653.
- Leonoudakis, D., Rane, A., Angeli, S., Lithgow, Gordon J., Andersen, Julie K. y Chinta, Shankar J. (2017). Anti-Inflammatory and Neuroprotective Role of Natural Product Securinine in Activated Glial Cells: Implications for Parkinson's Disease. *Mediators of Inflammation*, 2017: 1-11.
- Lindner, M. D., Cain, C. K., Plone, M. A., Frydel, B. R., Blaney, T. J., Emerich, D. F., y Hoane, M. R. (1999). Incomplete nigrostriatal dopaminergic cell loss and partial

- reductions in striatal dopamine produce akinesia, rigidity, tremor and cognitive deficits in middle-aged rats. *Behavioural Brain Research*, 102: 1-16.
- Liss, B., Haeckel, O., Wildmann, J., Miki, T., Seino, S. y Roeper, J. (2005). K-ATP channels promote the differential degeneration of dopaminergic midbrain neurons. *Nature Neuroscience*, 8: 1742-1751.
- Lomeli, A. K. (2019). Evaluación del veneno de abeja como posible agente neuroprotector en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson (Tesis de pregrado). Universidad de Guadalajara, Las Agujas, Zapopan, Jalisco.
- Lueptow, L. M. (2017). Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, 126: 1-9.
- Lynch, M. A. (2004). Long-Term Potentiation and Memory. *Physiological Reviews*, 84: 87-136.
- Maiti, P., Manna, J., Dunbar y G. L., Maiti, P. (2017). Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments. *Translational Neurodegeneration*, 6: 1-35.
- Maurice, N., Deltheil, T., Melon, C., Degos, B., Mourre, C., Amalric, M. y Goff, L. K. Le. (2015). Bee venom alleviates motor deficits and modulates the transfer of cortical information through the basal ganglia in rat models of Parkinson's disease. *PLoS ONE*, 10: 1-18.
- McGeer, P. L., Itagaki, S., Boyes, B. E. y McGeer, E. G. (1988). Reactive microglia are positive for HLA-DR in the: Substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, 38, 1285-1291.
- Meredith, Gloria E., Dervan, Aadrian G. y Totterdell, S. (2005). Activated Microglia Persist in the Substantia Nigra of a Chronic MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *The Basal Ganglia VIII*, 341-347.

- Michel, P. P., Alvarez-Fischer, D., Guerreiro, S., Hild, A., Hartmann, A. y Hirsch, E. C. (2007). Role of activity-dependent mechanisms in the control of dopaminergic neuron survival. *Journal of Neurochemistry*, 101: 289-297.
- Miller, D. B. y O'Callaghan, J. P. (2014). Biomarkers of Parkinson's disease: Present and Future. *Metabolism*, 64: 40-46.
- Mishra, A., Singh, S. y Shukla, S. (2018). Physiological and functional basis of dopamine receptors and their role in neurogenesis: Possible implication for Parkinson's disease. *Journal of Experimental Neuroscience*, 12: 1-8.
- Missale, C., Russel, N. S., Robinson, S. W., Jaber, M. y Caron, M. G. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*, 78:189-225
- Moon, D. O., Park, S. Y., Lee, K. J., Heo, M. S., Kim, K. C., Kim, M. O., Lee, J. D., Choi, Y. H. y Kim, G. Y. (2007). Bee venom and melittin reduce proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *International Immunopharmacology*. 7:1092-1101.
- Mulcahy, P., Walsh, S., Paucard, A., Rea, K. y Dowd, E. (2011). Characterisation of a novel model of Parkinson's disease by intra-striatal infusion of the pesticide rotenone. *Neuroscience*, 181, 234-242.
- Nagatsua, T., y Sawadab, M. (2009). L-dopa therapy for Parkinson's disease: Past, present, and future. *Parkinsonism and Related Disorders*, 15: 3-8.
- Navarro, A., Boveris, A., Báñez, M. J., Sánchez-Pino, M. J., Gómez, C., Muntané, G. y Ferrer, I. (2009). Human brain cortex: mitochondrial oxidative damage and adaptive response in Parkinson disease and in dementia with Lewy bodies. *Free Radical Biology and Medicine*, 46: 1574-1580.
- Nelson, Alexandra B. y Kreitzer, Anatol C. (2014). Reassessing Models of Basal Ganglia Function and Dysfunction. *Annual Review of Neuroscience*, 37, 1-18.

- Nisticò, R., Mehdawy, B., Piccirilli, S. y Mercuri, N. (2011). Paraquat- and rotenone-induced models of Parkinson's disease. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 24(2), 313-322.
- Oller-Salvia, B., Sánchez-Navarro, M., Giralt, E. y Teixidó, M. (2016). Blood-brain barrier shuttle peptides: an emerging paradigm for brain delivery. *Journal of the American Chemical Society* 45: 4690-4707
- Oller-Salvia, B., Teixidó, M. y Giralt, E. (2013). From venoms to BBB shuttles: Synthesis and blood-brain barrier transport assessment of apamin and a nontoxic analog. *Biopolymers (Peptide Science)*, 100: 675-686.
- Orme R, Fricker-Gates RA., Gates, MA. (2009). Ontogeny of substantia nigra dopamine neurons. *Birth, Life and Death of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra*, 3-18.
- Ostrovsky, D. A. y Ehrlich, A. (2019). Bee Venom Acupuncture in Addition to Anti-Parkinsonian Medications may Improve Activities of Daily Living and Motor Symptoms More Than Medication Alone in Idiopathic Parkinson's Disease. *Explore*, 15: 71-73.
- Pacelli, C., Giguère, N., Bourque, M. J., Lévesque, M., Slack, R. S., y Trudeau, L. É. (2015). Elevated mitochondrial bioenergetics and axonal arborization size are key contributors to the vulnerability of dopamine neurons. *Current Biology*, 25: 2349-2360.
- Palermo G., Giannoni S., Frosini D., Morganti R., Volterrani D., Bonuccelli U., Pavese N. y Ceravolo R. Dopamine transporter, age, and motor complications in Parkinson's disease: A clinical and single-photon emission computed tomography study. *Movement Disorders*, 1-10.
- Palermo, G. y Ceravolo, R. (2019). Molecular imaging of the dopamine transporter. *Cells*, 8: 1-16.

- Park, D., Jung, J. W., Lee, M. O., y cols. (2014). Functional characterization of naturally occurring melittin peptide isoforms in two honey bee species, *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Peptides*, 53: 185-193.
- Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy, 1817. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 14: 223-236.
- Paxinos, G y Franklin, K. Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates, 5th Edition. Academic Press, San Diego, CA.
- Pedarzani, P. y Stocker, M. (2008). Molecular and cellular basis of small- and intermediate-conductance, calcium-activated potassium channel function in the brain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65: 3196-3217.
- Pinho R., R. W., Gomide, V. C. y Chadi G. (2003). Striatal injection of 6-hydroxydopamine induces retrograde degeneration and glial activation in the nigrostriatal pathway. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 18: 272-282.
- Poewe, W. (2008). Nonmotor symptoms in Parkinson's disease. *European Journal of Neurology*, 15: 14-20.
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A. E., y Lang, A. E. (2017). Parkinson Disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3: 3-52.
- Pramod, A. B., Foster, J., Carvelli, L., y Henry, L. K. (2013). SLC6 transporters: Structure, function, regulation, disease association and therapeutics. *Molecular Aspects of Medicine*, 34: 197-219.
- Pucca, M. B., Cerni, F. A., Oliveira, I. S., Jenkins, T. P., Argemí, L., Sørensen, C.V., Ahmadi, S., Barbosa, J. E. y Laustsen, A. H. (2019). Bee Updated: Current Knowledge on Bee Venom and Bee Envenoming Therapy. *Frontiers in Immunology*, 10: 1-15.

- Puig, M. V., Rose, J., Schmidt, R. y Freund, N. (2014). Dopamine modulation of learning and memory in the prefrontal cortex: Insights from studies in primates, rodents, and birds. *Frontiers in Neural Circuits*, 1-15.
- Rajput, A. y Rajput, A. H. (2007). Old age and Parkinson's disease. *Handbook of Clinical Neurology*, 84: 427-444.
- Ransom, Bruce R., Kunis, David M., Irwin, I., y Langston, J. William (1987). Astrocytes convert the parkinsonism inducing neurotoxin, MPTP, to its active metabolite, MPP+. *Neuroscience Letters*, 75: 323-328.
- Rascol, O., Brooks, D. J., Korczyn, A. D., de Deyn, P. P., Clarke, C. E. y Lang, A. W. (2000). A Five-Year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with Ropinirole or Levodopa. *The New England Journal of Medicine*, 342: 1484-1491.
- Reichmann, H. (2017). Premotor Diagnosis of Parkinson's Disease. *Neuroscience Bulletin*, 33: 526-534.
- Rios, A., Soma, S., Yoshida, J., Nonomura, S., Kawabata, M., Sakai, Y. y Isomura, Y. (2019). Differential Changes in the Lateralized Activity of Identified Projection Neurons of Motor Cortex in Hemiparkinsonian Rats. *eNeuro*, 6: 1-19.
- Rodriguez-Pallares, J., Parga, J. A., Muñoz, A., Rey, P., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2007). Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: The role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *Journal of Neurochemistry*, 103: 145-156.
- Roome, R. Brian, y Vanderluit, Jaqueline L. (2015). Paw-Dragging: a Novel, Sensitive Analysis of the Mouse Cylinder Test. *Journal of Visualized Experiments*, 98: 1-12.
- Roussa E. y Krieglstein K. (2004) Induction and specification of midbrain dopaminergic cells: focus on SHH, FGF8, and TGF-beta. *Cell and Tissue Research*, 318: 23-33

- Saussereau, E., Guerbet, M., Anger, J. P. y Goullé, J. P. (2014). Memory Impairment after Drug-Facilitated Crimes. *Toxicological Aspects of Drug-Facilitated Crimes*, Academic Press, 121-138.
- Schapira, A. H. V., Cooper J. M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J.B., Marsden C. D. (1989). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet*, 333: 1269.
- Sciani, J. M., Marques-Porto, R., Lourenço Junior, A., y cols. (2010). Identification of a novel melittin isoform from Africanized *Apis mellifera* venom. *Peptides* 31: 1473-1479.
- Shao, W., Zhang, S.-Z., Tang, M., Zhang, X.-H., Zhou, Z., Yin, Y.-Q., Zhou, Q.-B., Huang, Y.-Y., Liu, Y.-J., Wawrousek, E., Chen, T., Li, S. Bin, Xu, M., Zhou, J. N., Hu, G. y Zhou, J.-W. (2012). Suppression of neuroinflammation by astrocytic dopamine D2 receptors via α -crystallin. *Nature*, 494: 90-94.
- Sharma, S., Singh, S., Sharma, V., Singh, V. P., y Deshmukh, R. (2015). Neurobiology of L-DOPA induced dyskinesia and the novel therapeutic strategies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 70: 283-293.
- Siderowf, A., & Stern, M. B. (2008). Premotor Parkinson's disease: Clinical features, detection, and prospects for treatment. *Annals of Neurology*, 64: 139-147.
- Smidt, Marten P. y H. Burbach, J. Peter (2007) How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron. *Nature Reviews Neuroscience*, 8: 21-32.
- Stackman, R. W., Hammond, R. S., Linardatos, E., Gerlach, A., Maylie, J., Adelman, J. P. y Tzounopoulos, T. (2002). Small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels modulate synaptic plasticity and memory encoding. *Journal of Neuroscience*, 22: 10163-10171.
- Stephenson, R., Siderowf, A. y Stern, M. B. (2009). Premotor Parkinson's disease: Clinical features and detection strategies. *Movement Disorders*, 24: 665-670.
- Stern, G. (1989). Did Parkinsonism occur before 1817?. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 11: 11-12.

- Stocker, M., y Pedarzani, P. (2000). Differential distribution of three Ca²⁺-activated K²⁺ channel subunits, SK1, SK2, and SK3, in the adult rat central nervous system. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 15: 476-493.
- Sveinbjornsdottir, S. (2016). The clinical symptoms of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 1: 318-324.
- Sweatt, J. D. (2010). Long-Term Potentiation—A Candidate Cellular Mechanism for Information Storage in the Central Nervous System. In *Mechanisms of Memory*, Second Edition, 150-189.
- Thickbroom, G. W., Byrnes, M. L., Walters, S., Stell, R. y Mastaglia, F. L. (2006). Motor cortex reorganisation in Parkinson's disease. *Journal of Clinical Neuroscience*, 13: 639-642.
- Thoenen, H. y Tranzer, J. P. (1968). Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxydopamine. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für Pharmakologie und experimentelle Pathologie*, 261: 271-288.
- Tibar, H., El Bayad, K., Bouhouche, A., Haddou, E. H. A. Ben, Benomar, A., Yahyaoui, M., Benazzouz, A. y Regragui, W. (2018). Non-motor symptoms of Parkinson's Disease and their impact on quality of life in a cohort of Moroccan patients. *Frontiers in Neurology*, 9: 1-12.
- Toulorge, D., Schapira, Anthony H. V. y Hajj, R. (2016). Molecular changes in the postmortem parkinsonian brain. *Journal of Neurochemistry*, 139: 27-58.
- Tysnes, O. y Storstein, A. (2017). Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, 124: 901-905.
- Tzounopoulos, T. y Stackman, R. (2003). Enhancing Synaptic Plasticity and Memory: A Role for Small-Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channels. *The Neuroscientist*, 9: 434-439.
- Vaughan, R. A. y Foster, J. D. (2013). Mechanisms of dopamine transporter regulation in normal and disease states. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34: 1-16.

- Verhagen Metman, L. (2002). Recognition and treatment of response fluctuations in Parkinson's disease: Review article. *Amino Acids* 23: 141-145.
- Vincent, J.P., Schweitz, H. y Lazdunski, M. (1975) Structure-function relationships and site of action of apamin, a neurotoxic polypeptide of bee venom with an action on the central nervous system. *Biochemistry*, 14: 2521-2525
- Wang, Xi-Jin, Zhang, S., Yan, Zhi-Qiang, Zhao, Yan-Xin, Zhou, Hai-Yan, Wang, Y., Lu, Guo-Qiang y Zhang, Jing-Dong. (2011). Impaired CD200-CD200R-mediated microglia silencing enhances midbrain dopaminergic neurodegeneration: Roles of aging, superoxide, NADPH oxidase, and p38 MAPK. *Free Radical Biology and Medicine*, 50: 1094-1106.
- Wehbe, R., Frangieh, J., Rima, M., el Obeid, D., Sabatier, J.-M. y Fajloun, Z. (2019). Bee Venom: Overview of Main Compounds and Bioactivities for Therapeutic Interests. *Molecules*, 24: 1-13.
- Willis, A. W. (2013). Parkinson disease in the elderly adult. *Missouri Medicine*, 110: 406-410.
- Wulff, H., Kolski-Andreaco, A., Sankaranarayanan, A., Sabatier, J.-M. y Shakkottai, V. (2007). Modulators of small- and intermediate-conductance Calcium-activated potassium channels and their therapeutic indications. *Current Medicinal Chemistry*, 14: 1437-1457.
- Yamada, T., Kawamata, T., Walker, D. G., y McGeer, P. L. (1992). Vimentin immunoreactivity in normal and pathological human brain tissue. *Acta Neuropathologica*, 84, 157-162.
- Yang, E. J., Jiang, J. H., Lee, S. M., Yang, S. C., Hwang, H. S., Lee, M. S. y Choi, S. M. (2010). Bee venom attenuates neuroinflammatory events and extends survival in amyotrophic lateral sclerosis models. *Journal of neuroinflammation*, 7, 69.
- Yang, Qiao-qiao y Zhou, Jia-wei. (2019). Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells. *Glia*, 67: 1017-1035.

- Ye, M., Chung, H. S., Lee, C., Hyun Song, J., Shim, I., Kim, Y. S. y Bae, H. (2016). Bee venom phospholipase A2 ameliorates motor dysfunction and modulates microglia activation in Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice. *Experimental & Molecular Medicine*, 48: 1-9.
- Ye, W., Shimamura, K., Rubenstein, J. L., Hynes, M. A. y Rosenthal, A. (1998) FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell*, 93: 755-766
- Yoon, M., Lee, D., Kim, H., Doo, A., Park, H., & Kim, S. (2013). Investigation of the neuroprotective effects of bee-venom acupuncture in a mouse model of Parkinson's disease by using immunohistochemistry and *in-vivo* ¹H magnetic resonance spectroscopy at 9.4 T. *MRI*, 62: 320-327.
- Zarranz, Juan J., Alegre, J., Gómez-Esteban, Jaun C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atarés, B., Llorens, V., Gomez Tortosa, E., del Ser, T., Muñoz, David G., y de Yebenes, Justo G. (2004). The new mutation, E46K, of α -Synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Annals of Neurology*, 55: 164-173.
- Zeng X-S, Geng W-S, Jia J-J, Chen L and Zhang P-P (2018). Cellular and molecular basis of neurodegeneration in Parkinson disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10: 1-16.
- Zhang, S., Wang, X.-J., Tian, L.-P., Pan, J., Lu, G.-Q., Zhang, Y.-J., Ding, J.-Q. y Chen, S.-Di. (2011). CD200-CD200R dysfunction exacerbates microglial activation and dopaminergic neurodegeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 8: 1-12.
- Zhu, XR., Maskri, L., Herold, C., Bader, V., Stichel, Christine C., Güntürkün, O. y Lübbert, H. (2007). Non-motor behavioural impairments in parkin-deficient mice. *European Journal of Neuroscience*, 26, 1902-1911.

Ziai, M.R., Russek, S., Wang, H.C., Beer, B. y Blume, A. J. (1990) Mast cell degranulating peptide: A multi-functional neurotoxin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 42: 457-461.