

Universidad de los Andes
Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología de la Conducta
Postgrado de Neurología

INSULINA COMO FACTOR PROTECTOR NEURONAL EN EL PROCESO
DEGENERATIVO DEL SISTEMA NIGROESTRIATAL EN MODELOS
EXPERIMENTALES DE ENFERMEDAD DE PARKINSON. LABORATORIO DE
FISIOLOGÍA DE LA CONDUCTA Y UNIDAD DE NEUROLOGÍA-I.A.H.U.L.A. MÉRIDA –
VENEZUELA. 2011.

AUTOR: MICHAELL J. SANTOS G. TUTOR Y ASESOR METODOLÓGICO: DR. PEDRO
RADA

Mérida, 2011

INSULINA COMO FACTOR PROTECTOR NEURONAL EN EL PROCESO
DEGENERATIVO DEL SISTEMA NIGROESTRIATAL EN MODELOS
EXPERIMENTALES DE ENFERMEDAD DE PARKINSON. LABORATORIO DE
FISIOLOGÍA DE LA CONDUCTA Y UNIDAD DE NEUROLOGÍA-I.A.H.U.L.A. MÉRIDA –
VENEZUELA. 2011.

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO POR EL MÉDICO CIRUJANO
MICHAELL J. SANTOS. G, CI: 16111792, ANTE EL CONSEJO DE LA FACULTAD DE
MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES, COMO CREDENCIAL DE MÉRITO
PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE NEUROLOGÍA.

Autor: Michael J. Santos G.

Residente de tercer año del Postgrado de Neurología, Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA) Mérida, Estado Mérida, Venezuela.

Tutor y Asesor Estadístico: Dr. Pedro Rada.

Profesor titular de la Universidad de Los Andes, médico especialista en Neurología. Profesor ordinario de la cátedra de Fisiología y Jefe del Departamento de Fisiología de la Conducta de la Facultad de Medicina.

Agradecimientos:

A Dios y la Virgen por concederme el sublime y misterioso don de la vida.

Al Dr. Pedro Rada, hombre de ciencia, porque además de ser un excelente tutor, ha representado una inagotable fuente de inspiración y ejemplo donde he comenzado a materializar una creciente curiosidad e interés en el encantador campo de la Neurociencia.

A mi pequeña pero insustituible familia.

A todo el personal que constituye la Unidad de Neurología del I.A.H.U.L.A.

A la Ilustre Universidad de Los Andes y Departamento de Fisiología de la Conducta de la Facultad de Medicina.

Índice de Contenidos.

Autores y Asesores.....	Pág. 3
Agradecimientos.....	Pág. 4
Índice de Contenidos.....	Pág. 5
Resúmenes.....	Pág. 6
Planteamiento, Formulación y Justificación del Problema.....	Pág. 8
Antecedentes.....	Pág. 10
Marco Teórico.....	Pág. 14
Métodos.....	Pág. 36
Resultados.....	Pág. 41
Discusión.....	Pág. 57
Conclusiones.....	Pág. 66
Bibliografía.....	Pág. 67

Insulina como factor protector neuronal en el proceso degenerativo del sistema nigroestriatal en modelos experimentales de Enfermedad de Parkinson. Laboratorio de Fisiología de la Conducta y Unidad de Neurología del I.A.H.U.L.A. Mérida, Venezuela, 2011.

Resumen.

La Enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo que se manifiesta básicamente por rigidez, bradicinesia, disminución de los reflejos posturales y temblor en reposo, alteraciones debidas a la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la Sustancia Negra, en el mesencéfalo. La comorbilidad de esta enfermedad neurológica con la Diabetes Mellitus tipo 2 se ha presentado como un fenómeno muy frecuente en la población de pacientes del estado Mérida, lo que hace suponer la existencia de una posible alteración fisiopatológica común a ambas entidades.

Objetivo: Determinar el efecto de la insulina como factor protector neuronal sobre el sistema nigroestriatal en un modelo animal experimental de enfermedad de Parkinson.

Método: Un modelo animal de hemiparkinsonismo provocado por lesión unilateral con 6-OHDA de la sustancia negra, así como animales sanos, en los cuales se medirá la cantidad de dopamina en el cuerpo estriado ipsilateral antes y después de la aplicación de insulina y de solución fisiológica en mesencéfalo anterior, utilizando Microdálisis Intracerebral y Cromatografía Líquida (HPLC) para el manejo de las muestras.

Resultados: La cantidad de dopamina medida por HPLC en el estriado de las ratas que recibieron insulina en la sustancia negra, tanto en los animales sanos como los lesionados, fue significativamente mayor que los que recibieron solución salina como controles.

Conclusiones: La insulina presenta un probable efecto beneficioso sobre la liberación de dopamina por parte de las neuronas nigroestriatales, incluso cuando estas fueron sometidas al efecto tóxico de la 6-OHDA en el modelo experimental de Enfermedad de Parkinson utilizado.

Palabras Claves: Enfermedad de Parkinson, 6-hidroxidopamina (6-OHDA), Hemiparkinsonismo, Diabetes Mellitus, Insulina.

Insulin as neuronal protector factor in the degenerative process of nigrostriatal dopamine pathway in animal models of Parkinson`s Disease. Laboratory of Behavioral Physiology and Neurology Unit of School of Medicine, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.

Background and Purpose: Parkinson`s Disease is a progressive, neurodegenerative disorder that is characterized by severe motor symptoms, including rigidity, slowness of movement, postural imbalance and tremor rest, disturbances due to the progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta, in the midbrain. The comorbidity between this neurological disease and Diabetes Mellitus Type 2 have been very frequent in the patient population of Mérida State, so we assume that probably there is a common pathophysiological mechanism in both diseases.

Goal: To determine the Insulin role as neuronal protector factor on nigrostriatal dopamine pathway in an animal model of Parkinson`s Disease.

Experimental approach: We used male rats Wistar, unilateral 6-OHDA rat model of Parkinson`s disease and healthy animals. We obtained samples from striatum through brain microdialysis, before and after inject insulin into substantia nigra. The dopamine measurement was made with High-performance liquid chromatography (HPLC).

Results: The healthy and injured animals had most dopamine in their striatum when they received insulina into their substantia nigra.

Conclusions and implications: Probably the insulin have beneficial effect on nigrostriatal dopamine pathway, it promotes the dopamine releasing from those cells, both healthy rats and rats with 6-OHDA-Induced hemiparkinsonism.

Key words: Parkinson`s Disease, 6-hydroxydopamine, Hemiparkinsonism, Diabetes Mellitus, Insulin.

Introducción.

Planteamiento del Problema.

La Enfermedad de Parkinson es una entidad neurológica que representa una alta proporción en la morbilidad general de los pacientes atendidos cotidianamente en la Unidad de Neurología de nuestra institución hospitalaria, en cuyo seguimiento se ha determinado a través de observaciones descriptivas, que la Diabetes Mellitus es una de las enfermedades con mayor prevalencia en este grupo de pacientes neurológicos. Tomando en consideración la relación de comorbilidad observada en nuestro medio entre ambas especies patológicas hemos planteado la existencia de un posible efecto protector neuronal de la insulina sobre el sistema dopaminérgico nigroestriatal. Se desconoce la influencia que tiene la insulina sobre la dinámica de los principales neurotransmisores en dicho sistema neuronal, en modelos animales con y sin enfermedad de Parkinson.

Formulación del Problema.

Donde se destacan las siguientes interrogantes:

¿Puede la Insulina inyectada en la sustancia negra de modelos experimentales animales, con y sin Enfermedad de Parkinson, modificar la cantidad de dopamina liberada en el cuerpo estriado ipsilateral? De ser así:

¿Cuál será la magnitud de ese efecto tanto en los animales sanos como en los modelos experimentales de Enfermedad de Parkinson?

Hipótesis:

La Insulina tiene un efecto protector neuronal sobre el sistema nigroestriatal, contrarrestando las modificaciones deletéreas en los principales neurotransmisores de dicho tracto neuronal en modelos experimentales animales de enfermedad de Parkinson, principalmente de la dopamina.

Justificación e Importancia.

La Enfermedad de Parkinson y la Diabetes Mellitus tipo 2 son entidades nosológicas que se observan con alta prevalencia en la práctica clínica y cuya coexistencia en un mismo paciente se presenta con una frecuencia considerable. La determinación y demostración de un eventual sustrato fisiopatológico en la relación entre dichas condiciones nosológicas permitiría acceder a un mínimo nivel de entendimiento de las posibles interacciones entre una especie hormonal, representada por la insulina, y un sistema neuronal constituido por el tracto dopaminérgico nigroestriatal.

Marco de Antecedentes.

1. En un estudio observacional epidemiológico que utilizó los datos del sistema estadístico general del Reino Unido entre los años 1995 y 2005, se determinó que la prevalencia de diabetes entre un grupo de pacientes con Enfermedad de Parkinson y otro grupo sin ésta, fue muy similar. Posteriormente y como segunda parte del estudio se inició un seguimiento de aquellos pacientes que no tenían el diagnóstico de diabetes, con Enfermedad de Parkinson o sin ella, y se observó que el riesgo de desarrollar diabetes resultó más bajo en los individuos con Enfermedad de Parkinson que en aquellos que no contaban con ese diagnóstico (1).
2. Con un similar enfoque epidemiológico de ambas entidades, se siguieron prospectivamente un grupo de 51.552 individuos, habitantes de Finlandia, con edades comprendidas entre 25 y 74 años y sin historia de Enfermedad de Parkinson. Durante un periodo medio de seguimiento de 18 años, 324 hombres y 309 mujeres desarrollaron la Enfermedad de Parkinson con una razón de incidencia mayor en aquellos individuos que tenían previamente el diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2 en relación con los que no tenían este diagnóstico. Estos resultados permitieron al grupo de investigación inferir que la Diabetes Mellitus tipo 2 está asociada con un riesgo aumentado a sufrir enfermedad de Parkinson (2).
3. Se realizó seguimiento durante un lapso medio de 22,9 años a 121.046 mujeres con edades comprendidas entre 30 y 55 años y a 50.833 hombres entre 40 y 75 años, durante un tiempo medio de 12,6 años. Toda la población en estudio provino de los registros estadísticos generales de 11 estados pertenecientes a Estados Unidos.

Durante el seguimiento 530 individuos desarrollaron Enfermedad de Parkinson. Se observó que el riesgo de desarrollar Enfermedad de Parkinson no estuvo asociado de manera significativa a historia previa de hipertensión arterial, cifras elevadas de colesterol ni diabetes (3).

Hasta este momento se han hecho referencia a trabajos observacionales de carácter epidemiológico que han intentado determinar la relación entre ambas enfermedades y se ha observado que los hallazgos no han sido concluyentes, por lo menos en los pocos que hemos citado en este texto. En este sentido revisaremos algunos trabajos publicados de carácter experimental, que han involucrado modelos animales con la finalidad de establecer relación molecular entre ambas entidades, abordando el tema desde el punto de vista fisiopatológico.

4. Utilizando técnicas de inmunohistoquímica se determinó la distribución en el cerebro de ratas, de la isoforma 2 de uno de los substratos que constituye el receptor de insulina, el cual está involucrado en la regulación de la homeostasis energética. Las mayores concentraciones de esta proteína fueron encontradas en los núcleos Arcuato, Ventromedial y Paraventricular del Hipotálamo. También fue localizado en cantidades moderadas en el segmento medio del núcleo del haz solitario, así como en el núcleo dorsal del nervio Vago e Hipogloso, en lo que forma parte del cerebro caudal. En este estudio se destaca que esta isoforma de este substrato del receptor de insulina también fue detectada en neuronas dopaminérgicas pertenecientes al **Área Tegmental Ventral (VTA)**, esta área es equivalente a la sustancia nigra, cuyas proyecciones juegan un papel fundamental en los mecanismos neuroquímicos

involucrados en el sentido de recompensa y adicción en la ingesta de alimentos y de drogas de abuso (4).

5. En función de demostrar la relación entre la disminución provocada de los niveles de dopamina en el sistema nigroestriatal y la resistencia al efecto de la insulina se realizó un estudio en 344 ratas a las que se le provocó una lesión en la parte anterior del cerebro medio con una infusión de 6-OH-DA (6-hidroxidopamina). Seis semanas después los animales fueron clasificados en dos grupos, los que tenían una depleción dopaminérgica estriatal parcial (entre 20% y 65%) y aquellos animales que tenían una gran depleción (entre 90 y 99%). El incremento de la fosforilación del residuo de serina de la isoforma 2 del sustrato del receptor de insulina, un marcador de resistencia a la insulina, fue observado por los investigadores en el estriado donde la dopamina estaba disminuida. Además se observó que la disminución severa de dopamina se acompañó de una disminución total de ese sustrato perteneciente al receptor de insulina, lo que indicó una muy probable degradación de esa proteína receptora. Se observó de igual forma la disminución de la fosforilación de la AKT, una Proteinkinasa que media el efecto intracelular de la activación del receptor de insulina, así como la expresión de GSK3- α , una proteína kinasa activada en el stress celular. Ambos hallazgos se determinaron en el estriado de los animales que cursaban con depleción severa de los niveles de dopamina. Finalmente se observó que la expresión de hsp25, una proteína protectora contra el daño oxidativo y que puede disminuir la actividad de las kinasas del stress celular, estaba disminuida en el estriado de las ratas lesionadas. Todos estos hallazgos le permitieron a los autores

inferir y soportar la hipótesis de que la depleción de la dopamina en el sistema nigroestriatal perjudica la señalización de la insulina en los ganglios basales (5).

6. Con la finalidad de observar el efecto del agente Ginsenosido Rg1 como protector de las neuronas dopaminérgicas en el modelo experimental de Parkinson, a 60 ratas adultas femeninas con ooforectomía, se les aplicó infusión unilateral de 6-OH-DA en la parte anterior del cerebro medio para lesionar las vías dopaminérgicas en el sistema nigroestriatal. Dichos animales fueron tratados con Rg1, el cual fue aplicado una hora y media después de la inyección con 6-OH-DA, pero un grupo recibió una hora antes de la inyección de Rg1 un antagonista del receptor I para el factor de crecimiento similar a la insulina, el JB-1, el otro grupo de animales no recibió este último agente. Posteriormente la conducta o actitud rotacional de los animales inducida por apomorfina y los niveles de dopamina en el estriado fueron estudiados, esto último a través de la expresión genética de la enzima Tirosina Hidroxilasa y el transportador de dopamina en la sustancia nigra. El tratamiento con Rg1 mejoró la conducta rotacional inducida por apomorfina en el modelo de daño nigroestriatal. Se observó que este efecto fue particularmente bloqueado por JB-1. La 6-OH-DA disminuyó significativamente el contenido de dopamina en el estriado pero el tratamiento con Rg1 revirtió esta disminución. El tratamiento con Rg1 en las ratas lesionadas con 6-OH-DA redujo la neurotoxicidad, efecto expresado por los niveles de expresión genética de la tirosina hidroxilasa y del transportador de dopamina en la sustancia nigra. Estos efectos fueron abolidos por el JB-1. Estos datos permitieron a los investigadores proveer evidencia de que el Rg1 tiene efectos neuroprotectores sobre las neuronas dopaminérgicas en los modelos de daño nigroestriatal con 6-OH-DA y

que esta acción probablemente involucra la activación de las vías de señales que implican el receptor I para el factor de crecimiento similar a la insulina (6).

Marco Teórico.

El Parkinsonismo está definido como una combinación de seis manifestaciones motoras específicas e independientes: temblor en reposo, bradicinesia, rigidez, disminución de los reflejos posturales, postura en flexión y el fenómeno de “freezing” (cuando los pies transitoriamente se quedan “pegados” al piso), las cuales no están presentes totalmente en todos los casos. El diagnóstico de parkinsonismo se hace cuando el paciente presenta por lo menos dos de dichas manifestaciones. La Enfermedad de Parkinson es el tipo de parkinsonismo que con mayor frecuencia se encuentra en la labor clínica, además ha sido la entidad más investigada y sobre la cual más se conoce (7).

La Enfermedad de Parkinson es un trastorno neurológico progresivo cuyo mecanismo específico consiste en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigro-estriada. Fue descrita por James Parkinson en 1817 quien reconoció la rigidez, el temblor y los trastornos de la marcha. Recibe posteriormente su epónimo, aunque existen descripciones anteriores que son mencionadas por el propio Parkinson en su ensayo. Unos 50 años después que Parkinson, Charcot completa la descripción original reconociendo la bradicinesia como el signo más importante de la enfermedad. Brissaud fue el primero en mostrar un interés por las alteraciones anatómicas en el mesencéfalo de los pacientes con la enfermedad, pero no fue sino hasta 1960, cuando Walter Birkmayer y Hornykiewicz advirtieron que la administración intravenosa de L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), la precursora de la dopamina, lograba corregir brevemente los

síntomas de la enfermedad, determinándose posteriormente que la pérdida de neuronas en la *pars compacta* de la sustancia negra, con el consecuente déficit dopaminérgico en el cuerpo estriado, es la principal causa de esta enfermedad. La Enfermedad de Parkinson, al igual que el temblor esencial, es la entidad con mayor prevalencia entre las que presentan movimientos anormales. Los estudios epidemiológicos para determinar la frecuencia de la enfermedad han sido difíciles de realizar, debido principalmente por el difícil diagnóstico, sobre todo en los estadios iniciales, además por la falta de marcadores biológicos que también complica el análisis de los casos dudosos. La incidencia y la prevalencia de esta enfermedad aumentan en la medida que se estudian poblaciones de mayor edad, especialmente luego de los 50 años, además en la mayoría de los estudios resulta evidente que es más frecuente en hombres que en mujeres. Varios estudios parecen demostrar que la exposición al agua de pozo, pesticidas y sustancias químicas aumentaría el riesgo de contraer la enfermedad (8).

Dentro de los parkinsonismos existen diferentes entidades, algunas todavía sin clasificar. Existen dos grandes grupos de parkinsonismo. Por un lado tenemos la Enfermedad de Parkinson primaria o idiopática, tanto esporádica como familiar. Existe además los parkinsonismos secundarios donde se destacan diferentes causas (Cuadro 1) (9).

Cuadro 1. Clasificación de los Parkinsonismos (9).

Enfermedad de Parkinson primaria	Parkinsonismo secundarios
Esporádica Familiar	Inducidos por Drogas Inducidos por Toxinas Infecciosa: Enfermedad de Creutzfeld-Jakob Metabólica Estructural: Tumores y hematomas subdurales Vasculares Otras patologías degenerativas: Degeneración corticobasal, demencia por cuerpos de Lewy, atrofia de múltiples sistemas, parálisis supranuclear progresiva, ataxias espinocerebelosas, enfermedad de Hellervorden – Spatz, enfermedad de Huntington, neuroacantosis, enfermedad de Wilson, distonía – parkinsonismo ligada al cromosoma X .

Cuadro 1. Clasificación de los Parkinsonismos (9)

Para conocer los mecanismos fisiopatológicos responsables de la Enfermedad de Parkinson es necesario comprender la forma a través de la cual el Sistema Nervioso Central controla los movimientos. Las regiones motoras de la corteza cerebral contienen neuronas que inician el movimiento voluntario y controlan las neuronas más inferiores pertenecientes a los circuitos locales del tronco encefálico y la médula espinal. Existen además regiones cerebrales adicionales involucradas en el control de esta función tales como los ganglios basales y el cerebelo. El término *ganglios basales* se refiere a un conjunto de cinco núcleos grandes y

funcionalmente diversos que se ubican profundos en el interior de los hemisferios cerebrales y comprenden superiormente el **caudado**, **putamen** y **globo pálido**, así como la **sustancia nigra**, en la base del mesencéfalo y el **núcleo subtalámico**, en el tálamo ventral. Los componentes motores de los ganglios basales forman un asa subcortical a través de la cual se relacionan la mayor proporción de las neuronas de la corteza motora primaria y la corteza premotora. Las neuronas de esta asa se activan antes y durante los movimientos y los efectos que tienen sobre las neuronas motoras superiores son necesarios para la realización normal de los movimientos voluntarios (10).

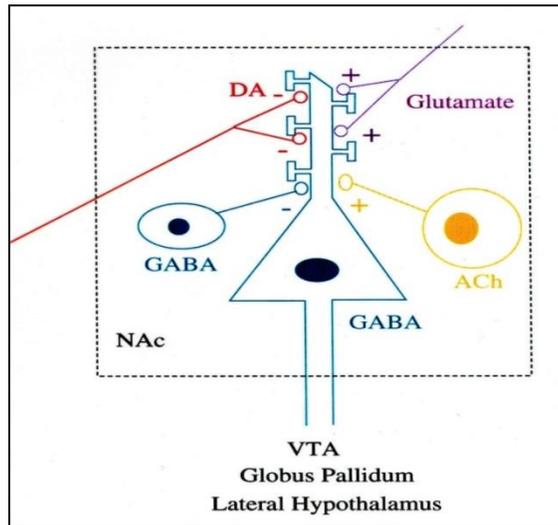
Los núcleos motores de los ganglios basales se dividen en grupos funcionalmente distintos. El **cuerpo estriado** incluye al **núcleo caudado** y al **putamen**, y representa la zona de aferencias de los ganglios basales a través de la cual numerosas neuronas se proyectan desde diferentes partes del encéfalo, haciendo sinapsis con las dendritas de una clase de células llamadas **Neuronas Espinosas Medianas (NEM)**, en el cuerpo estriado. Los penachos dendríticos de las NEM le permiten recibir las numerosas aferencias de la corteza cerebral, tálamo y del tronco del encéfalo y sus axones convergen sobre neuronas en el globo pálido y la porción reticular de la sustancia nigra, representando éstas últimas estructuras las fuentes principales de eferencias del complejo de los ganglios basales. Es importante destacar que casi todas las regiones de la neocorteza se proyectan directamente hacia el cuerpo estriado, representando ésta el origen más sustancioso de las aferencias hacia los ganglios basales, de hecho la corteza visual primaria y la auditiva primaria son las únicas áreas corticales que no se proyectan hacia los ganglios basales. Las áreas corticales con mayor proyección sobre el cuerpo estriado son las áreas de asociación de los lóbulos frontal y parietal, así como la corteza temporal, insular y cingular, constituyendo todas estas proyecciones un conjunto llamado **vía**

corticoestriatal. Las proyecciones que llegan al núcleo caudado provienen principalmente de las cortezas de asociación polimodales y de las áreas motoras en el lóbulo frontal que controlan los movimientos oculares mientras que el putamen recibe aferencias de la corteza somatosensitiva primaria y secundaria del lóbulo parietal, de las cortezas visuales secundarias de los lóbulos occipital y temporal, de la corteza motora y premotora del lóbulo frontal y de las áreas de asociación auditiva en el lóbulo temporal. La proyección de diferentes áreas corticales hacia distintas regiones del cuerpo estriado implica que esta vía tiene numerosos trayectos paralelos que cumplen diversas funciones. Una muestra de que existe una gran subdivisión funcional en el interior del cuerpo estriado es la distribución espacial de diferentes tipos de NEM en grupos celulares llamados “**parches**” o “**estriomas**”, inmersos en una “**matriz**” de células distintas desde el punto de vista neuroquímico. Originalmente se sabía que la diferencia entre las células pertenecientes a los estriomas y las de la matriz se establecía en los tipos de neuropéptidos que contenían ambos tipos celulares, ahora en la actualidad se sabe que también difieren en los orígenes de sus aferencias desde la corteza y en los destinos de sus proyecciones hacia otras regiones de los ganglios basales. Por ejemplo, las áreas límbicas de la corteza, como la circunvolución cingular, tienen mayor número de proyecciones hacia la zona de los parches, mientras que el área motora y somatosensitiva se proyectan en mayor medida hacia las neuronas de la matriz. (10).

Las NEM reciben también aferencias no corticales de interneuronas locales y desde los núcleos de la línea media e intralaminares del tálamo, además de los núcleos aminérgicos del tronco encefálico. Estas sinapsis se hacen específicamente sobre los cuerpos de las dendritas y próximas al soma celular, mientras que las sinapsis de las aferencias corticales se establecen sobre las espinas dendríticas, de esta manera las primeras modulan la eficacia de la activación

sináptica cortical que llega desde las dendritas más distales. Las aferencias aminérgicas son dopaminérgicas y se originan exactamente de una parte de la sustancia nigra denominada **porción compacta** debido a sus células densamente empaquetadas. Estas sinapsis dopaminérgicas se localizan sobre la base de la espina dendrítica, muy cerca de las sinapsis corticales, con un mayor efecto de modulación. De esta manera las aferencias corticales y las provenientes de la porción compacta de la sustancia nigra se encuentran relativamente lejos del segmento inicial del axón de las NEM, lugar donde se genera el impulso nervioso, motivo por el cual las NEM deben recibir muchas aferencias excitadoras corticales y nigricas para activarse. Cuando las NEM se tornan activas, su descarga se asocia con el desarrollo de un movimiento. Algunos registros extracelulares típicos demuestran que es inmediatamente antes del inicio del movimiento que estas neuronas descargan. Las neuronas del putamen tienden a descargar antes de los movimientos corporales y las del núcleo caudado lo hacen antes de los movimientos oculares. Estas descargas anticipatorias forman parte de un proceso de selección de movimientos. Algunos registros han demostrado que las descargas de algunas neuronas estriatales varían según la localización en el espacio de la estructura diana de un movimiento, más que con la posición de inicio de la extremidad en relación con la estructura diana. Tomando en cuenta lo anterior se establece que la actividad de estas células puede codificar la decisión de moverse hacia la estructura diana, en lugar de codificar simplemente la dirección y la amplitud del movimiento real necesario para alcanzarla (10).

Figura 1. Área Tegmental Ventral, Globo pálido e Hipotálamo Lateral.



Las proyecciones GABAérgicas de las NEM terminan en la **división interna del globo pálido** y la **porción reticular de la sustancia nigra**, sitios que constituyen la fuente principal de las eferencias desde los ganglios basales. Una característica muy notable de estas proyecciones es que tienen un elevado grado de convergencia sobre las células del globo pálido y las reticulares. Por ejemplo, se ha estimado que en promedio más de 100 neuronas espinosas medianas inervan cada célula del globo pálido. Las neuronas eferentes del globo pálido interno y de la porción reticular de la sustancia nigra dan origen a las principales vías que conectan los ganglios basales con las neuronas motoras superiores localizadas en la corteza y el tronco encefálico. Las proyecciones desde el globo pálido van principalmente hasta la corteza haciendo un relevo en los **núcleos ventral anterior** y **ventral lateral** del tálamo dorsal, desde donde se proyectan vías hacia las áreas corticales motoras. De esta manera queda constituida un asa amplia que se origina en numerosas áreas corticales y termina nuevamente en áreas motoras del lóbulo frontal, posterior a establecer diferentes relevos en los ganglios basales. Por otro lado los axones que parten desde la porción reticular de la sustancia nigra hacen sinapsis sobre neuronas

motoras del colículo superior, sin relevos en el tálamo, para dirigir los movimientos oculares (10).

La principal eferencia de los ganglios basales es inhibitoria, representada por las proyecciones GABAérgicas desde el globo pálido y la porción reticular de la sustancia nigra. Estas neuronas tienen altos niveles de actividad espontánea e impiden los movimientos no deseados al inhibir tónicamente las células del colículo superior y el tálamo. Dado que las proyecciones provenientes desde el cuerpo estriado son igualmente GABAérgicas, es decir, inhibitorias, el efecto neto de las proyecciones corticales excitatorias que alcanzan al cuerpo estriado es inhibir las células inhibitoras tónicamente activas del globo pálido y la porción reticular de la sustancia nigra. Cuando las neuronas del globo pálido están inhibidas por las NEM, las neuronas talámicas están desinhibidas y pueden transmitir señales desde otras fuentes hasta las neuronas corticales motoras. Esta desinhibición de las neuronas talámicas es lo que normalmente permite que las neuronas motoras superiores envíen órdenes a las neuronas del circuito local y neuronas motoras inferiores que inician los movimientos (10).

Las proyecciones desde las neuronas espinosas medianas en el núcleo caudado y el putamen hasta el globo pálido interno y porción reticular de la sustancia nigra constituyen la llamada “**vía directa**” y liberan las neuronas motoras superiores de la inhibición tónica (fig. 2). Pero existe una segunda vía que se encarga de aumentar ese nivel de inhibición tónica, llamada “**vía indirecta**” y representa un segundo camino que de igual manera conecta el cuerpo estriado con el globo pálido interno y la porción reticular de la sustancia nigra (fig. 3). Aquí un grupo de neuronas espinosas medianas se proyectan hasta el segmento externo del globo pálido desde donde salen proyecciones hasta el segmento interno de éste y al núcleo subtalámico. En lugar de proyectarse hasta estructuras por fuera de los ganglios basales, las neuronas del núcleo

subtalámico se proyectan nuevamente hasta el segmento interno del globo pálido y a la porción reticular de la sustancia nigra. Ya sabemos que estos dos últimos núcleos se proyectan hacia el exterior de los ganglios basales, de esta manera la vía indirecta influye también en la actividad de las neuronas motoras superiores. Las neuronas del núcleo subtalámico que se proyectan hacia el globo pálido interno y la porción reticular de la sustancia nigra son excitatorias. Normalmente, cuando la vía indirecta es activada por señales provenientes de la corteza, las NEM descargan inhibiendo las neuronas GABAérgicas tónicamente activas del globo pálido externo. Como consecuencia, las células subtalámicas se tornan más activas y debido a sus sinapsis excitadoras con células del globo pálido interno y la porción reticular de la sustancia nigra, aumentan la eferencia inhibitoria de los ganglios basales. Al contrario de la vía directa que cuando se activa reduce la inhibición tónica, el efecto neto de la actividad en la vía indirecta es aumentar las influencias inhibitorias sobre las neuronas motoras superiores (10).

Figura 2. Vía directa en los circuitos de los ganglios basales (10).

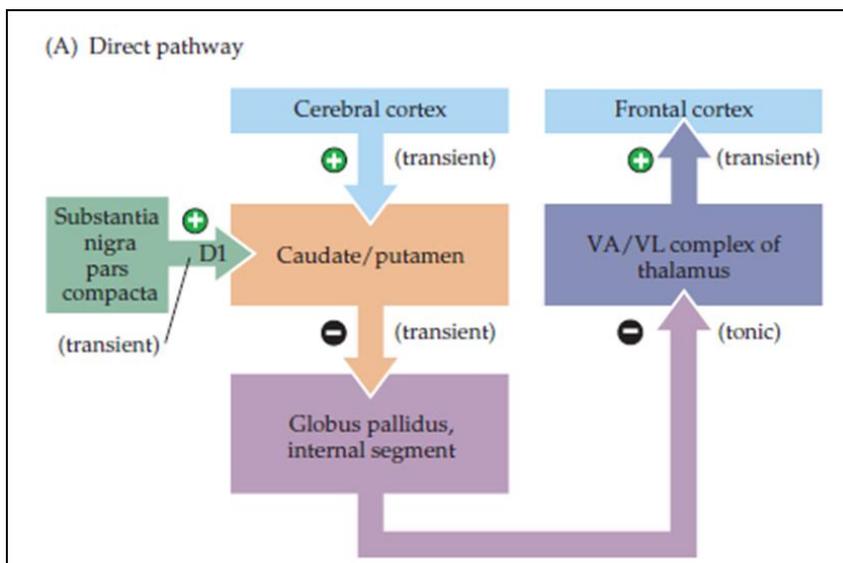
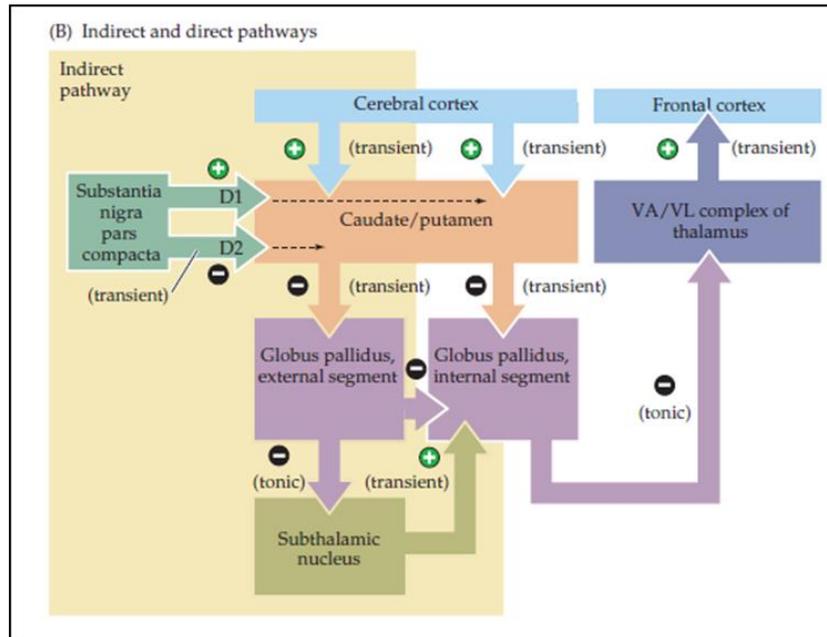


Figura 3. Vía indirecta en los circuitos de los ganglios basales (10).



La vía directa y la indirecta representan circuitos neuronales internos de los ganglios basales y se puede considerar que la vía indirecta es un “freno” sobre la función normal de la vía directa. De igual manera existe otro circuito en el interior de los ganglios basales constituido por las células dopaminérgicas de la porción compacta de la sustancia nigra. Las NEM se proyectan hacia estas células de la sustancia nigra que a su vez envían proyecciones dopaminérgicas difusas hacia las NEM. Las propias neuronas dopaminérgicas pueden a la vez proporcionar una señal excitadora y otra inhibitoria sobre las NEM a través del efecto producido en los receptores dopaminérgicos D1 y D2, estimulador e inhibidor, respectivamente (10).

La dopamina ejerce su acción en las neuronas de los ganglios basales a través de su unión a receptores específicos que inicialmente fueron diferenciados en D1 y D2 por su conexión con el segundo mensajero y por su diferente sensibilidad a agonistas y antagonistas. Más recientemente se han establecido diferencias en la secuencia de aminoácidos del tercer *loop*

intracitoplasmático en la estructura molecular de los receptores D1 y D2, sector que gobierna la unión a la proteína G. Últimamente se han clonado otros subtipos de receptores dopaminérgicos, D3, D4 y D5. La subfamilia de receptores D1 consiste en dos tipos, D1 y D5, que se acoplan con la subunidad alfa de la proteína G estimuladora y activan la Adenilciclase, lo cual incrementa la producción de AMP cíclico. La subfamilia de receptores D2, que consiste en los subtipos D2s, D2i, D3 y D4, está conectada a su vez con la proteína G inhibidora, lo que disminuye la formación de AMP cíclico (11).

Los receptores D1 predominan en las NEM que se proyectan hacia el globo pálido interno (vía directa) y los receptores D2 en las que se proyectan hacia el globo pálido externo (vía indirecta). Dado que los efectos de las vías directa e indirecta sobre las eferencias de los ganglios basales son antagónicos, las diferentes influencias de los axones nigroestriatales producen el mismo efecto, una disminución en la eferencia inhibidora de los ganglios basales (10).

Las influencias reguladoras del circuito nigroestriatal explican muchas de las manifestaciones de los trastornos de los ganglios basales. La enfermedad de Parkinson se produce por la pérdida de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales (fig. 4). Ya sabemos que los efectos normales de las aferencias de la porción compacta hacia el globo pálido interno son la excitación de las NEM que se proyectan hasta el globo pálido interno y la inhibición de las NEM que se proyectan hasta las células del globo pálido externo en la vía indirecta. En condiciones normales ambos efectos de la Dopamina sirven para disminuir las eferencias inhibitoras de los ganglios basales, aumentando de esta manera la excitabilidad de las neuronas motoras superiores. Cuando las células compactas se destruyen, como se observa en esta enfermedad, la eferencia inhibidora de los ganglios basales es anormalmente alta por lo que es menos probable que se

desarrolle la activación talámica de las neuronas motoras superiores en la corteza motora (10). En los pacientes con enfermedad de Huntington se degeneran las NEM que se proyectan hasta el globo pálido externo (fig. 5). De esta manera las células del globo pálido externo se tornan anormalmente activas lo que reduce las eferencias excitadoras del núcleo subtalámico hacia el globo pálido interno. En consecuencia se reducen las eferencias inhibitorias de los ganglios basales. Sin esta influencia limitante de los ganglios basales las neuronas motoras superiores pueden ser activadas por señales inapropiadas lo que conduce a movimientos excesivos no deseados (10).

Figura 4. Enfermedad de Parkinson (10).

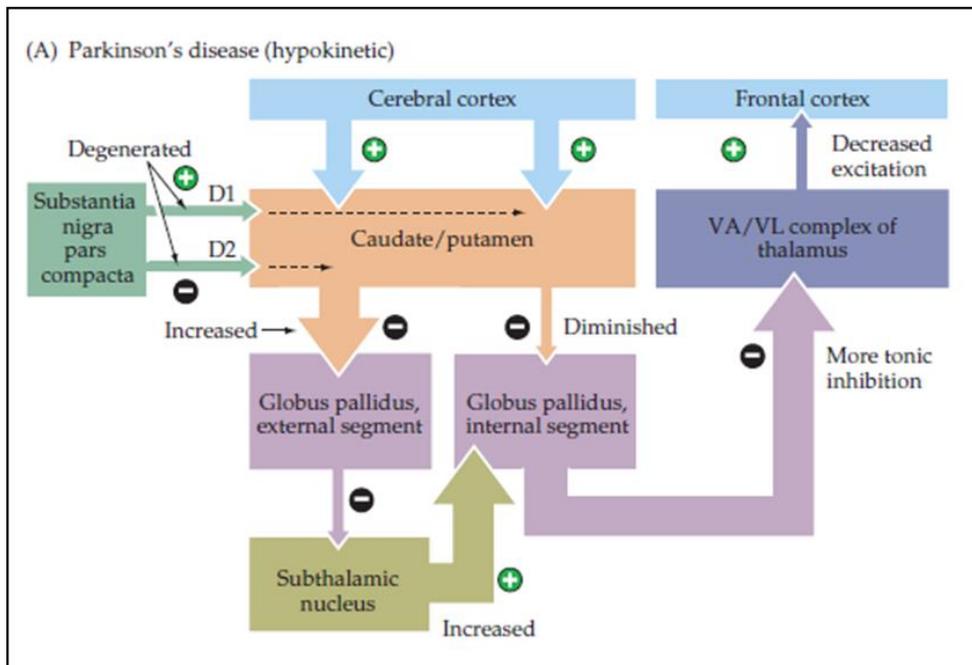
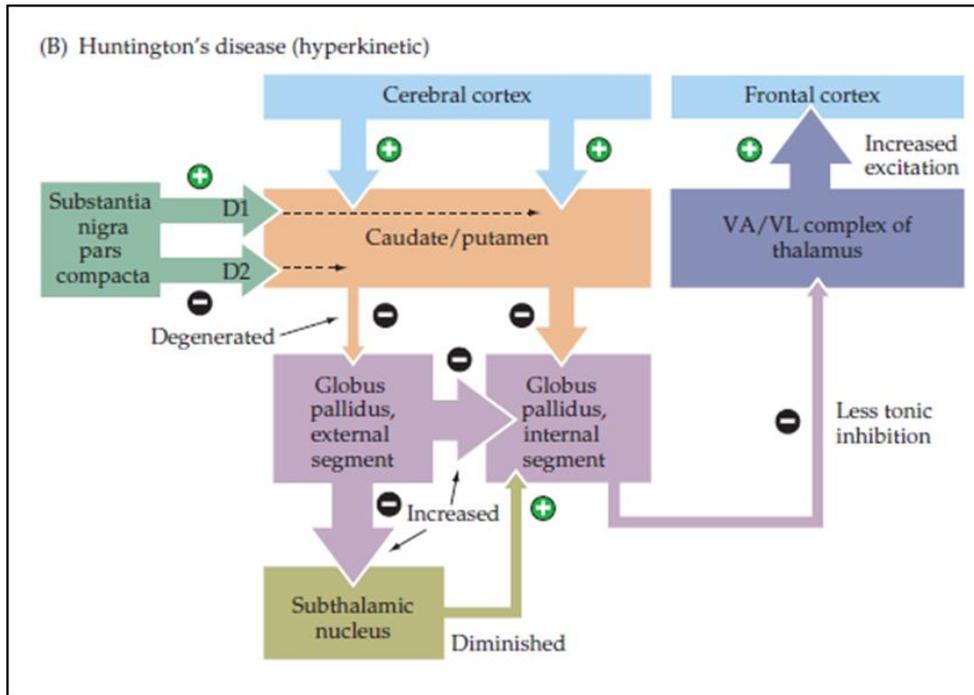


Figura 5. Enfermedad de Huntington (10).



Conocemos perfectamente el papel protagonista de la **Glucosa** en el metabolismo. Esta molécula forma parte del grupo de los **carbohidratos**, compuestos orgánicos que contienen en su composición molecular Carbono, Hidrógeno y Oxígeno. La glucosa es la fuente primaria de energía para los seres humanos. El Sistema Nervioso Central, principalmente el cerebro, depende por completo de la glucosa que contiene el líquido extracelular circundante. Sabemos que es la oxidación de esta molécula el principal mecanismo bioquímico a través del cual una célula obtiene energía en forma de ATP o Trifosfato de Adenosina, un nucleótido de alta energía que se produce en los procesos de Glucolisis y Respiración Oxidativa (12).

El hígado, páncreas y otras glándulas endocrinas intervienen en el control de las concentraciones de glucosa sanguínea en un intervalo reducido. La **Insulina** es la hormona primaria a la que se debe la entrada de glucosa en la célula. Es sintetizada por las células β de los

islotos de Langerhans en el páncreas cuando detectan un incremento de la concentración de glucosa en la sangre. La liberación de insulina causa un mayor movimiento de glucosa en las células y mayor metabolismo de ésta, esto reduce la concentración de glucosa plasmática al incrementar la entrada de glucosa en el músculo y tejido adiposo. La insulina también regula la glucosa al incrementar la glucogénesis, lipogénesis y glucólisis e inhibir la glucogenólisis. La insulina es la única hormona que disminuye las concentraciones de glucosa y se le puede llamar agente hipoglicémico (12).

El **glucagon** es la hormona primaria a la que se debe el incremento de las concentraciones de glucosa. Se sintetiza en las células α de los islotos de Langerhans en el páncreas y puede incrementar las concentraciones de glucosa plasmática mediante glucogenólisis en el hígado y un incremento en la gluconeogénesis (12).

La **Adrenalina** plasmática, secretada por las glándulas suprarrenales, incrementa la glucosa plasmática al inhibir la secreción de insulina, incrementar la glucogenólisis y promover la lipólisis. Los glucocorticoides, principalmente el **Cortisol**, tiene el mismo efecto al disminuir la entrada de glucosa en la células e incrementar la gluconeogénesis (12).

La **Hormona del Crecimiento**, liberada por la hipófisis anterior, incrementa los niveles plasmáticos de glucosa al disminuir la entrada de ésta a las células. Por otra parte las concentraciones plasmáticas de cortisol disminuidas estimulan la hipófisis anterior para que libere ACTH (Hormona Adrenocorticotrópica) y ésta promueve la liberación de cortisol por parte de la corteza de las glándulas suprarrenales con su consecuente efecto hiperglicémico (12).

Por último, las hormonas tiroideas incrementan la concentración plasmática de glucosa al promover la glucogenólisis, gluconeogénesis y absorción intestinal de glucosa. La

Somatostatina, producida por las células δ de los islotes de Langerhans, incrementa las concentraciones de glucosa plasmática mediante la inhibición de la liberación de insulina (12).

Las células β de los islotes pancreáticos sintetizan insulina a partir de un precursor de cadena única de 110 aminoácidos llamado preproinsulina. Después de translocación a través de la membrana del retículo endoplásmico rugoso, el péptido señal N-terminal de 24 aminoácidos de la preproinsulina se desdobla con rapidez hasta formar proinsulina. Aquí, la molécula se pliega y se forman enlaces disulfuro. En el momento de la conversión de la proinsulina humana en insulina, en el complejo de Golgi, se eliminan mediante proteólisis cuatro aminoácidos básicos y el conector restante o péptido C. Esto da lugar a los dos cadenas de péptidos, A y B, de la molécula de insulina, que contiene un enlace disulfuro intra subunidad y dos inter subunidad. La cadena A por lo general está compuesta de 21 residuos de aminoácidos, y la cadena B tiene 30; de este modo la masa molecular es de unos 5800 Da. (7).

El receptor de la insulina, expresado en la superficie celular, pertenece a una gran familia de **receptores proteína-tirosina quinasa**, que se encuentran directamente acoplados a enzimas intracelulares y fosforilan las proteínas sustratos en los residuos de tirosina. Esta familia incluye a los receptores para la mayoría de los factores de crecimiento polipeptídicos, por lo que la fosforilación de las tirosinas de las proteínas ha sido estudiada fundamentalmente como un mecanismo de señalización involucrado en el control del crecimiento y de la diferenciación de las células animales. El genoma codifica 58 receptores proteína-tirosina quinasa, incluyendo los receptores para el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), Factor de Crecimiento Nervioso (NGF), Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF), insulina y muchos otros factores más. Estos receptores comparten una estructura común: un dominio extracelular N-terminal de unión al ligando, una única hélice α transmembrana, y un dominio citosólico C-

terminal con actividad proteína-tirosina quinasa. La mayoría de estos receptores están constituidos por un único polipéptido, pero el receptor de la insulina y otros receptores relacionados son dímeros constituidos por dos pares de cadenas polipeptídicas. La unión del ligando (por ej., la insulina), al dominio extracelular de estos receptores activa el dominio quinasa citosólico, dando lugar a la fosforilación del propio receptor y de las proteínas diana intracelulares, que propagarán la señal (14).

Uno de los uniportadores mejor comprendidos es el transportador de glucosa **GLUT1** que se encuentra en la membrana plasmática de los eritrocitos. La mayoría de las células de mamíferos utilizan la glucosa de la sangre como fuente principal de energía celular y la mayoría expresa GLUT1. Puesto que la concentración de glucosa suele ser mayor en el medio extracelular que en la célula, el GLUT1 cataliza la entrada neta de glucosa desde el medio extracelular hacia el interior de la célula. Al igual que otros uniportadores el GLUT1 alterna entre dos estados conformacionales: en uno, un sitio de fijación para la glucosa está orientado hacia el exterior de la membrana; en el otro, está orientado hacia el interior. El GLUT1 también puede catalizar la salida neta de glucosa desde el citosol hacia el exterior cuando la concentración de glucosa es más alta en el interior de la célula que en el exterior. El genoma humano codifica 12 proteínas, GLUT1 – GLUT12, que son altamente homólogas en secuencia, y se piensa que todas contienen 12 hélices α que atraviesan la membrana. La estructuras de todas las isoformas de GLUT son bastantes similares y todas transportan azúcares. No obstante, sus expresiones diferenciales en distintos tipos de células y las propiedades funcionales específicas de las isoformas permiten a las diferentes células del cuerpo regular el metabolismo de la glucosa independientemente y al mismo tiempo mantener una concentración constante en la sangre. Por ejemplo, el GLUT2 es expresado en el hígado y en las células β secretoras de insulina del

páncreas. Otra isoforma del GLUT, el GLUT4, sólo se expresa en las células grasas y musculares, las células que responden a la insulina incrementan su incorporación de glucosa y eliminan así la glucosa de la sangre. En ausencia de insulina, el GLUT4 se encuentra en las membranas intracelulares, no sobre las membranas plasmáticas y, obviamente, es incapaz de facilitar la incorporación de glucosa. La insulina provoca la fusión de estas membranas internas ricas en GLUT4 con la membrana plasmática, lo que incrementa el número de GLUT4 sobre la superficie celular y, por ende, la velocidad de incorporación de la glucosa. Los defectos en este proceso, uno de los principales por los cuales la insulina disminuye los niveles de glucosa en la sangre, conducen a la diabetes, una enfermedad caracterizada por un nivel de glucosa en sangre continuamente alto (15).

En función de destacar las principales características de la otra entidad patológica que nos concentra en esta presentación, haremos a continuación un breve resumen conceptual sobre la **Diabetes Mellitus**, abordando sus principales definiciones y clasificaciones, así como aspectos diagnósticos de esta enfermedad utilizados en la práctica clínica. En este mismo sentido haremos referencia, muy brevemente, de los principales mecanismos fisiopatológicos que subyacen en la diabetes mellitus, con la finalidad de poder entender su probable relación con los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la enfermedad de Parkinson, abordaje éste que constituye la finalidad de esta presentación.

La diabetes mellitus comprende un grupo de trastornos metabólicos frecuentes que comparten el fenotipo de la hiperglucemia. Dependiendo de la causa de esta enfermedad los factores que contribuyen a la hiperglucemia pueden comprender una disminución de la secreción de insulina, una disminución del consumo de glucosa y un aumento de la producción de glucosa. Las alteraciones fisiopatológicas en esta enfermedad se presentan de manera secundaria al

trastorno metabólico y están representadas por afectación de múltiples sistemas. Aunque todas las formas de Diabetes Mellitus se caracterizan por la hiperglucemia, los mecanismos por los que ésta se produce son diversos y en función a estas diferencias es que se han establecidos la mayor parte de los sistemas de clasificación. Expondremos aquí la clasificación de la *American Diabetes Association* del año 2000. Básicamente en esta clasificación se distinguen cuatro tipos de Diabetes Mellitus con sus respectivas subcategorías. En primer lugar se destaca la Diabetes Mellitus tipo 1, donde hay destrucción de las células β de los islotes pancreáticos con déficit absoluto de insulina. La Diabetes Mellitus tipo 2 que varía entre una resistencia a la insulina predominantemente con déficit relativo de insulina y un defecto secretor de insulina predominantemente con resistencia a la insulina. En el tercer grupo se hace referencia a otros tipos específicos de diabetes y el cuarto grupo de la clasificación se reserva exclusivamente para la diabetes Gravídica (Cuadro 2). (16).

Cuadro 2. Clasificación etiológica de la Diabetes Mellitus. American Diabetes Association, 2000. (16)

I	Diabetes de tipo 1 (Destrucción de las células β , que habitualmente provoca déficit absoluto de insulina) a) Mediada Inmunitariamente b) Idiopática
II	Diabetes de tipo 2 (varía entre una resistencia a la insulina predominantemente con déficit relativo de insulina y un defecto secretor de la insulina predominantemente con resistencia a la insulina)
III	Otros tipos específicos de diabetes a) Defectos genéticos de la función de las células Beta caracterizados por mutación en: 1) Factor de transcripción nuclear hepatocitario (HNF) 4 α (MODY 1) 2) Glucocinasa (MODY 2) 3) HNF-1 α (MODY 3)

	<ul style="list-style-type: none"> 4) Factor promotor de insulina (IPF) 1 (MODY 4) 5) HNF-1β (MODY 5) 6) ADN mitocondrial 7) Conversión de proinsulina o insulina b) Defectos genéticos en la acción de la insulina <ul style="list-style-type: none"> 1) Resistencia a la insulina de tipo A 2) Lepraunismo 3) Síndrome de Rabson-Mendenhall 4) Diabetes lipoatrófica c) Enfermedades del páncreas exocrino: pancreatitis, pancreatectomía, neoplasia, fibrosis quística, hemocromatosis, pancreatopatía fibrocalculosa. d) Endocrinopatías: acromegalia, síndrome de Cushing, glucagonoma, feocromocitoma, hipertiroidismo, somatostatina, aldosteronoma e) Inducida por fármacos o productos químicos: Vacor, pentamidina, ácido nicotínico, glucocorticoides, hormona tiroidea, diazóxido, agonistas β-adrenérgicos, tiazidas, fenitoína, interferon α, inhibidores de proteasa, clozapina, betabloqueantes f) Infecciones: rubéola congénita, citomagalovirus, coxsackie g) Formas infrecuentes de diabetes mediadas inmunitariamente: síndrome del “hombre rígido”, anticuerpos contra el receptor de insulina h) Otros síndromes genéticos que a veces se asocian a diabetes: Síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, síndrome de Turner, síndrome de Wolfram, ataxia de Friedreich, corea de Huntington, síndrome de Laurence-Moon-Biedl, distrofia miotónica, porfiria, síndrome de Prader-Willi
IV	Diabetes Gravídica

Cuadro 2. Clasificación etiológica de la Diabetes Mellitus. American Diabetes Association, 2000. (16). (Cont.)

Hasta este punto hemos revisado de una manera sintetizada los principales aspectos constituyentes de dos entidades nosológicas ampliamente estudiadas hasta la actualidad. Por una parte la enfermedad de Parkinson, como una de las afecciones degenerativas del sistema nervioso más frecuentemente observadas en la práctica clínica y que se destaca de una manera muy particular en el conjunto de enfermedades neurológicas que involucran trastornos del movimiento. De la misma forma hemos abordado a la Diabetes Mellitus, una enfermedad metabólica con repercusión en múltiples sistemas y que también implica procesos degenerativos de evolución crónica. Antes de haber abordado cada una de estas entidades patológicas se intentó exponer los aspectos fisiológicos básicos de los sistemas afectados en cada una de ellas, con la finalidad de poder entender posteriormente los mecanismos fisiopatológicos que subyacen en ambas enfermedades y que constituyen el principal enfoque de este proyecto.

El hecho que nos ha motivado a encaminarnos en este proyecto de investigación está representado por un hallazgo epidemiológico establecido en las labores de atención médica comunitaria iniciadas, coordinadas y ejecutadas por el Dr. Hilarión Araujo, actual jefe de la Unidad de Neurología del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes, en las cuales de una manera magistral y desinteresada se le ha brindado atención médica especializada a las principales comunidades rurales del estado Mérida, llevando la Neurología como especialidad clínica hasta las poblaciones alejadas de nuestro principal centro de salud. Uno de los frutos de dicha actividad, además de la grandiosa satisfacción de prestar servicio médico a aquellos que lo han necesitado y que ha sido el principal objetivo de dicha empresa, es el conjunto de datos epidemiológicos recaudados en dicha labor. Estas actividades comunitarias han permitido conocer la frecuencia y distribución de algunas enfermedades neurológicas en las comunidades

del estado Mérida que han sido frecuentadas con cierta periodicidad por los médicos neurólogos colaboradores en esta labor.

Destacamos aquí un hallazgo epidemiológico importante, que representa nuestra premisa motivadora y que justifica efectivamente nuestro proyecto, la principal comorbilidad establecida en la población de pacientes con enfermedad de Parkinson está representada por la Diabetes Mellitus. Se determinó que aproximadamente el 50% de los pacientes con Enfermedad de Parkinson que habitan en el estado Mérida y que acuden periódica y regularmente a la consulta especializada de Movimientos Anormales en la unidad de Neurología del I.A.H.U.L.A. padecen de Diabetes Mellitus tipo 2, lo que hace de esta enfermedad la principal entidad de comorbilidad en nuestros pacientes con Parkinson. Considerando este importantísimo hallazgo nos hemos planteado justificadas dudas con respecto a los factores fisiopatológicos subyacentes a este hecho. ¿Quizás los pacientes con Parkinson tienen mayor susceptibilidad de sufrir de Diabetes Mellitus tipo 2?, o por el contrario, ¿los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 tienen una susceptibilidad especial de desarrollar Enfermedad de Parkinson?

Objetivo General.

Determinar el efecto de la insulina como factor protector neuronal sobre el sistema nigroestriatal en un modelo animal experimental de Enfermedad de Parkinson.

Objetivos Específicos.

1.- Establecer como modelo animal experimental ratas Wistar, machos adultos jóvenes, en los cuales se realizaran los diferentes procedimientos quirúrgicos encefálicos.

2.- Determinar el efecto que tiene la aplicación de insulina en la sustancia negra sobre el perfil de liberación de Dopamina en el sistema nigroestriatal en animales sanos.

3.- Reproducir un modelo animal experimental de Enfermedad de Parkinson con verificación conductual e histológica.

4.- Evaluar el efecto de la insulina sobre el sistema nigroestriatal en los modelos experimentales de Enfermedad de Parkinson y compararlo con grupos control.

5.- Verificar a través de la realización de pruebas conductuales y observaciones histológicas a los animales de experimentación la efectividad de los diferentes procedimientos.

Métodos.

Replicaremos un modelo animal experimental de la Enfermedad de Parkinson en nuestro laboratorio de Fisiología de la Conducta de la facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes, utilizando 6-OH-DA para provocar las lesiones puntuales en regiones específicas del cerebro de los animales. Involucraríamos principalmente la parte compacta de la Sustancia Negra, procedimiento para el cual utilizaremos la técnica de cirugía estereotáxica. Posteriormente y con la finalidad de comprobar la efectividad funcional de las lesiones realizaremos pruebas conductuales a los animales, éstas consistirán básicamente en la inyección sistémica de Anfetamina la cual incrementa la liberación de dopamina, produciendo una conducta rotacional específica del animal. Este grupo de animalitos estará siendo comparado continuamente con un grupo de animales control a los cuales no se le realizará las lesiones con 6-OH-DA. Se podrá utilizar en un grupo de animales lesionados, la insulina aplicada de manera directa en las áreas cerebrales previamente lesionadas y en otras áreas conectadas funcionalmente con éstas, para luego repetir nuevamente las pruebas conductuales en todos los animales y comparar los resultados en relación a la aplicación de insulina. Un paso de suma importancia en nuestro proyecto estará representado por la medición de los niveles de dopamina en diferentes partes o áreas cerebrales, principalmente en las que fueron lesionadas con la finalidad de comparar los resultados y de determinar alguna probable diferencia en relación a la utilización o aplicación de insulina. Finalmente se comprobará histológicamente la efectividad de las lesiones hechas a través de la realización de cortes y coloración de los cerebros de los animales involucrados en dicho estudio.

Sujetos y cirugía.

Utilizaremos ratas adultas jóvenes Wistar machos, de 280 a 350 gramos de peso, provenientes del Bioterio de la Universidad de los Andes. Las ratas se operarán bajo anestesia general inducida con una combinación de Xylazina (10 mg/kg, intraperitoneal) y Ketamina (100 mg/kg, intraperitoneal). Colocándole a cada rata cánulas guías fabricadas de acero inoxidable, de 21 gauge de diámetro y 10 mm de longitud, apuntando al putamen según coordenadas AP: -0.2 mm de bregma; L: 3.0 mm y V: 3.0 y a sustancia nigra según las coordenadas AP: -5.6 mm de bregma; L: 2.2 mm y V: 2.6 mm (17).

Microinyecciones intracerebrales.

Los inyectores se fabricarán con tubo de acero inoxidable de calibre 26 gauge y en su interior se les colocará un capilar de silicio fundido de 170 micras de diámetro externo y 3 mm de longitud, el cual se colocará en el núcleo a estudiar durante 5 a 10 minutos antes de iniciar el estudio, la metodología ya ha sido previamente publicada. El inyector se acoplará a una bomba de perfusión constante que permitirá la inyección de volúmenes pequeños (0.5 uL/min). Luego de inyectado se esperará 1 minuto para evitar el reflujo de la droga en el momento de retirar el inyector. Finalmente se esperará aproximadamente 5 minutos para comenzar a medir la conducta específica

Microdiálisis intracerebral.

Las cánulas de microdiálisis intracerebral se construirán en el laboratorio con un capilar de silicio fundido dentro de un tubo de acero inoxidable de 26 gauge de diámetro externo, con una membrana de diálisis (13000 MW) expuesta en la punta de 4 mm de longitud y 0.2 mm de diámetro externo. Las cánulas se implantarán 16 horas antes del experimento y se perfundirán

con una solución Ringer modificada (142 mM NaCl, 3.9 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 1.35 mM NaHPO₄, 0.3 mM NaH₂PO₄, pH 7.3) a 0.5 uL/min en la noche y se elevará el flujo a 1 uL/min comenzando 3 horas antes del inicio del experimento. Las muestras de microdiálisis se recolectarán cada 20 minutos hasta obtener una línea basal estable (no obtener una variación mayor a $\pm 10\%$).

Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC) con Detección Electroquímica.

La dopamina se separará mediante una columna cromatográfica C18 en fase reversa de 10 cm de largo y se detectará electroquímicamente con un electrodo de carbón (Modelo 400 EE&G Princeton Applied Research).

Experimento 1:

Efecto de la insulina inyectada directamente en la sustancia nigra sobre los niveles de Dopamina en el estriado.

Variable independiente: Insulina sobre la sustancia nigra.

Variable dependiente: Niveles de dopamina en el cuerpo estriado.

La dosis de insulina que se inyectará localmente en la sustancia nigra es de 10ug/0.5 uL y se medirá la liberación de dopamina en el putamen ipsilateral. Según la respuesta observada haremos una curva dosis-respuesta para confirmar el efecto farmacológico de la insulina. Se tomarán 3 muestras basales y luego cada rata será inyectada con insulina o vehículo y se medirán los cambios en los niveles de dopamina durante los siguientes 180 minutos.

Experimento 2:

Lesión con 6-OH-dopamina (6-OHDA) y el efecto protector de la insulina.

Variable Independiente: Insulina sobre la sustancia negra lesionada previamente con 6-OHDA.

Variable dependiente: Niveles de dopamina en el cuerpo estriado de las ratas lesionadas.

La 6-OHDA se preparará a una dosis de 3.6 mg/ml de solución salina que contiene 0.02% peso/volumen de ácido ascórbico. El vehículo será la solución salina con ácido ascórbico. La 6-OHDA se inyectará unilateralmente en la sustancia nigra mientras que en el otro lado se inyectará el vehículo. En un grupo de ratas se inyectará insulina previa a la 6-OHDA mientras que en el otro se le inyectará vehículo. Al grupo que se le produzca la lesión con 6-OHDA se le seguirá inyectando insulina diariamente por 14 días, posterior a este periodo se realizarán los experimentos conductuales y neuroquímicos (rotación inducida por Apomorfina o Anfetamina y medición de dopamina), al grupo control se le inyectará el vehículo de manera repetida e igualmente se le realizarán las pruebas conductuales y neuroquímicas al finalizar dicho periodo.

Histología.

En todos los experimentos conductuales y de microdiálisis, se sacrificarán a las ratas anestesiándolas profundamente con una sobredosis de pentobarbital sódico y perfundiendo intracardiácamente con solución salina seguido de formaldehído al 10%, para fijar el cerebro. Luego se extraerá el cerebro y se seccionarán con un microtomo en cortes de 50 μm de espesor para observar bajo un microscopio y verificar la localización del inyector y de la cánula de microdiálisis.

Análisis e interpretación de resultados.

Dependiendo del experimento usaremos diferentes pruebas estadísticas, el Análisis de Varianza de dos Vías para Medidas Repetidas (ANOVA) para analizar los resultados del primer experimento y el Test de Student no pareado con dos colas para analizar los resultados del segundo experimento.

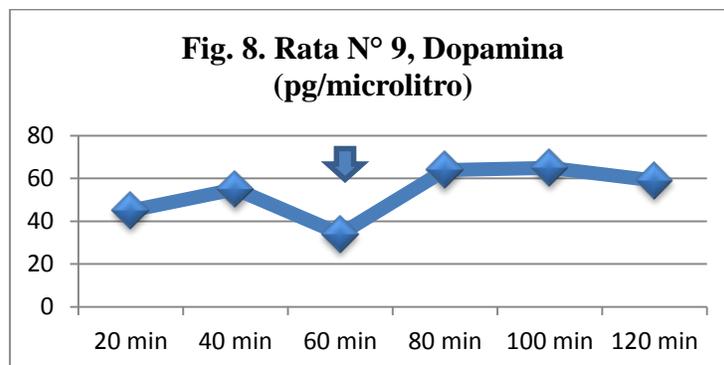
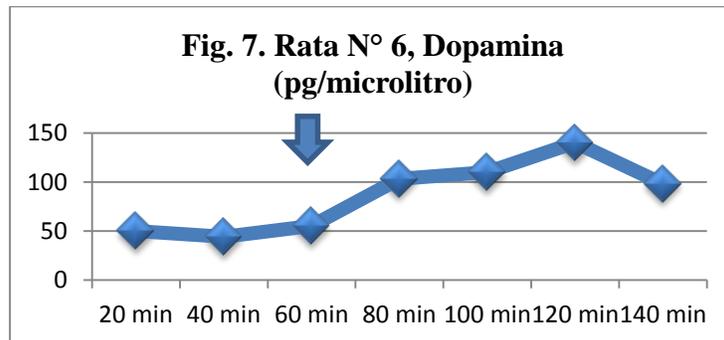
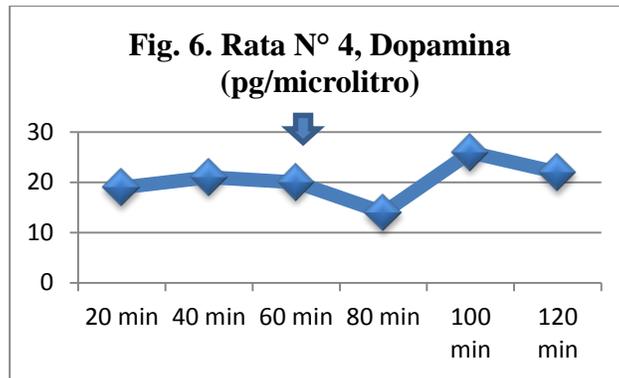
Aspectos éticos del presente estudio.

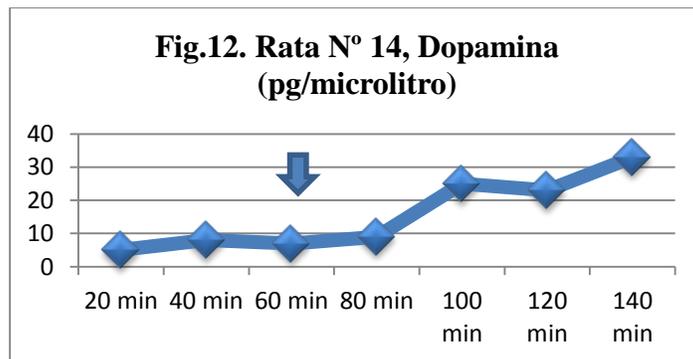
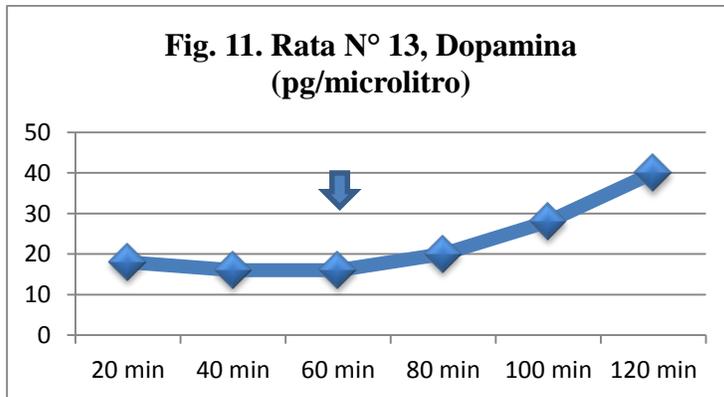
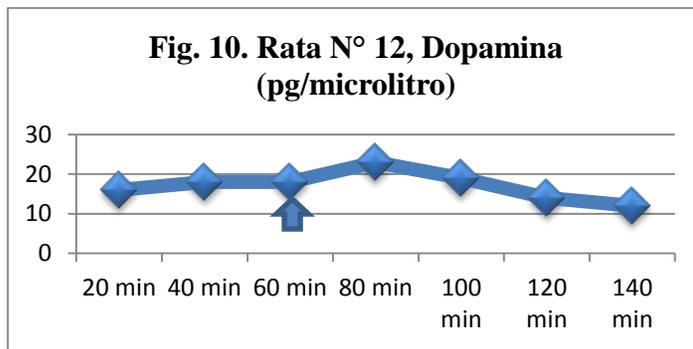
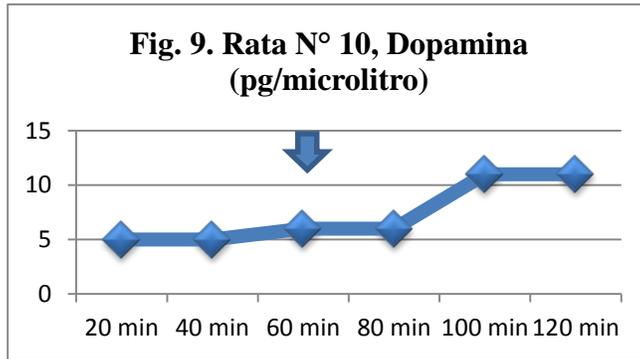
Todos los experimentos se realizaron en animales de experimentación y todos los protocolos fueron aprobados por CDCHT-ULA como organismo controlador y se han cumplido con los lineamientos de Helsinki y las Guías del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) en el manejo y tratamiento de animales de experimentación. Como se hizo notar previamente, utilizaremos el menor número posible de animales.

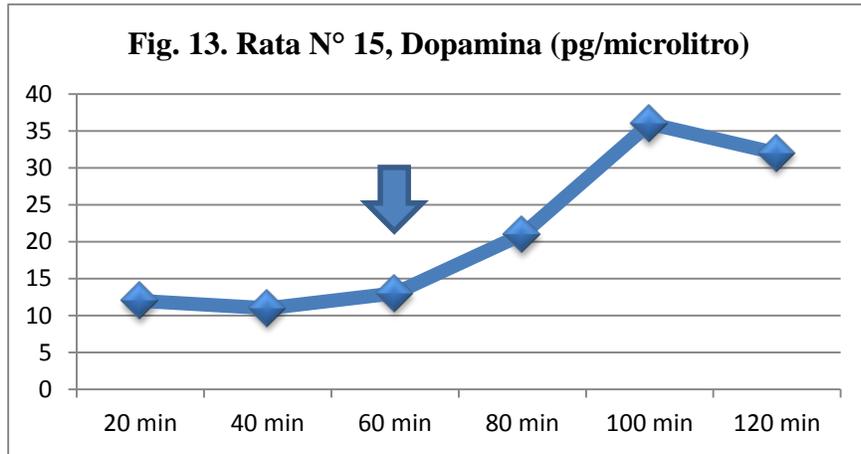
Resultados.

Experimento 1.

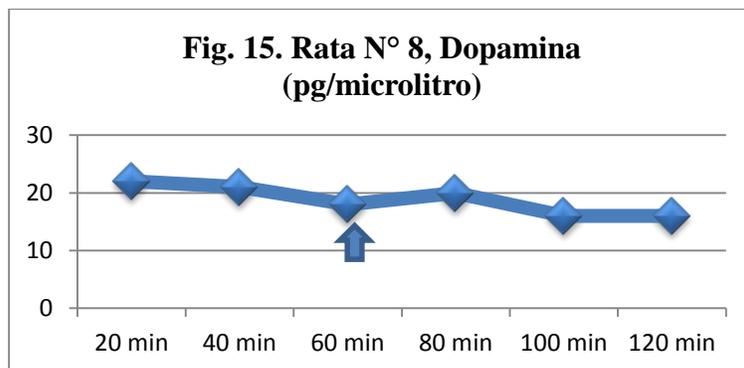
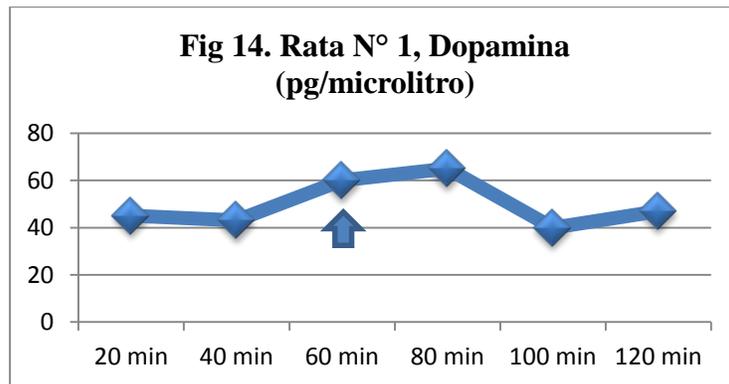
A continuación se presenta gráficamente la variación en los niveles de Dopamina medida en el Estriado de animales sanos, con la administración de 40 microgramos de Insulina en la Sustancia Negra, desde la figura N° 6 hasta la N° 13. (La flecha azul señala el momento en el que se aplicó la insulina o la solución salina en la sustancia negra).

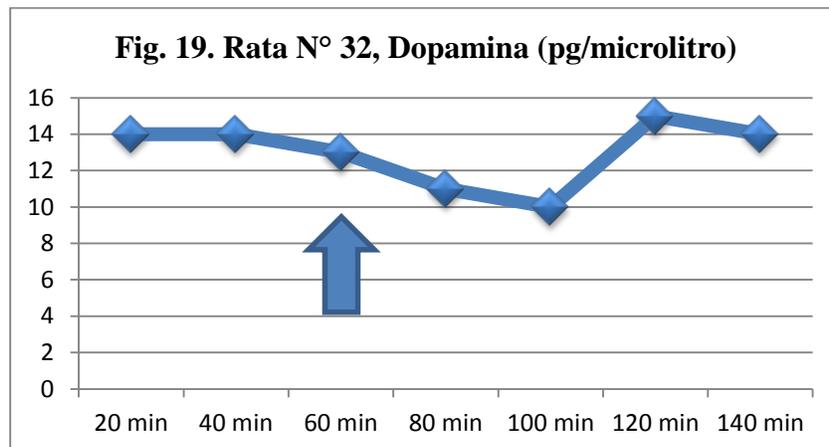
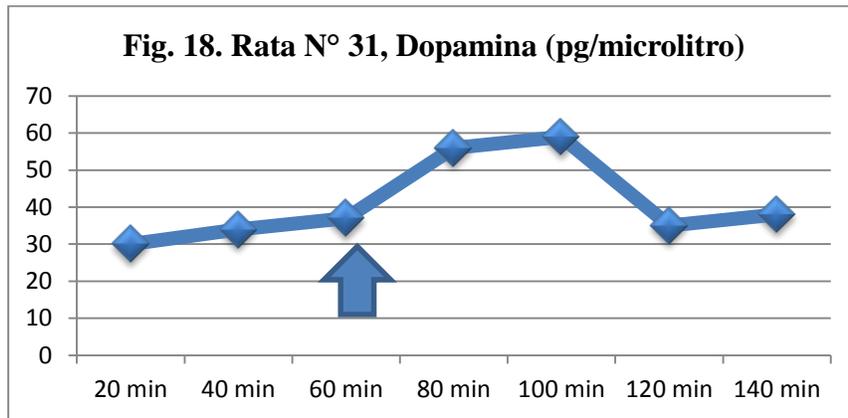
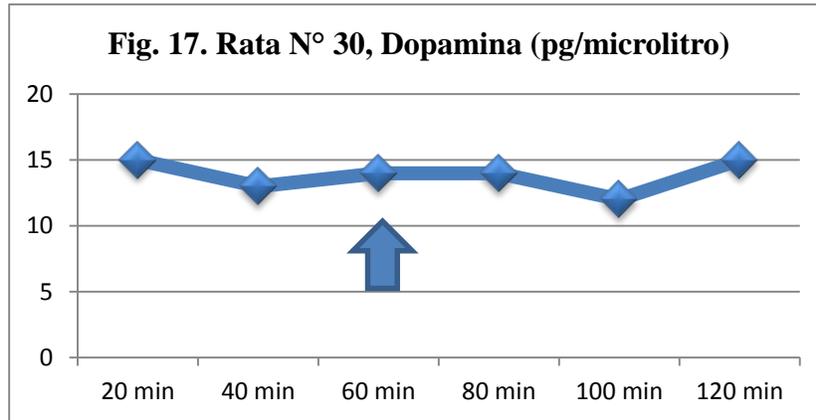






A continuación se presenta gráficamente la variación en los niveles de Dopamina medida en el Estriado de animales sanos, con la administración de Solución Salina en la Sustancia Negra, desde la figura N° 14 hasta la N° 19.





A continuación se presentará la modificación de los niveles de DOPAC (Ácido Dihidroxifenilacético) y HVA (Ácido Homovanílico), metabolitos de la Dopamina, con la aplicación de 40 microgramos de Insulina en la Sustancia Negra de los animales sanos, desde la figura N° 20 hasta la N° 27.

Fig. 20. Rata N° 4. DOPAC y HVA.

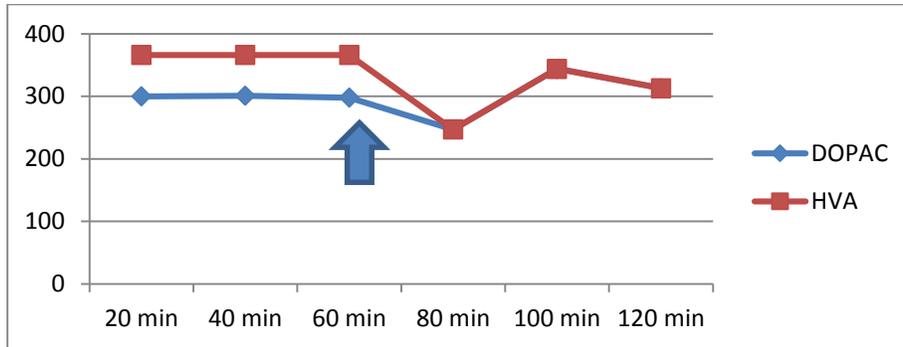


Fig. 21. Rata N° 6. DOPAC y HVA.

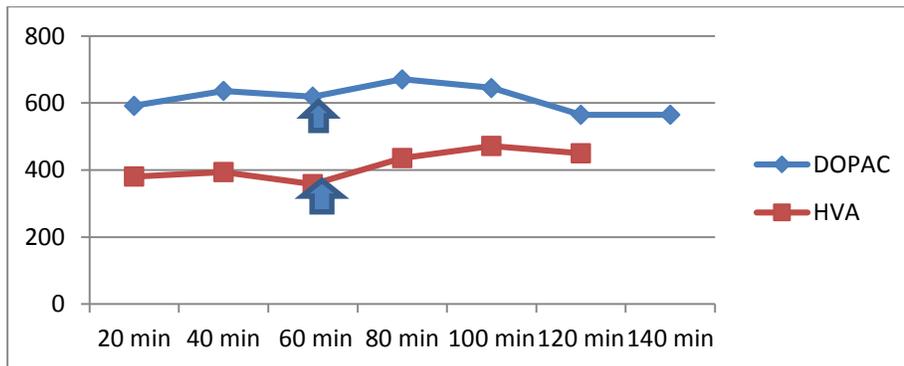


Fig. 22. Rata N° 9. DOPAC y HVA.

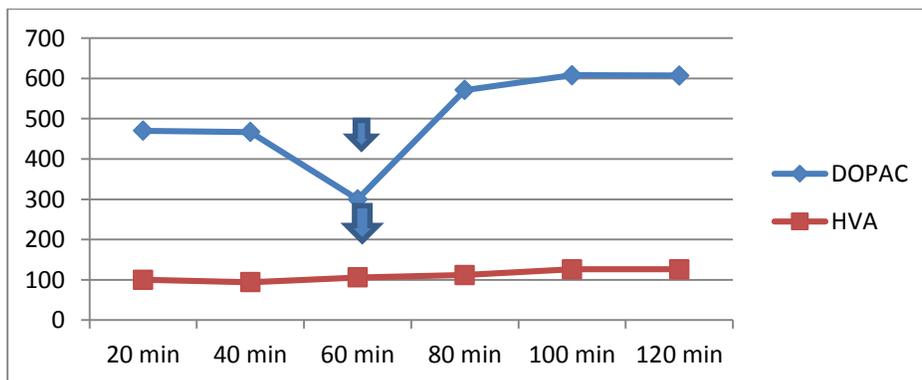


Fig. 23. Rata N° 10. DOPAC y HVA.

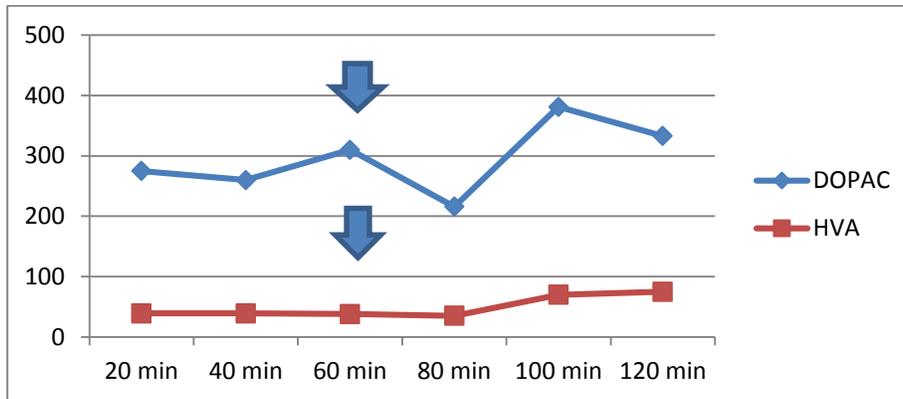


Fig. 24. Rata N° 12. DOPAC y HVA.

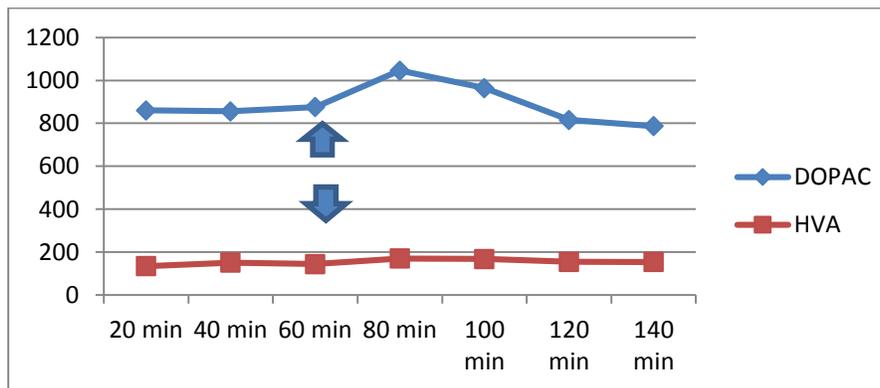


Fig. 25. Rata N° 13. DOPAC y HVA.

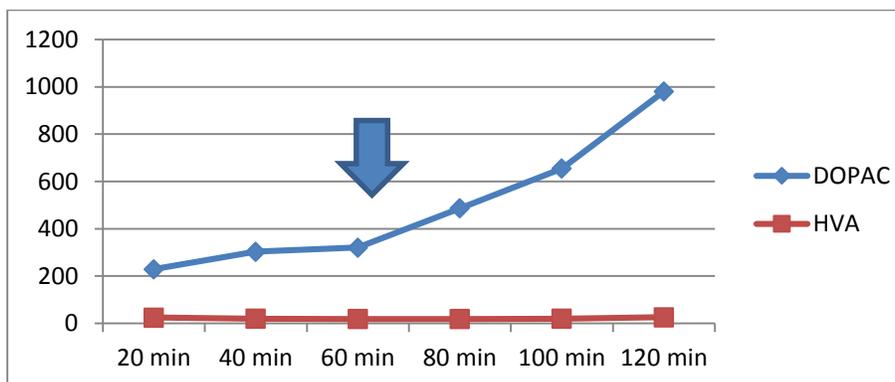


Fig. 26. Rata N° 14. DOPAC y HVA.

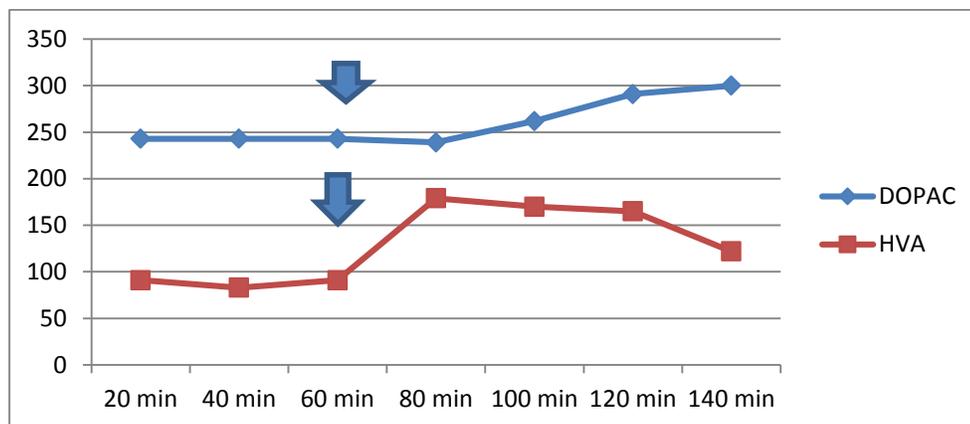
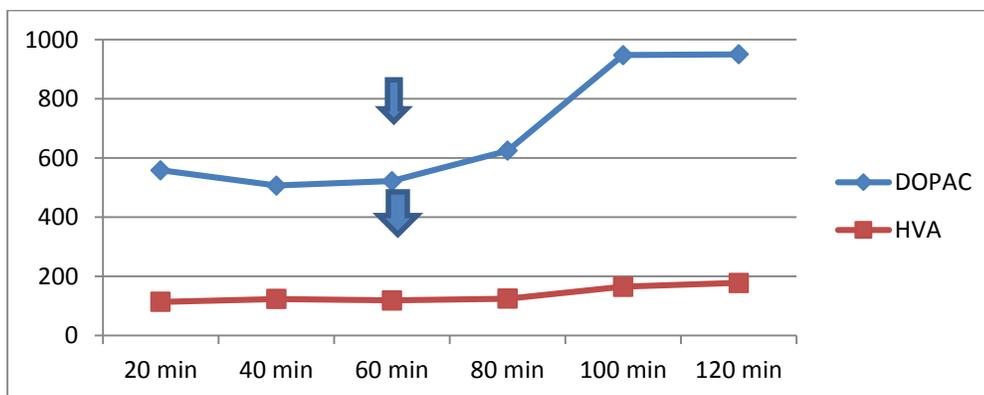


Fig. 27. Rata N° 15. DOPAC y HVA.



A continuación se presentará la modificación de los niveles de DOPAC y HVA con la aplicación de solución salina en la Sustancia Negra de los animales sanos, desde la figura N° 28 hasta la N° 32.

Fig. 28. Rata N° 1. DOPAC y HVA.

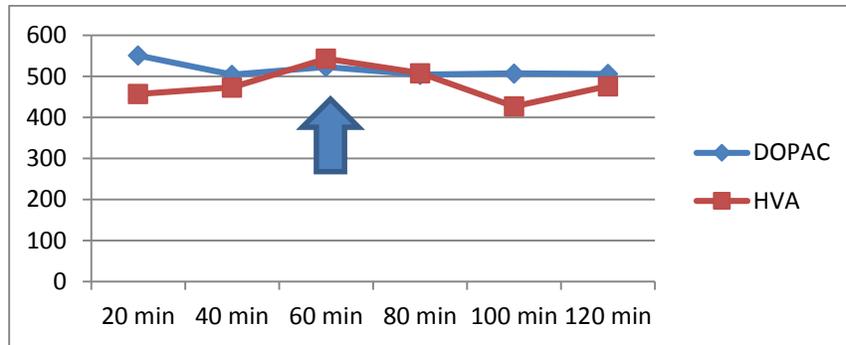


Fig. 29. Rata N° 8. DOPAC y HVA.

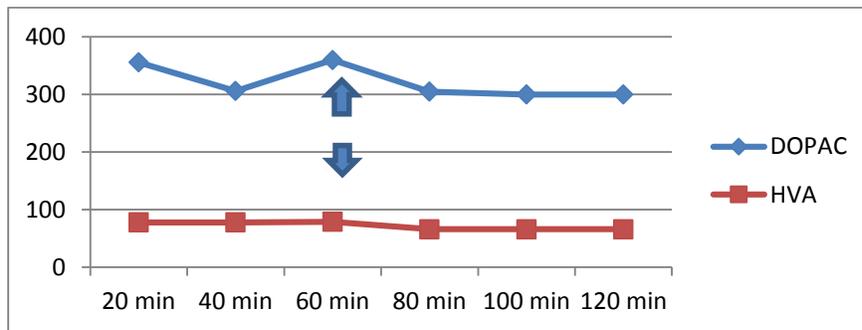


Fig. 30. Rata N° 30. DOPAC y HVA.

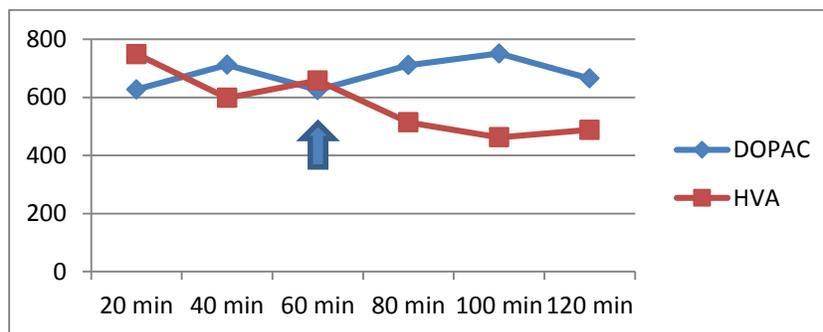


Fig. 31. Rata N° 31. DOPAC y HVA.

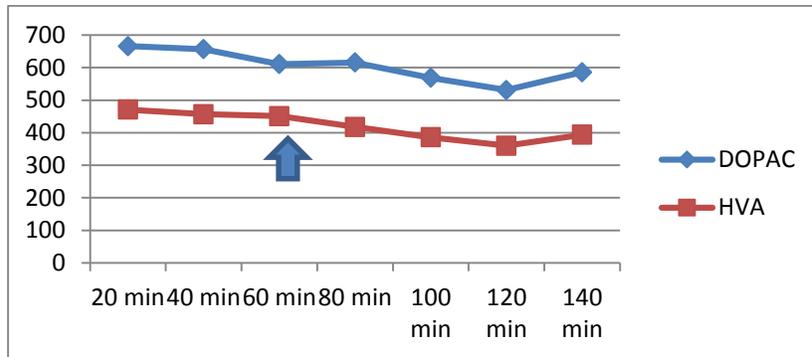
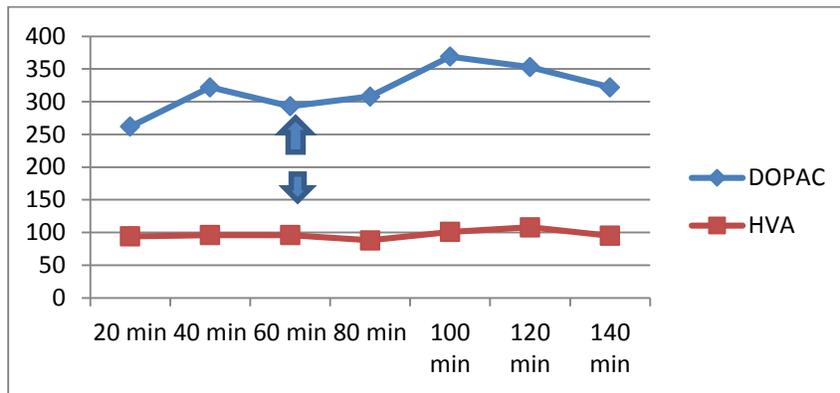


Fig. 32. Rata N° 32. DOPAC y HVA.



Cuadro 3. Dopamina. Inyección de Insulina en Sustancia Negra (Valores Proporcionales)

	20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min	140 min
Rata N°4	95	105	100	70	130	110	
Rata N° 6	100,671141	88,590604	110,738255	207,38255	221,47651	281,879195	197,315436
Rata N° 9	100,746269	123,134328	76,119403	143,283582	145,522388	132,089552	
Rata N° 10	93,75	93,75	112,5	112,5	206,25	206,25	
Rata N° 12	92,3076923	103,846154	103,846154	132,692308	109,615385	80,7692308	69,2307692
Rata N° 13	108	96	96	120	168	240	
Rata N° 14	75	120	105	135	375	345	495
Rata N° 15	100	91,6666667	108,333333	175	300	266,666667	
Promedio	95,7821574	102,426822	101,791021	146,511206	217,980612	221,807806	253,848735
SEM	3,68185116	4,88487597	4,39719966	15,5432186	34,3441138	35,0654822	82,563283

Cuadro 4. Dopamina. Inyección de solución salina en Sustancia Negra (Valores Proporcionales)

	20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
Rata N°1	91,2162162	87,1621622	121,621622	131,756757	81,0810811	95,2702703
Rata N° 8	108,196721	103,278689	88,5245902	98,3606557	78,6885246	78,6885246
Rata N° 30	107,142857	92,8571429	100	100	85,7142857	107,142857
Rata N° 31	89,1089109	100,990099	109,90099	166,336634	175,247525	103,960396
Rata N° 32	102,439024	102,439024	95,1219512	80,4878049	73,1707317	109,756098
Promedio	99,620746	97,3454234	103,033831	115,38837	98,7804296	98,9636291
SEM	4,46659126	3,52025867	6,49511295	16,9713805	21,4923663	6,29019867

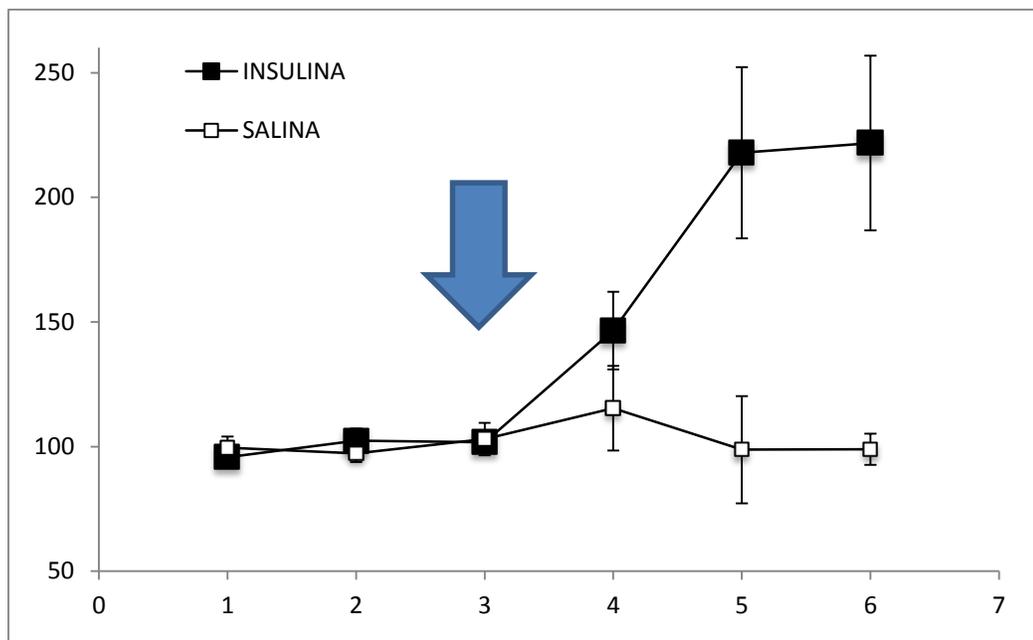
Cuadro 5. DOPAC. Inyección de Insulina en Sustancia Negra (Valores proporcionales)

	20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min	140 min
Rata N°4	100,11235	100,444939	99,4438265	82,4249166	114,794216	104,449388	
Rata N° 6	96,1559285	103,302653	100,541419	108,987547	104,764483	91,7704385	91,7704385
Rata N° 9	113,985449	113,257882	72,7566694	138,480194	147,453517	147,210994	
Rata N° 10	97,6331361	92,3076923	110,059172	76,6863905	135,266272	118,224852	
Rata N° 12	99,537037	99,0740741	101,388889	121,064815	111,574074	94,4444444	91,087963
Rata N° 13	80,5392732	106,565064	112,895662	171,277843	230,363423	344,665885	
Rata N° 14	100	100	100	98,3539095	107,81893	119,753086	
Rata N° 15	105,604534	95,7808564	98,6146096	118,073048	179,093199	179,65995	
Promedio	99,0650511	101,469746	99,4652029	118,989107	145,190557	156,532807	102,105064
SEM	3,56042737	2,44701821	4,54416851	11,6095905	16,5842548	31,7061732	6,99018295

Cuadro 6. DOPAC. Inyección de solución salina en Sustancia Negra (Valores Porporcionales)

	20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
Rata N°1	104,752852	95,8174905	99,4296578	95,8174905	96,3878327	96,1977186
Rata N° 8	104,500978	89,8238748	105,675147	89,5303327	88,0626223	88,0626223
Rata N° 30	95,7739308	108,757637	95,4684318	108,604888	114,714868	101,578411
Rata N° 31	103,309204	101,913133	94,7776629	95,5532575	88,262668	82,3681489
Rata N° 32	89,6237172	110,148233	100,22805	105,359179	126,22577	120,752566
Promedio	99,5921364	101,292074	99,1157899	98,9730295	102,730752	97,7918934
SEM	3,3400447	4,30147182	2,18636922	3,90810371	8,51596658	7,40195155

Fig. 33. Niveles de Dopamina con todos los animales del experimento 1, tanto con Insulina como con Solución Salina en sustancia negra.



Los resultados del experimento número 1 se analizaron estadísticamente con el ANOVA (Análisis de Varianza de dos Vías para Medidas Repetidas), donde se determinó:

Dopamina. $F(5,1) = 4,042$. Con una $p = 0,0029$, estadísticamente significativo.

DOPAC. $F(5,1) = 1,412$. Con una $p = 0,23$, no significativa desde el punto de vista estadístico.

HVA. $F(5,1) = 3,262$. Con una $p = 0,01$, estadísticamente significativo.

Experimento 2.

Cuadro 7. Animales lesionados con 6-OHDA que recibieron Insulina durante 14 días consecutivos. (Valores Absolutos)

	Dopamina (pg)	DOPAC (pg)	HVA (pg)
Rata N° 19	34	637	237
Rata N° 22	39,3	846	231
Rata N° 23	57	1348	634
Rata N° 25	48	1348	974
Rata N° 26	23	445	123

Cuadro 8. Animales lesionados con 6-OHDA que recibieron Insulina durante 14 días consecutivos. (Valores Relativos)

	Dopamina	DOPAC	HVA
Rata N° 19	5,66666667	106,166667	79
Rata N° 22	6,55	141	77
Rata N° 23	9,5	224,666667	211,333333
Rata N° 25	8	224,666667	324,666667
Rata N° 26	3,83333333	74,1666667	41
Promedio	6,71	154,133333	146,6
SMS	1,08505632	34,2945473	59,405083

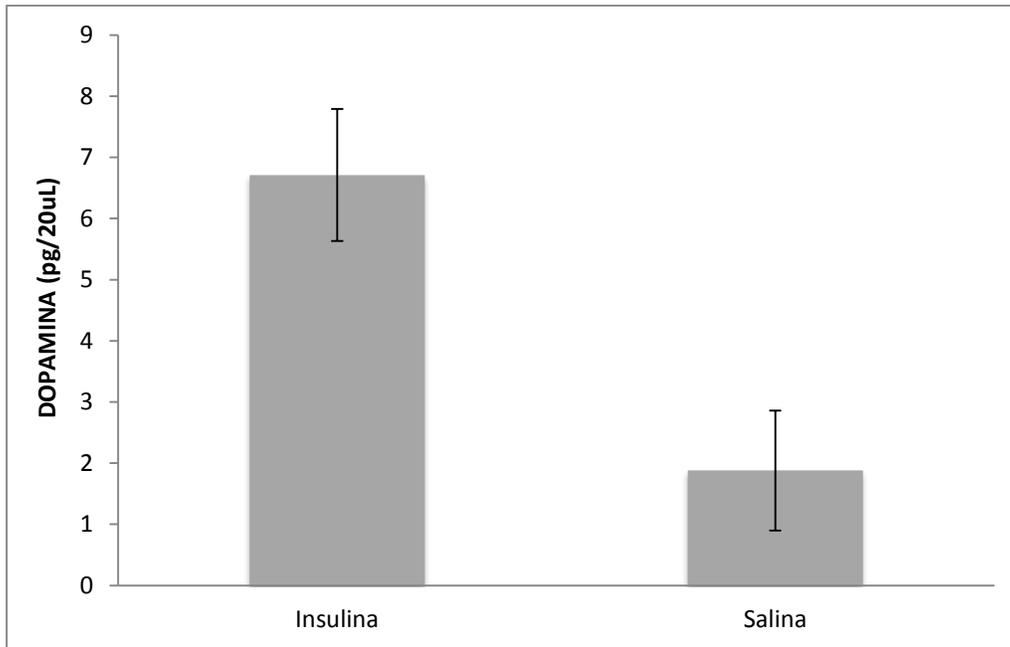
Cuadro 9. Animales lesionados con 6-OHDA que recibieron solución salina durante 14 días consecutivos. (Valores Absolutos).

	Dopamina (pg)	DOPAC (pg)	HVA (pg)
Rata N° 20	18,5	1054	461
Rata N° 24	28	1145	443
Rata N° 33	8	654	202
Rata N° 34	2	67	39
Rata N° 35	0	21	5

Cuadro 10. Animales lesionados con 6-OHDA que recibieron solución salina durante 14 días consecutivos. (Valores Relativos).

	Dopamina	DOPAC	HVA
Rata N° 20	3,08333333	175,666667	76,8333333
Rata N° 24	4,66666667	190,833333	73,8333333
Rata N° 33	1,33333333	109	33,6666667
Rata N° 34	0,33333333	11,1666667	6,5
Rata N° 35	0	3,5	0,83333333
Promedio	1,88333333	98,0333333	38,3333333
SMS	0,98230879	44,1881001	17,9998071

Fig. 34. Animales lesionados que recibieron Insulina o solución salina en la sustancia negra durante 14 días consecutivos.



Los resultados del experimento número 2 se analizaron estadísticamente con el Test de Student (t-test), no pareado con dos colas, donde se determinó:

Dopamina. $T(8) = 3,687$. Con una $p = 0,006$, estadísticamente significativo.

DOPAC. $T(8) = 1,121$. Con una $p = 0,29$, no significativa desde el punto de vista estadístico.

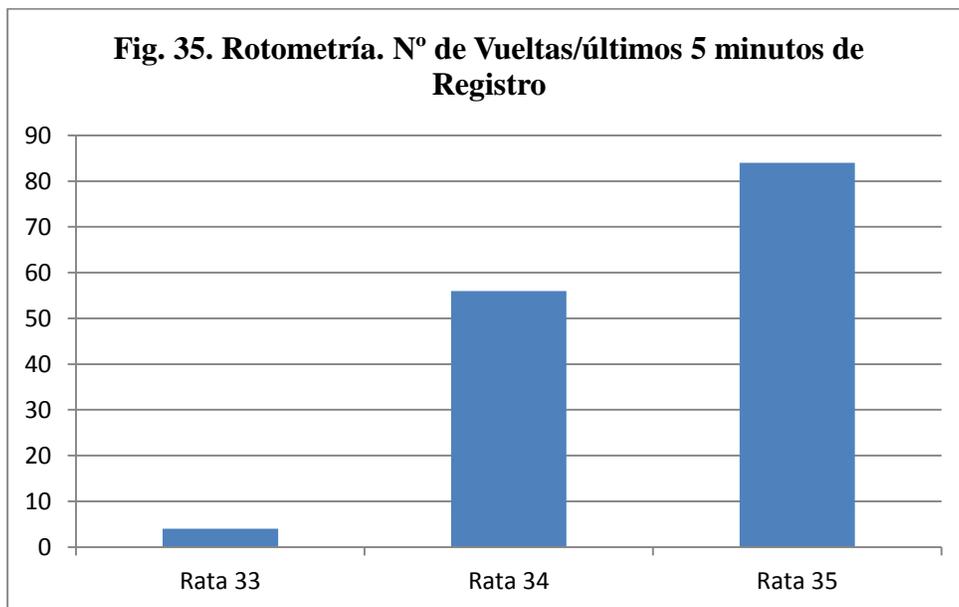
HVA. $T(8) = 1,950$. Con una $p = 0,08$, estadísticamente no significativo.

Los resultados anteriores corresponden a los análisis neuroquímicos que se realizaron en los animales estudiados, pero además, en las ratas que conformaron el experimento 2 se evaluó la conducta motora a través de la realización de Rotometría inducida por Anfetaminas. En estas pruebas se registró al animal en su conducta motora espontánea durante un período de 5 minutos, cumplidos éstos se inyectó por vía intraperitoneal una dosis de Anfetamina ponderada,

5mg/Kg/dosis, y se prolongó el registro durante los siguientes 20 minutos para determinar la conducta rotatoria de la rata.

Las ratas N° 19, 20, 22, 23, 24, 25 y 26 no presentaron conducta rotatoria posterior a la administración de la anfetamina.

Las ratas N° 33, 34 Y 35 sí presentaron conducta rotatoria posterior a la anfetamina y en la siguiente figura se muestran los resultados.



Discusión.

El método por el cual se obtuvieron las muestras analizadas en los animales de este estudio fue la Microdiálisis Cerebral, el cual permite la obtención de pequeños volúmenes altamente filtrados de solución acuosa de elementos polares, libres de proteínas. Estas características definen una muestra perfecta para ser analizada con la Cromatografía Líquida de alta precisión con detección electroquímica (Waters 464, Corp., Millipore, USA), instrumento utilizado para la separación, aislamiento y cuantificación de los elementos neuroquímicos en estudio (18).

Se destaca la gran intensidad que tiene el efecto de la insulina sobre los niveles de dopamina en el cuerpo estriado, fenómeno efectivamente demostrado tanto en los animales sanos como en los lesionados unilateralmente en la sustancia negra. Se decidió medir y exponer los niveles de Ácido Dihidroxifenilacético (DOPAC) y Ácido Homovanílico (HVA), en ambos experimentos, ya que éstos son importantes agentes intermediarios en la cadena de síntesis y degradación enzimática de la dopamina que nos permitieron evaluar indirectamente la concentración de este neurotransmisor. En este sentido se destaca el hecho que, aunque no hubo significado estadístico en las modificaciones del DOPAC y del HVA tanto en animales sanos como los lesionados, éstos agentes presentaron una evidente variación que tendió a ser consecuente y correspondiente a las modificaciones de la concentración de dopamina, fenómeno que nos refuerza los resultados obtenidos.

En el primer experimento los resultados más evidentes estuvieron representados por la dopamina. De 8 ratas que recibieron una dosis directamente aplicada en la sustancia negra de 40 microgramos de Insulina, 7 mostraron un claro aumento de los niveles de dopamina. Esta elevación fue más evidente en las últimas muestras tomadas, es decir, lo que nos permite decir que el efecto de la insulina no fue inmediato. Este hallazgo se consolida como el principal del experimento debido a su significancia desde el punto de vista estadístico y a que responde a las hipótesis planteadas al inicio del trabajo donde se proponía un posible efecto protector de la insulina sobre la competencia del sistema dopaminérgico nigroestriatal. Este hecho se puede corresponder con algunos estudios previamente revisados donde uno de los cuales demostró la presencia de isoformas del receptor de insulina en el área Tegmental Ventral (VTA) (4). Las proyecciones dopaminérgicas desde el VTA terminan en la porción ventral del cuerpo estriado y

conforman la porción ventral del sistema dopaminérgico mesoestriado, cuya porción dorsal está constituida por la fibras que se originan de la pars compacta de la sustancia negra que emiten sus terminales a la porción dorsal del núcleo caudado y el putamen (11). El contraste fue claramente evidente con los animales que recibieron un volumen similar en la sustancia negra pero de solución salina, en los cuales las modificaciones de los niveles de dopamina no llegaron a ser importantes ni considerables.

Comparando los resultados de nuestro trabajo con los previamente revisados y que formaron parte de los antecedentes bibliográficos de éste, se observa que ya se había determinado el efecto beneficioso de algunos agonistas de una de las isoformas del receptor de insulina en los ganglios basales, sobre los niveles de dopamina en el estriado y las conductas rotatorias inducidas en animales con hemiparkinsonismo producido con 6-OHDA (6). En los trabajos que hacemos referencia evalúan los niveles de dopamina en el estriado utilizando también Cromatografía Líquida de Alta Precisión con detección electroquímica, notando que las depleciones de dopamina en este sitio se asociaban a fosforilación de la molécula del receptor de insulina, hecho que lo inactivaba y representaba un estado de resistencia a la insulina. También evaluaban los niveles de dopamina en la sustancia negra pero determinando la expresión de la Tirosina Hidroxilasa (5,6). En nuestro trabajo determinamos los niveles de dopamina solamente en el estriado y las modificaciones de éstos con la colocación de insulina en la sustancia negra, tomando en cuenta que las proyecciones dopaminérgicas son mesoestriatales y que la mayor presencia de dopamina debe encontrarse en el estriado. En este mismo sentido se considera que el posible efecto neuroprotector de la insulina lo ejerce sobre los cuerpos de esas neuronas dopaminérgicas ubicados en los núcleos mesencefálicos, pars compacta de sustancia negra y VTA.

Si nos referimos a los resultados del segundo experimento, donde se utilizaron solamente animales lesionados unilateralmente de la sustancia negra con 6-OHDA, la insulina aparentemente presentó un efecto más notable sobre los niveles de dopamina en el estriado. De los 5 animales que recibieron una dosis diaria de 40 microgramos de insulina en la sustancia negra lesionada, todos mostraron mayores niveles de dopamina en el estriado, comparados con los 5 animales controles que recibieron solución salina. Este resultado refuerza los hallazgos del primer experimento con animales sanos, suponiendo con un poco más de probabilidad, que

efectivamente la insulina tiene un efecto neuroprotector sobre las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales aún cuando éstas hayan sido sometidas al efecto de una lesión neuroquímica, incluso con capacidad de evitar las alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica y las manifestaciones funcionales que dichos defectos impliquen.

Ahora bien, dados los resultados de nuestros experimentos, es inevitable plantear nuevas hipótesis que nos permitan establecer una explicación racional de los fenómenos observados. En este sentido debemos hacer referencia a la dinámica funcional de la mitocondria, organela celular que ha sido reconocida como el principal sustrato disfuncional responsable de las lesiones neuronales en las enfermedades neurodegenerativas, entre las cuales destaca la Enfermedad de Parkinson. Los elementos esencialmente constituyentes de la dinámica mitocondrial están representados por el equilibrio entre la fusión y fisión mitocondrial, la mitofagia, el transporte y biogénesis de las diferentes partes de esta organela. Se ha planteado de manera categórica el importante rol que tendría el desequilibrio entre los elementos conformantes de la dinámica mitocondrial en el proceso neurodegenerativo del sistema dopaminérgico nigroestriatal en la Enfermedad de Parkinson. De hecho, en algunas formas de parkinsonismos con patrón hereditario, que son poco frecuentes, se han identificado mutaciones de genes específicos cuyos productos intervienen activamente en la regulación de la dinámica mitocondrial y en procesos oxidativos relacionados (19,20).

El DJ-1 es un gen implicado en un parkinsonismo familiar con herencia recesiva, cuyo producto anómalo se relaciona con la generación de una Peroxiredoxina y la actividad de una proteasa que condicionan la mayor producción de especies reactivas del oxígeno (19).

La mutación del gen PINK1, reconocida en un tipo de parkinsonismo familiar, y la consecuente deficiencia de su producto, una kinasa mitocondrial, promueve el aumento de las perturbaciones en la respiración oxidativa y en el tamponamiento del calcio intracelular, condiciona la fuga de electrones desde la mitocondria y altera la morfología mitocondrial (19).

El producto del gen Parkin es una ligasa de la Ubiquitina E3 y su mutación también causa un tipo de Enfermedad de Parkinson con patrón hereditario. Esta mutación produce disminución de la eficiencia de las vías involucradas con los productos del PINK1, interfiriendo con la fusión y fisión mitocondria y más recientemente observado, con la mitofagia (19). En este

orden de ideas vale la pena también resaltar de que el mecanismo a través del cual la neurotoxina 6-OHDA produce lesión se debe a que puede generar especies reactivas del oxígeno por medio del ciclo de reducción en la mitocondria. La reducción de la 6-OHDA puede ocurrir tanto en el pH extracelular como a nivel intracelular, pero la toxicidad depende principalmente de las especies reactivas del oxígeno derivadas de la mitocondria, además de la fisión mitocondrial dependiente del Drp-1 y la autofagia de esta organela. Como se observó en modelos con otras toxinas, silenciando la expresión del Drp-1 se puede conferir una protección significativa contra la muerte celular (19,20, 21).

Todos estos mecanismos conocidos han sustentado cada vez más la hipótesis de que la función mitocondrial y todos los elementos relacionados o implicados con procesos oxidativos y la generación de Especies Reactivas del Oxígeno, cumplen un papel fundamental en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de los núcleos mesencefálicos en la enfermedad de Parkinson esporádica (20).

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores es necesario mencionar al Oxido Nítrico (NO), ya que es un gas lábil derivado de l-arginina que posee actividad de radical libre, altamente difundible a través de las membranas biológicas. Cuando este elemento se produce excesivamente se magnifica su papel neurotóxico. En esta condición el NO reacciona con el anión superóxido, otro radical libre, para formar peroxinitrito (OONO⁻), un poderoso agente oxidante capaz de inducir la nitración de proteínas al bloquear la fosforilación de receptores proteína-tirosina quinasas. Recordemos que en la familia de estos receptores se encuentran los de los factores neurotróficos BDNF (Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro), GDNF (Factor Neurotrófico Derivado de la Línea de Células Gliales), TGF- α (Factor Transformador de Crecimiento α), PDGF (Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas), EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico) y NGF (Factor de Crecimiento Nervioso), así como también pertenece a esta familia los receptores de la Insulina. En este punto, precisamente donde se involucra un radical libre, el NO, con las moléculas receptoras de factores neurotróficos, es en donde se puede consolidar el eslabón de unión de dos mecanismos propuestos en la producción de la enfermedad de Parkinson, el estrés oxidativo y exceso de radicales libres por una parte, y la deficiencia de factores tróficos en la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas implicadas (11, 20). Tomando en cuenta que los receptores de los factores neurotróficos anteriormente

mencionados y los de la insulina pertenecen a una familia específica, la de los receptores de tironsinasa, se podría plantear la posible existencia de un mecanismo o un efecto común entre ambas especies, o la existencia de cierto grado de analogía funcional entre la insulina y éstos factores neurotróficos sobre la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas del sistema nigroestriatal, suposición que debe establecerse recordando que en la revisión documental previa se encontraron trabajos científicos donde se demostró la presencia de isoformas de receptores de insulina en los núcleos dopaminérgicos mesencefálicos. Obviamente se resalta la importancia de que el argumento anterior es una apreciación hipotética que se puede inferir desde los resultados del presente trabajo, que no deja de ser una probabilidad susceptible a un proceso de verificación formal.

Con respecto al resultado obtenido en las pruebas conductuales realizadas en los animales que formaron parte del segundo experimento, se destaca el hecho que éstas consistieron en un modelo de conducta rotacional inducida por fármacos, en nuestro caso particular por la Anfetamina, un agente liberador de dopamina. Dichos modelos conductuales habían sido establecidos y replicados con anterioridad y en este proyecto sirvieron para realizar la verificación de la efectividad funcional. Es importante recordar que la administración de un agente liberador de dopamina, como las Anfetaminas, inducen una conducta motora en el animal con hemiparkinsonismo consistente en rotaciones en sentido contrario al lado donde la estimulación de los receptores dopaminérgicos en el estriado es mayor, es decir, giros contralaterales al lado lesionado. En nuestras pruebas conductuales los animales lesionados que recibieron insulina durante 14 días consecutivos no presentaron conducta rotatoria debida a la anfetamina, eso nos sugiere que efectivamente la insulina fue efectiva en prevenir esa alteración funcional motora debida a la lesión unilateral de la sustancia negra. De las ratas que recibieron solución salina durante 14 días en la sustancia negra, 3 mostraron una conducta rotacional provocada por la Anfetamina, probablemente el resto no tenían una lesión efectiva en la sustancia negra. Los resultados obtenidos en las pruebas conductuales muestran una clara tendencia consonante con los resultados expuestos en los diferentes antecedentes documentales revisados (22, 23).

La manera general a través de la cual se verificó y se comprobó la efectividad de las cirugías realizadas a todos los animales que formaron parte de los dos experimentos consistió en

Fig. 37. Corte Histológico, coordenadas en Sustancia Negra.

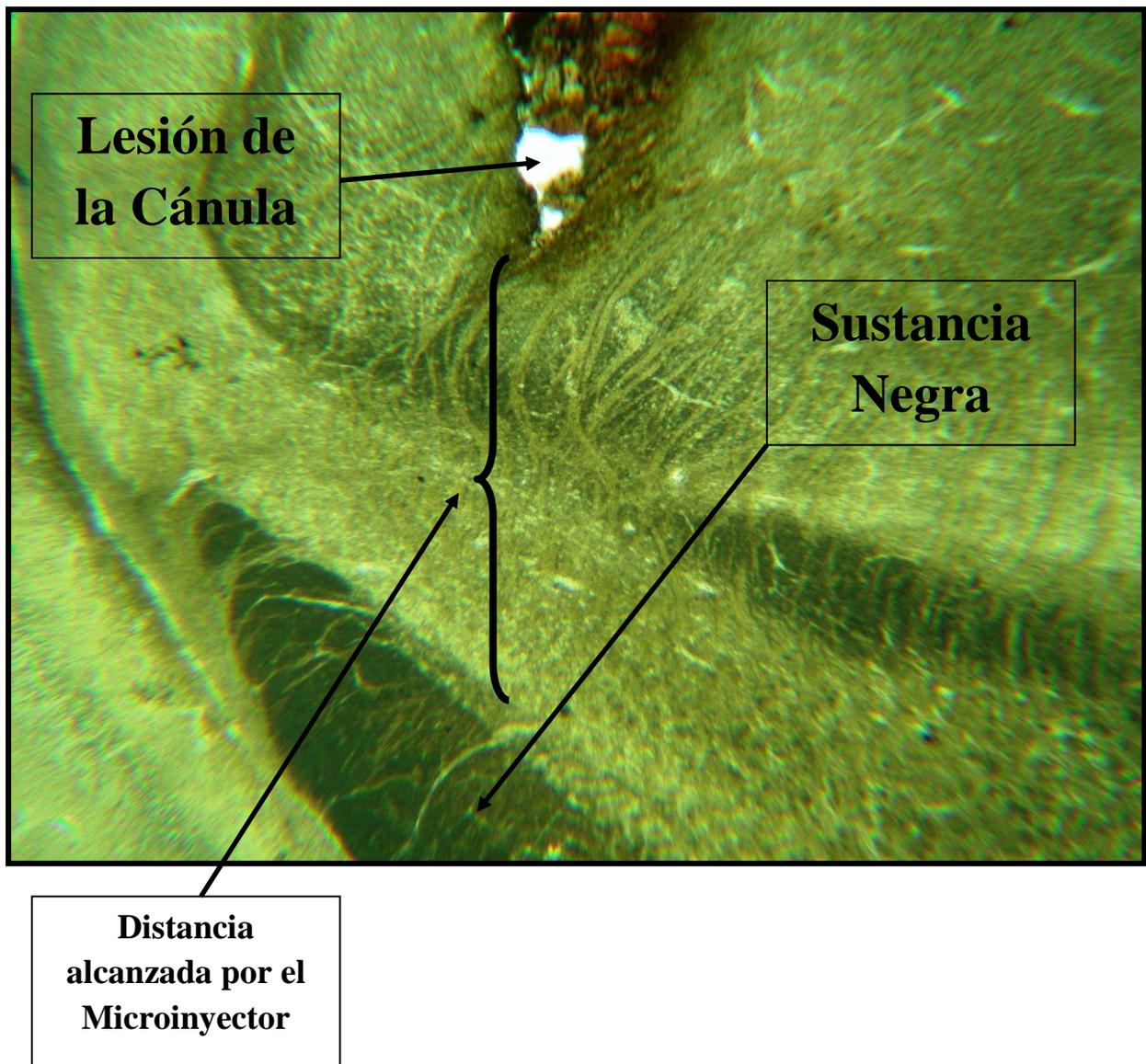
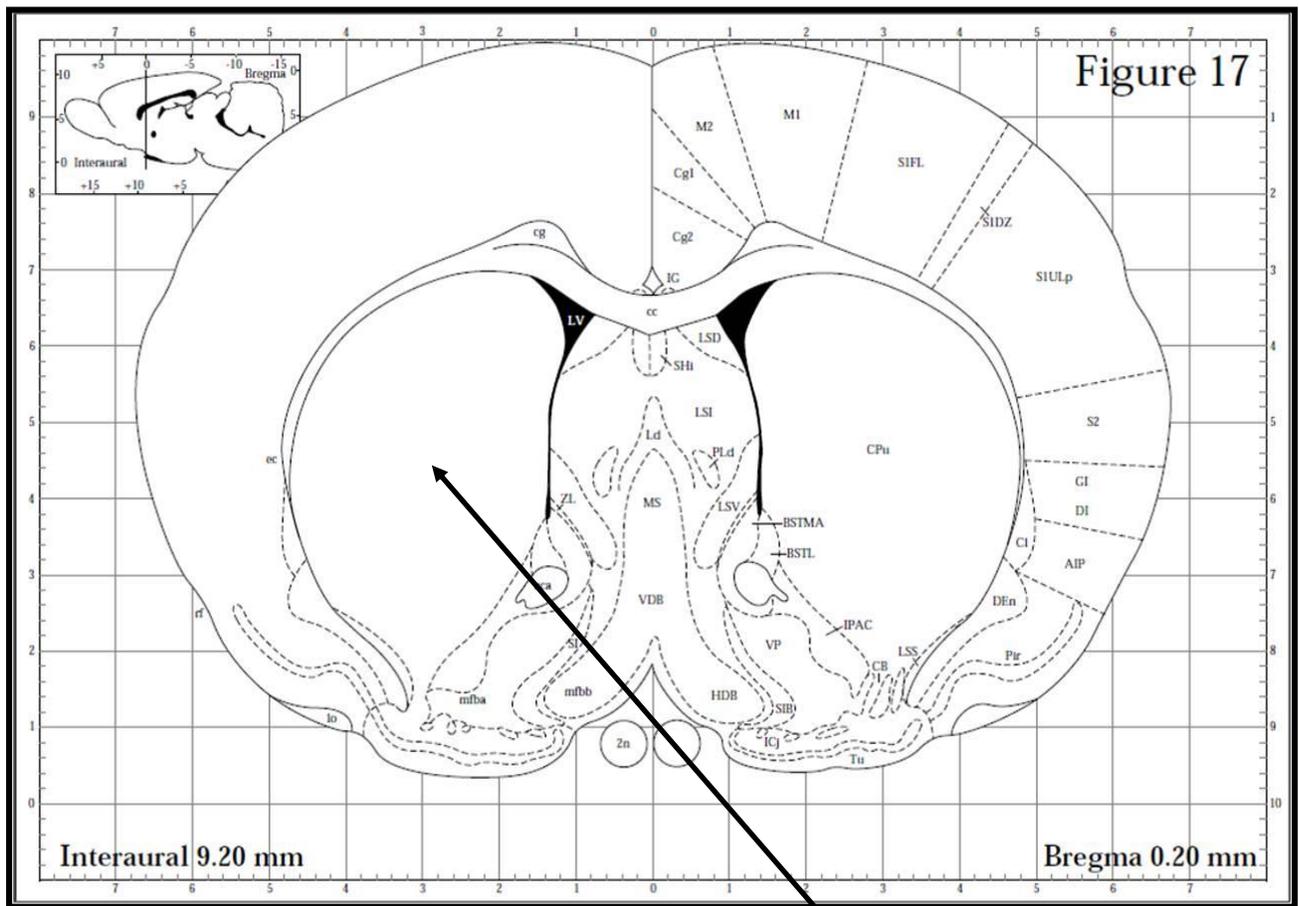
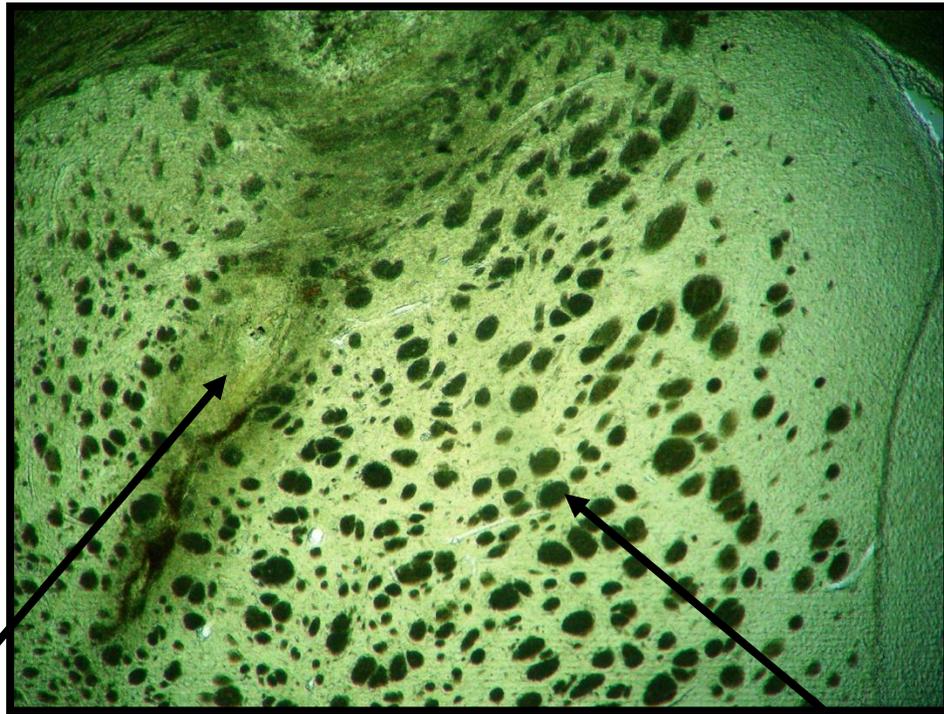


Fig. 38. Esquema anatómico del cerebro de la rata. Coordenadas AP: +0,2mm, L: +/- 3mm, VP: +3mm. (17)



Cuerpo Estriado

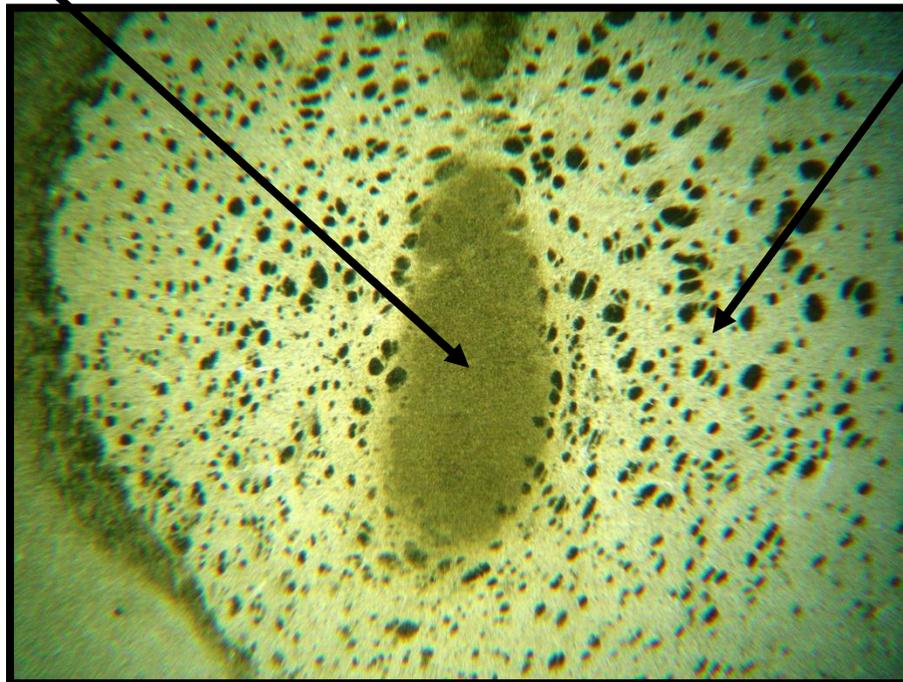
Fig. 39. Corte Histológico. Coordenadas en Cuerpo Estriado.



**Lesión de la
Cánula**

Cuerpo Estriado

Fig. 40. Corte Histológico. Coordenadas en Cuerpo Estriado.



Conclusiones.

Fue efectivamente replicable en nuestro laboratorio el modelo experimental animal de Enfermedad de Parkinson consistente en lesión unilateral con 6-OHDA de la sustancia negra.

La dosis única de insulina de 40 microgramos aplicados en la sustancia negra de animales sanos modificó favorablemente los niveles de dopamina en el cuerpo estriado comparados con aquellos que recibieron solución salina bajo las mismas condiciones.

En las ratas con lesión unilateral de la sustancia negra por 6-OHDA como modelo experimental de hemiparkinsonismo, la administración de una dosis diaria de 40 microgramos de insulina durante catorce días consecutivos en dicho núcleo mesencefálico, permitió el mantenimiento de mayores niveles de dopamina en el cuerpo estriado ipsilateral que aquellos animales controles que recibieron solución salina en las mismas circunstancias.

Los animales lesionados con hemiparkinsonismo inducido no mostraron conducta motora rotacional inducida por la administración sistémica de Anfetamina cuando recibieron insulina durante los 14 días previos. La mayor proporción de los animales lesionados con 6-OHDA que no recibieron insulina sí mostraron una franca conducta rotacional inducida por la droga administrada.

A pesar de que las variaciones en la cantidad de metabolitos intermediarios de la dopamina, específicamente DOPAC y HVA, medidas en el cuerpo estriado, no presentaron un resultado estadísticamente significativo, se observó una clara tendencia de éstas, que fue consecuente a las modificaciones de la dopamina, efecto especialmente observado cuando se utilizó la insulina.

Se recomienda la planificación y realización de nuevos estudios experimentales que involucren estrategias de Biología Molecular que nos permitan evaluar la expresión de receptores de dopamina en el cuerpo estriado y la sustancia negra, relacionada con el efecto de la insulina.

Bibliografia

- 1.- Becker C, Brobert G, Johansson S, Jick S, Meier C. Diabetes in Patients with Idiopathic Parkinson´s Disease. *Diabetes Care*. 2008; 31: 1808-1812.

- 2.- Gang H, Pekka J, Siamak B, Riitta A, Jaakko T. Type 2 Diabetes and the Risk of Parkinson´s Disease. *Diabetes Care*. 2007; 30: 842-847.

- 3.- Simon K. C, Chen H, Schwarzschild M, Ascherio A. Hypertension, hypercholesterolemia, diabetes, and risk of Parkinson disease. *Neurology*. 2007; 69: 1688-1695.

- 4.- Pardini A. W, Nguyen H. T, Figlewicz D. P, Baskin D. G, Williams D. L, Kim F, Schwartz M. W. Distribution of insulin receptor substrate-2 in brain areas involved in energy homeostasis. *J. Brain Res*. 2006; 169-178.

5. - Morris J. K, Zhang H, Gupte A. A, Bomhoff G. L, Stanford J. A, Geiger P. C. Measures of striatal insulin resistance in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson´s Disease. *Brain Res*. 2008; 1240: 185-195.

6. - Xu L, Chen W. F, Wong M. S. Ginsenoside Rg1 protects dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson´s disease through the IGF-I receptor signalling pathway. *British Journal of Pharmacology*. 2009; 158: 738-748.

7. - Fahn S. Clinical aspects of Parkinson disease. En: Nass R, Przedborski S. Parkinson's Disease: molecular and therapeutic insights from model systems. Baltimore: Elsevier Inc; 2008. 3-8.
- 8.- Micheli F. Enfermedad de Parkinson. En: Micheli F, Nogués M. A, Asconapé J. J, Fernandez Pardal M. M, Biller J. Tratado de Neurología Clínica. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2002. 501-530.
9. - Morgan J, Sethi K. D. Differential diagnosis. En: Pahwa R, Lyons K. E. Handbook of Parkinson's Disease. 4th. Ed. New York: Informa Healthcare; 2007. 29-47.
- 10.- Purves D, Augustine G. J, Fitzpatrick D, Hall W, Lamanthia A. S, Mcnamara J, Williamns S. M. Editores. Neurociencia. 3^a. Ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008.
- 11.- Fernández Pardal M. M, Gatto E. M, Halfon M. J. Bioquímica de los Ganglios Basales. En: Micheli F. Enfermedad de Parkinson y Trastornos relacionados. 2^{da}. Ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2006.47-73.
- 12.- Freeman V. S. Carbohidratos. En: Bishop M. L, Fody E. P, Schoeff L. E. Química Clínica. Principios, procedimientos y correlaciones. 5^{ta}. Ed. México D.F: McWraw Hill Interamericana Editores; 2006. 262-281.

- 13.- Davis S. N, Granner D. K. Insulina, fármacos hipoglicemiantes orales y propiedades farmacológicas del páncreas endocrino. En: Hardman J. G, Limbird L. E, Molinoff P. B, Ruddon R. W, Gilman A. G. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Goodman & Gilman. 9ª. Ed. México D.F: McGraw Hill Interamericana Editores; 1996.
14. - Cooper G. M, Hausman R. E. Editores. La Célula. 4^{ta}. Ed. España: Marban; 2008.
15. - Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C. A, Krieger M, Scott M. P, Zipursky S. L, Darnell J. Editores. Biología Celular y Molecular. 5^{ta}. Ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2006.
- 16.- Power A. C. Diabetes Mellitus. En: Braunwald E, Fauci A. S, Kasper D. L, Hauser S. L, Longo D. L, Jameson J. L. Harrison. Principios de Medicina Interna. 15ª. Ed. México D.F: McGraw Hill Interamericana Editores; 2001. 2467-2500.
- 17.- Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 3th. Ed. California, USA: Academic Press, Inc; 1997.
- 18.- Sarre S, Michotte Y. Liquid chromatographic methods used for microdialysis: an overview. En: Westerink B. H, Cremers T. I. F. Handbook of Microdialysis. Methods, Applications and Clinical Aspects. First edition. London: Academic Press and Elsevier; 2007. 233-250.

19.- Chu C. T, Berman S. Mitochondrial Fission – Fusion and Parkinson`s Disease: A Dynamic Question of Compensatory Networks. En: Bingweil L. Mytochondrial Dynamics and Neurodegeneration. First Ed. Stanford, USA: Springer Science; 2011. 197-213.

20.- Neuroprotection in Parkinson`s Disease. En: Kewal K. J. The Handbook of Neuroprotection. Basel, Switzerland: Springer Science; 2011. 297-336.

21.- Terzioglu M, Galter D. Parkinson`s disease: genetic versus toxin-induced rodent models. The FEBS Journal. 2008; 275: 1384-1391.

22.- Cenci M. A, Whishaw I. Q, Schallert T. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? Nature Reviews Neuroscience. 2002; 3: 574-579.

23.- Borlongan C. V, Sanberg P. R. Elevated Body Swing Test: A New Behavioral Parameter for Rats with 6-Hydroxydopamine-Induced Hemiparkinsonism. The Journal of Neuroscience. July 1995; 15(7): 5372-5378.