



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

“Modulación del estado neuroinflamatorio por acción del ácido valerénico en modelo de enfermedad de Parkinson inducido en ratón”

Tesis

Que como parte de los requisitos para
obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Presenta

M. en C. ALFREDO RODRÍGUEZ CRUZ

Dirigido por:

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

Querétaro, Qro. a 11 de Diciembre del 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

“Modulación del estado neuroinflamatorio por acción del ácido valerénico en modelo de enfermedad de Parkinson inducido en ratón”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Presenta:

M. en C. Alfredo Rodríguez Cruz

Dirigido por:

Dra. Laura Cristina Berumen Segura

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Presidente

Dra. María Guadalupe García Alcocer
Secretario

Dra. María Rosa Ávila Costa
Vocal

Dra. Minerva Ramos Gómez
Suplente

Dr. Mamadou Moustapha Bah
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro..
11 de Diciembre del 2019
México

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, le agradezco a Dios por permitirme culminar con gran satisfacción esta etapa de mi vida.

A mi esposa, Dulce, por su amor, comprensión y apoyo durante estos 4 años de trabajo.

A mis padres por el ejemplo y apoyo que durante toda la vida han tenido hacia mi.

A la Dra. Laura Cristina Berumen por siempre creer en los proyectos que propuse, su apoyo y guía en cada paso dado, mi profunda admiración siempre.

A mis sinodales por que siempre tuvieron el compromiso de corregir, proponer y alentarme.

Al Dr. Antonio Romo Mancilla y la M. en C. Amelia Fabiola Chávez Elías por su colaboración.

A mis amigos por siempre mostrar su sinceridad y apoyo.

A mis compañeros de Laboratorio que de una u otra forma aportaron a la culminación de este trabajo, en especial a Elizabeth Barajas Conejo y la M. en C. Elizabeth Martínez Rojo.

Y por ultimo agradezco al CONACYT por el apoyo económico en la beca numero 298061; y a la Universidad Autónoma de Querétaro por el financiamiento FOPER-UAQ y FOFI-UAQ-BERUMEN.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	2
3. ANTECEDENTES	2
3.1. Enfermedad de Parkinson	2
3.1.1. Epidemiología	6
3.1.2. Características clínicas	7
3.1.3. Diagnóstico de la enfermedad	10
3.1.4. Factores de riesgo	13
3.1.5. Factores protectores	15
3.2. Mecanismos moleculares de la enfermedad de Parkinson	16
3.2.1. Falla sináptica en el metabolismo de dopamina	17
3.2.2. Agregados de α -sinucleína	19
3.2.3. Estrés oxidativo	20
3.2.4. Alteración de la función mitocondrial	21
3.2.5. Neuroinflamación	22
3.2.5.1. Respuesta celular inmune	24
3.3. Tratamientos para la enfermedad de Parkinson	26
3.4. Ácido valerénico, sesquiterpeno de la <i>Valeriana officinalis</i> <i>L.</i>	31 34
4. HIPÓTESIS	35
5. OBJETIVOS	35

5.1.	Objetivo general	35
5.2.	Objetivos específicos	36
6.	METODOLOGÍA	36
6.1.	Equipos y reactivos	36
6.1.1.	Equipos	36
6.1.2.	Reactivos	37
6.2.	Animales y tratamientos	37
6.3.	Evaluación de la función motora	38
6.3.1.	Prueba de caminata sobre viga (función neuromuscular)	39
6.3.2.	Prueba de campo abierto (actividad motora)	39
6.3.3.	Prueba de fuerza de agarre en rejilla (función neuromuscular)	41
6.4.	Disección de tejidos	42
6.5.	Inmunohistoquímica	42
6.5.1.	Fijación y crioprotección de tejidos	42
6.5.2.	Corte de tejidos	42
6.5.3.	Inmunofluorescencia	43
6.6.	Extracción y cuantificación de proteínas	43
6.6.1.	Extracción de proteínas	44
6.6.2.	Cuantificación de proteínas totales	45
6.7.	Semi-cuantificación de proteínas TH+ y GFAP mediante <i>Western blot</i>	45
6.7.1.	Electroforesis SDS-PAGE	46
6.7.2.	Electrotransferencia de proteínas	47
6.7.3.	Revelado con quimioluminiscencia	47
6.8.	Cuantificación por ELISA de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ	48
6.9.	Citometría de flujo	49
6.10.	Acoplamiento molecular de la interacción del ácido valerénico con el receptor serotoninérgico 5-HT _{5A}	50

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
8.1. Pruebas de función motora	51
8.2. Inmunofluorescencia y <i>Western blot</i> del análisis de las proteínas TH+ y GFAP.	54
8.3. Evaluación de citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ por ELISA	56
8.4. Análisis de leucocitos periféricos mediante citometría de flujo	59
8.5. Resultados del acoplamiento molecular del ácido valerénico con el receptor 5-HT _{5A}	60
9. CONCLUSIÓN	64
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Síntomas de la enfermedad de Parkinson	9
2	Criterios clínicos para el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson	12
3	Formas monogénicas de la enfermedad de Parkinson	14
4	Tratamientos farmacológicos para síntomas motores de la enfermedad de Parkinson	27
5	Tratamientos farmacológicos para síntomas no motores de la enfermedad de Parkinson	30
6	Valores de evaluación en prueba de fuerza de agarre en rejilla	40
7	Diluciones para la preparación de la curva de calibración de cuantificación de proteínas	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Anatomía de la <i>sustancia nigra</i> en cerebro humano y de ratón	3
2	Patología de Lewy en la enfermedad de Parkinson	4
3	Proyección del número de individuos afectados por la enfermedad de Parkinson para 2040 a nivel mundial	6
4	Circuito motor (indicado por las flechas rojas que conectan las regiones que modulan movimientos de las piernas, brazos y el rostro)	8
5	Síntomas clínicos y curso de tiempo de la progresión de la enfermedad de Parkinson	10
6	Mecanismos moleculares que contribuyen a la neurodegeneración dopaminérgica de la enfermedad de Parkinson	17
7	Modelo de la sinapsis dopaminérgica	18
8	Mecanismo inflamatorio en la enfermedad de Parkinson	25
9	Sitios de acción de los fármacos para el tratamiento de los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson	29
10	<i>Valeriana officinalis</i> L	31
11	Estructura del ácido valerénico	32
12	Esquema del aparato de caminata sobre viga	38
13	Aparato para realizar la prueba de fuerza de agarre en rejilla	41

14	Pruebas de función motora	53
15	Detección por inmunofluorescencia de las proteínas TH y GFAP en el cerebro medio	55
16	Cuantificación de la expresión de las proteínas TH y GFAP en cerebro medio por <i>Western blot</i>	56
17	Cuantificación de citocinas proinflamatorias por ELISA	57
18	Citometría de flujo de leucocitos periféricos	60
19	Resultados de los cálculos del acoplamiento molecular	62
20	Propuesta de la vía de señalización del ácido valerénico en la disminución del proceso neuroinflamatorio	63

ABREVIATURAS Y SIGLAS

3-OMD	3-O-metildopa
AINES	Fármaco anti-inflamatorio no esteroideo
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
CAT	Enzima catalasa
COMT	Enzima catecol-O-metiltransferasa
COX-2	Enzima ciclooxigenasa tipo 2
DDCIs	Inhibidores de la dopamina descarboxilasa
ECL	Ensayo de quimioluminiscencia
EE.UU.	Estados Unidos de América
EP	Enfermedad de Parkinson
GFAP	Proteína glial fibrilar acida
HRP	Enzima peroxidasa de rábano picante
IL	Interleucina o citocina
iNOS	Enzima óxido nítrico sintasa inducible
L-dopa	Levodopa
MAO-B	Enzima monoamina oxidasa tipo B
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinal
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NO	Óxido nítrico
PBS	Amortiguador de fosfatos
PET	Tomografía por emisión de positrones
RBD	Trastorno de conducta del sueño de movimientos oculares rápidos

REM	Movimientos oculares rápidos
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SNM	Síntomas no motores
SNpc	<i>Sustancia nigra pars compacta</i>
SOD	Enzima superóxido dismutasa
TH	Enzima tirosina hidroxilasa
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UPS	Ubiquitina-proteosoma
V.A.	Ácido valerénico
<i>V. officinalis</i>	<i>Valeriana officinalis</i> L.
VMAT2	Transportador vesicular de monoamina tipo 2

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson es la segunda neurodegeneración más común, la cual se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra*. Esta pérdida lleva al desequilibrio en los niveles de dopamina, afectando la función motora. La pérdida de las neuronas dopaminérgicas se debe a diversos mecanismos moleculares como lo son mutaciones de proteínas y afectación de proteosoma que conllevan a la acumulación de agregados de α -sinucleína, daño mitocondrial, estrés oxidativo, fallo sináptico y procesos neuroinflamatorios. El proceso inflamatorio cerebral es importante en la enfermedad de Parkinson, debido a que el exceso de éste, es dañino para las neuronas dopaminérgicas. Se ha observado que el ácido valerénico, constituyente de los extractos de *Valeriana Officinalis*, posee propiedades neuroprotectoras, antioxidantes y moduladoras en el sistema inmunológico, lo cual lo posiciona como un compuesto químico con posible efecto modulador del proceso inflamatorio en la enfermedad de Parkinson. El objetivo de este trabajo fue la determinación del efecto del ácido valerénico sobre la neuroinflamación en un modelo de Parkinson inducido en ratón. Las metodologías que se implementaron fueron las pruebas motoras de caminata en viga, fuerza de agarre en rejilla y campo abierto. Se cuantificaron por prueba de ELISA las citocinas proinflamatorias; la presencia y cantidad de las proteínas TH+ y GFAP se evaluaron por inmunofluorescencia y *Western blot*, respectivamente; y, se hizo la evaluación por acoplamiento molecular de la unión del ácido valerénico, a su posible blanco, el receptor 5-HT_{5A}. Finalmente, se determinó que el ácido valerénico tiene efecto anti-neuroinflamatorio, esto podría ser mediante la activación de la vía del receptor 5-HT_{5A} en astrocitos y también por la inhibición de la vía NF- κ B. De tal forma que el ácido valerénico podría ser usado en la atenuación de la progresión de la enfermedad.

(Palabras clave: Enfermedad de Parkinson, neuroinflamación, ácido valerénico, *V. officinalis*)

ABSTRACT

Parkinson's disease is the second most common neurodegeneration, characterized by *substantia nigra* dopaminergic neurons loss, leading to an imbalance in dopamine levels, which in turn affects the motor function. The loss of dopaminergic neurons is due to different molecular mechanisms such as protein mutations and proteasome dysfunction, leading to the accumulation of α -synuclein aggregates, mitochondrial damage, oxidative stress, synaptic failure and neuroinflammatory processes. Brain inflammatory process is important in Parkinson's disease, because it is through this process that defense mechanisms against α -synuclein aggregates and waste processes are carried out. Valerenic acid, a constituent of *Valeriana officinalis* extracts, is a compound that has been found to possess neuroprotective properties, as antioxidant and modulates the immune system, which makes it a possible treatment in modulating the effects of the inflammatory processes in Parkinson's disease. The objective of this work was the determination of the effect of valerenic acid on neuroinflammation in a mouse-induced Parkinson's model. The methodologies that were implemented were the motor tests of beam walking, grip hanging test, and open field. Proinflammatory cytokines were evaluated by ELISA. The presence and amount of TH+ and GFAP proteins was assessed by immunofluorescence and *Western blot* respectively, and the molecular coupling evaluation of the binding of the valerenic acid to its possible target 5-HT_{5A} receptor was performed. Finally, valerenic acid was found to have anti-neuroinflammatory and neuroprotective effects, possibly by inhibiting NF- κ B and activating the 5-HT_{5A} receptor on astrocytes.

(Key words: Parkinson disease, neuro-inflammation, valerenic acid, *V. officinalis*)

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es el principal desorden neurodegenerativo de movimiento, que afecta de 1 a 2% de la población mayor de 65 años. Se caracteriza clínicamente por temblor en reposo, movimientos involuntarios, rigidez e inestabilidad de la postura, así como trastornos no motores (sueño, depresión, ansiedad, cognición, entre otros). Patológicamente, se caracteriza por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra pars compacta* (SNpc).

En cuanto a la etiología de la EP, se han propuesto diversos mecanismos, incluyendo la liberación excesiva de radicales libres de oxígeno durante la descomposición de la dopamina, la alteración de la función mitocondrial, la pérdida de soporte trófico, la perturbación de la homeostasis del calcio, la disfunción de la acción del proteosoma en la degradación de proteínas y la neuroinflamación. La neuroinflamación ha demostrado ser un mecanismo importante en la progresión de la EP. Las respuestas inflamatorias se manifiestan por reacciones gliales, la infiltración de células T (CD4⁺ y CD8⁺), aumento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias, así como otros mediadores tóxicos derivados de células gliales activadas, los cuales son reconocidos actualmente como características prominentes de la EP. Además, estudios recientes sugieren la implicación de los productos proteicos de genes característicos de la enfermedad de Parkinson (genes: SNCA, LRRK2, PARKIN, DJ-1, PINK1, entre otros) en la respuesta inmunológica innata. El control de los procesos inflamatorios en la EP previene el daño mitocondrial en las neuronas dopaminérgicas, atenuando el proceso apoptótico. Las cualidades antioxidantes y neuroprotectoras del ácido valerénico y el extracto de *Valeriana officinalis* en otras enfermedades, así como ensayos *in vitro*, prometen un efecto benéfico neuroprotector a través de su efecto anti-neuroinflamatorio en la EP.

2. JUSTIFICACIÓN

El daño neuronal y la apoptosis de las neuronas dopaminérgicas en la EP tienen como mecanismo molecular en común, el desarrollo del proceso neuroinflamatorio exacerbado. Este proceso se presenta a raíz de la activación de la glía por el reconocimiento de proteínas mal plegadas, por ejemplo, la α -sinucleína. El control del proceso inflamatorio en la enfermedad de Parkinson previene el daño mitocondrial en neuronas dopaminérgicas, con lo cual el proceso apoptótico se ve atenuado, proporcionando un equilibrio en los niveles de dopamina, debido a la prevención de la muerte neuronal dopaminérgica en la *sustancia nigra pars compacta* (SNpc). Las cualidades antioxidantes y neuroprotectoras de los extractos de valeriana, así como uno de sus constituyentes, el ácido valerénico, prometen un efecto benéfico en la neurodegeneración mediante su actividad anti-inflamatoria en la EP. Por lo tanto, el presente proyecto contempló la evaluación del efecto anti-neuroinflamatorio y la posible vía de acción del ácido valerénico, el constituyente químico característico de *Valeriana officinalis*.

3. ANTECEDENTES

3.1. Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común relacionada con la edad y el desorden neurológico motor más común y complejo. Se caracteriza por la neurodegeneración y la muerte temprana de neuronas dopaminérgicas de la SNpc, la cual se encuentra en la zona del mesencéfalo (Figura 1) (Kalia y Lang, 2015). El resultado de la deficiencia de la presencia de dopamina en los ganglios basales (estriado), conduce a un

desorden de movimientos caracterizado por los síntomas motores parkinsonianos clásicos y síntomas no motores que se desarrollan posteriormente, y que se asocian con la reducción en la calidad de la salud y la esperanza de vida de los pacientes (Rodríguez-Oroz *et al.*, 2009; Duncan *et al.*, 2014).

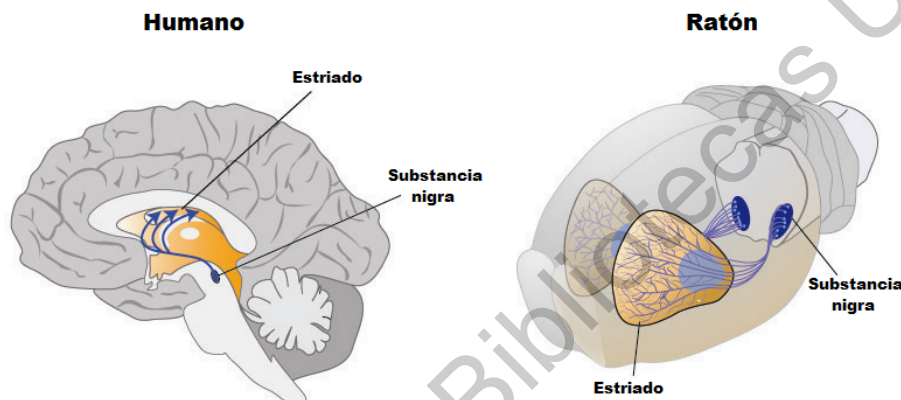


Figura 1. Anatomía de la *sustancia nigra* en cerebro humano y de ratón (Kramer *et al.*, 2008).

El área más afectada es la SNpc en el nivel ventrolateral, que contiene neuronas que proyectan hacia el putamen dorsal del estriado. En diversos estudios clínicos, se ha observado que la pérdida neuronal dopaminérgica de moderada a severa podría estar relacionada con los síntomas motores, como bradicinesia y en particular rigidez, en el avance de la EP (Grosset y Lees, 2005). La forma monogénica de la enfermedad se determina por la identificación de la proteína α -sinucleína, transcrita del gen SNCA. Las mutaciones presentes en la α -sinucleína la vuelven insoluble y con ello la formación de agregados en forma de inclusiones intracelulares dentro del cuerpo de la célula (cuerpos de Lewy), y en los procesos – dendritas y axón - de las neuronas dopaminérgicas (neuritas Lewy) (Braak *et al.*, 2003). Los agregados de α -sinucleína afectan las sinapsis de las neuronas dopaminérgicas y producen daño mitocondrial mediante la inhibición del complejo I; así mismo, activan la microglía, la cual entra en un

desbalance por un exceso de activación, produciendo la muerte neuronal dopaminérgica (Dickson *et al.*, 2009; Goedert *et al.*, 2012).

Se ha planteado que la patología de los cuerpos de Lewy progresa en un patrón estereotipado durante el transcurso de la EP. De acuerdo con Braak *et al.* (2003), se han propuesto 6 etapas, que comienzan en el sistema nervioso periférico y afectan progresivamente el sistema nervioso central en dirección caudal-rostral dentro del cerebro (Figura 2).

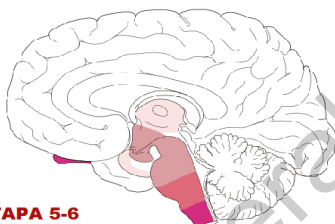
ETAPA 1-2



Etapa 1
Sistema nervioso periférico (neuronas autonómicas), sistema olfatorio (bulbo olfatorio, núcleo olfatorio anterior), medula (núcleo motor dorsal del nervio vago y nervio glossofaríngeo).

Etapa 2
Puente de Varolio (locus coeruleus, porciones magnocelulares de formación reticular, núcleo de raphe posterior), materia gris de la medula espinal.

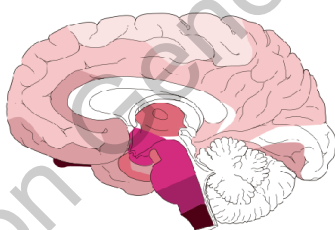
ETAPA 3-4



Etapa 3
Puente de Varolio (núcleos pedunculopontino), mesencéfalo (sustancia nigra pars compacta), prosencéfalo basal (núcleo magnocelular incluidos núcleos basales de Meynert), sistema límbico (subnúcleos central de la amígdala).

Etapa 4
Sistema límbico (accesorio cortical y núcleo basolateral de la amígdala, núcleos intersticiales de la estría terminalis, ventral claustrum), tálamo (núcleo intralaminar), corteza temporal (mesocorteza anteromedial temporal, región CA2 del hipocampo).

ETAPA 5-6



Etapa 5 y 6
Múltiples regiones corticales (corteza insular, áreas asociación cortical, área cortical primaria).

Figura 2. Patología de Lewy en la enfermedad de Parkinson (modificado de Braak *et al.*, 2003).

Sin embargo, la patología de la EP es mucho más compleja que la neurodegeneración causada por la patología de los cuerpos de Lewy. En primera instancia, la α -sinucleína forma una diversidad de agregados, incluidas pequeñas estructuras de puntos delgados similares a modo de hilo, depósitos presinápticos muy finos, y oligómeros solubles compuestos de 2 a 100

monómeros. Estos agregados de α -sinucleína, por tanto, desempeñan un papel importante en la neurodegeneración en la EP; particularmente, ciertas formas oligoméricas de α -sinucleína mal plegadas podrían ser tóxicas para las neuronas, debido a que forman agregados proteicos dentro de la neurona dopaminérgica, que si no son degradados, generaran estrés oxidativo, lo que conlleva a la neurona a apoptosis. Los agregados de α -sinucleína se ven a menudo en los cerebros *post mortem* de pacientes que padecieron EP (Schulz-Schaeffer, 2010; Cremades *et al.*, 2012, Kalia *et al.*, 2013).

Por otro lado, se ha documentado la ausencia de la patología de Lewy en la mayoría de pacientes con EP que cuentan con la presencia del gen PARKINA mutado, y en una menor proporción en pacientes con mutaciones en el gen LRRK2. Dichas observaciones sugieren que todas las formas alternativas de agregados de α -sinucleína distintas a los cuerpos de Lewy, así como inclusiones que contienen proteínas distintas de α -sinucleína, son características importantes de la patología en la EP (Doherty *et al.*, 2014; Kalia *et al.*, 2015).

Otro proceso importante en la patología de la EP es la neuroinflamación. Se ha observado respuesta inflamatoria (presencia de astrocitos y microglía) en cerebros con la EP. Dentro de las etapas de neurodegeneración en la EP, se produce gliosis, resultante de la activación de astrocitos y microgliosis, en la activación microglial. Dichos procesos pueden desencadenar la liberación de factores tróficos, como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), además de citocinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno. El desbalance de estos procesos puede resultar en un efecto perjudicial para las neuronas (Tansey y Goldberg, 2010; Phani *et al.*, 2012).

3.1.1. Epidemiología

La EP es el trastorno de movimiento más común y el segundo más frecuente de las enfermedades neurodegenerativas después de la enfermedad de Alzheimer. De acuerdo con el Concilio Europeo de Cerebro (2011), se estima que existen 6.3 millones de personas en el mundo que sufren de la EP sin discriminar entre razas o culturas, con una media de inicio de alrededor de los 60 años. Se estima la EP afecta al 0.3% de la población mundial total y de 1 a 2% en personas mayores a 60 años de edad en todo el mundo (Alves *et al.*, 2008; Ávila-Cobo, 2012).

La prevalencia de la EP se verá aumentada debido al aumento poblacional, factores de riesgo y esperanza de vida media; con ello se espera que en los próximos 20 años el número de individuos con la EP por lo menos se duplique en la población mundial, de acuerdo con las estimaciones poblacionales de 2018 (Figura 3).

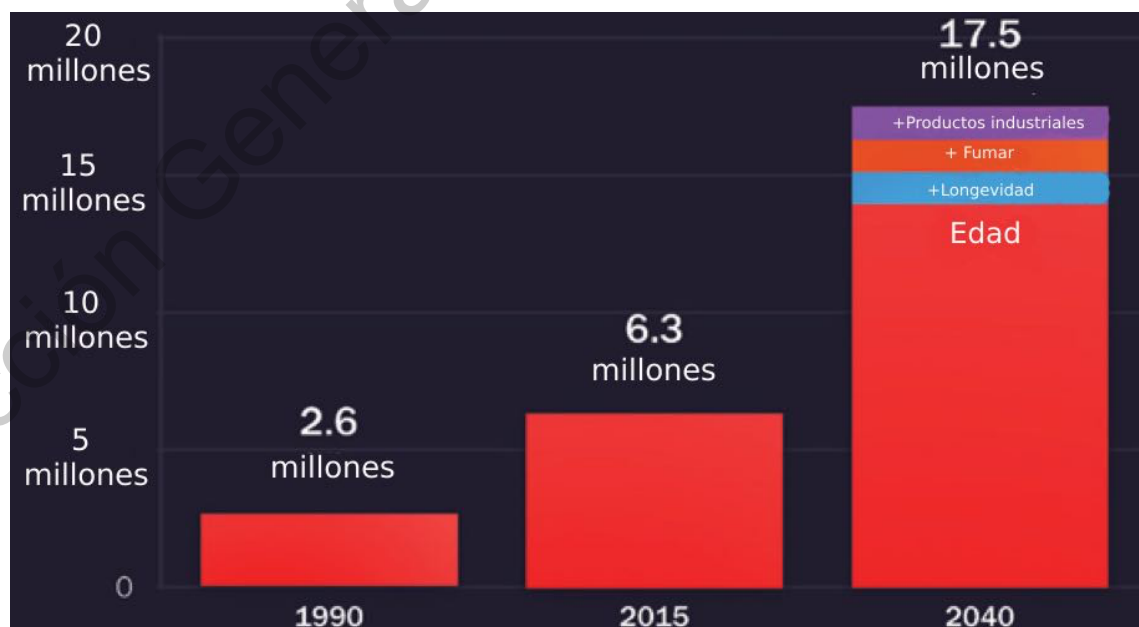


Figura 3. Proyección del número de individuos afectados por la enfermedad de Parkinson para 2040 a nivel mundial (modificado de Dorsey *et al.*, 2018).

La deficiencia en la disponibilidad de marcadores biológicos que identifiquen la EP, es una parte fundamental en la realización de los estudios epidemiológicos, esto, aunado a la correcta aplicación de los criterios de diagnóstico. En México, de acuerdo con la Secretaría de Salud, existen más de 500 mil pacientes con EP y se estima que para el año 2020, esta cifra se duplique (Dorsey *et al.*, 2018; Bach *et al.*, 2011).

Debido a que la EP suele aparecer en la vida adulta, puede observarse mayor incidencia en los países desarrollados, donde las personas viven más tiempo. La mayoría de los estudios de prevalencia basados en la población europea muestra una prevalencia bruta de 100 a 200 por cada 100,000 habitantes. La EP podría ser menos común en personas de raza negra y asiáticas que en las personas blancas. Sin embargo, los resultados son contradictorios e informan que las diferencias podrían deberse a las tasas de respuesta, supervivencia y estilo de vida, que están relacionados con los factores de riesgo (edad, etnicismo, mutaciones genéticas, exposición a pesticidas, entre otros) y protectores hacia la EP (consumo de café, uso de anti-inflamatorios, entre otros). De esta forma, la enfermedad está directamente relacionada con la edad y raramente se presenta antes de los 50 años, sólo en casos hereditarios, aumentando la prevalencia hasta en 4% en los grupos de mayor edad. La relación de prevalencia en hombres y mujeres es de 3:1, aunque conforme aumentan los años en dichos grupos no se encuentran diferencias. Esta relación de prevalencia puede atribuirse a los efectos neuroprotectores de los estrógenos (de Lau y Breteler, 2006; Ávila-Cobo, 2012).

3.1.2. Características clínicas

La evaluación de la función motora es usada para el diagnóstico clásico de la EP, denominando estos síntomas como parkinsonianos, los cuales contemplan acinesia o bradicinesia, rigidez muscular, temblor en reposo e inestabilidad de la postura, condiciones que están relacionadas con una disfunción del sistema

motor (Figura 4) (Rodríguez-Oroz *et al.*, 2009; Dexter y Jenner, 2013). Entre otras características motoras, se incluyen la marcha y los cambios de postura que se manifiestan como festinación, pasos con arrastre de los pies con la postura flexionada al caminar, problemas en el habla y micrografía (Jankovic, 2008).

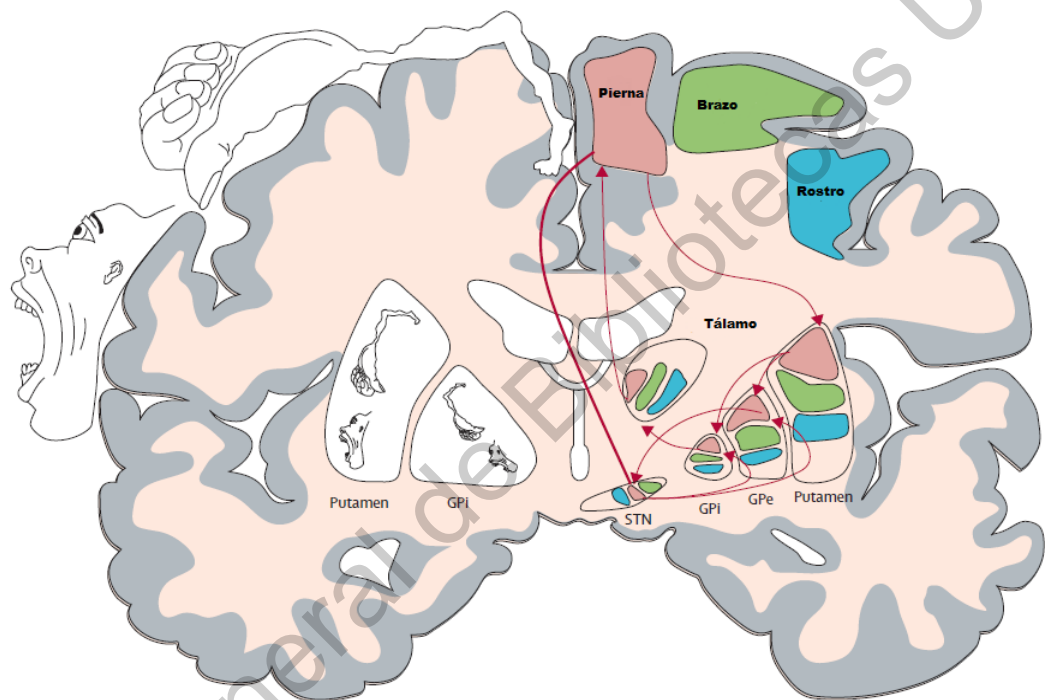


Figura 4. Circuito motor (indicado por las flechas rojas que conectan las regiones que modulan movimientos de las piernas, brazos y el rostro). Abreviaciones: GPE, globo pálido externo; GPI, globo pálido interno; STN, núcleo subtalámico (modificado de Obeso *et al.*, 2008).

Los síntomas no motores (SNM) incluyen la disfunción olfatoria, deterioro cognitivo leve, síntomas psiquiátricos, desórdenes de sueño, disfunción autonómica, dolor, ansiedad y fatiga. Por otra parte, los SNM crean la mayor demanda en cuanto a recursos clínicos, debido al mal diagnóstico y tratamiento, a pesar de ser el principal determinante de la evolución y que puede estar relacionado en gran medida con la patología fuera de la deficiencia de dopamina en ganglios basales; los SNM son poco investigados a diferencia de la disfunción

motora. En el Cuadro 1 se enlistan las características clínicas más frecuentes asociadas a la EP (Chaudhuri y Schapira 2009; Kalia y Lang, 2015).

Cuadro 1. Síntomas de la enfermedad de Parkinson (Jankovic, 2008).

Síntomas motores	Síntomas no motores
Temblores en reposo, bradicinesia, rigidez, inestabilidad postural.	Deterioro cognitivo leve, bradifrenia, fenómeno de la punta de la lengua.
Hipomimia, disartria, disfagia, sialorrea.	Depresión, apatía, ansiedad, anhedonia, fatiga, otros comportamientos y problemas psiquiátricos.
Disminución de giro del brazo, caminar arrastrando los pies, festinación, hiperactividad.	Síntomas sensoriales: anosmia, ageusia, dolor (hombros y espalda), parestesias.
Micrografía y actividades lentas de la vida cotidiana.	Disautonomía (ortostática, hipotensión, estreñimiento, disfunción urinaria y sexual, sudoración anormal, seborrea), pérdida de peso.
Reflejo glabellar, distonias, deformidad del cuerpo estriado, escoliosis	Desórdenes del sueño (desorden de comportamiento REM, sueños vívidos, somnolencia de día, fragmentación del sueño, síndrome de piernas inquietas).

La fase pre-motora o prodromal de la enfermedad se caracteriza por el deterioro del olfato, estreñimiento, depresión, somnolencia diurna excesiva, y el trastorno de conducta del sueño de movimientos oculares rápidos (REM) (Jankovic, 2008). De hecho, los trastornos del estado de ánimo y el estreñimiento se ha demostrado que aumentan el doble de riesgo del individuo de desarrollar posteriormente la EP. La fase pre-motora puede prolongarse; por ejemplo, la media de latencia entre el inicio de las alteraciones del REM y la aparición de los síntomas motores parkinsonianos es 12 a 14 años (Kalia y Lang, 2015). Se presume que el proceso patológico que causa la enfermedad de Parkinson se pone en marcha durante la fase pre-motora, involucrando regiones del sistema nervioso central y periférico además de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Por ello, el desarrollo y progresión de la sintomatología clínica en la EP es muy importante y determinante para el diagnóstico (Figura 5) (Postuma *et al.*, 2012).

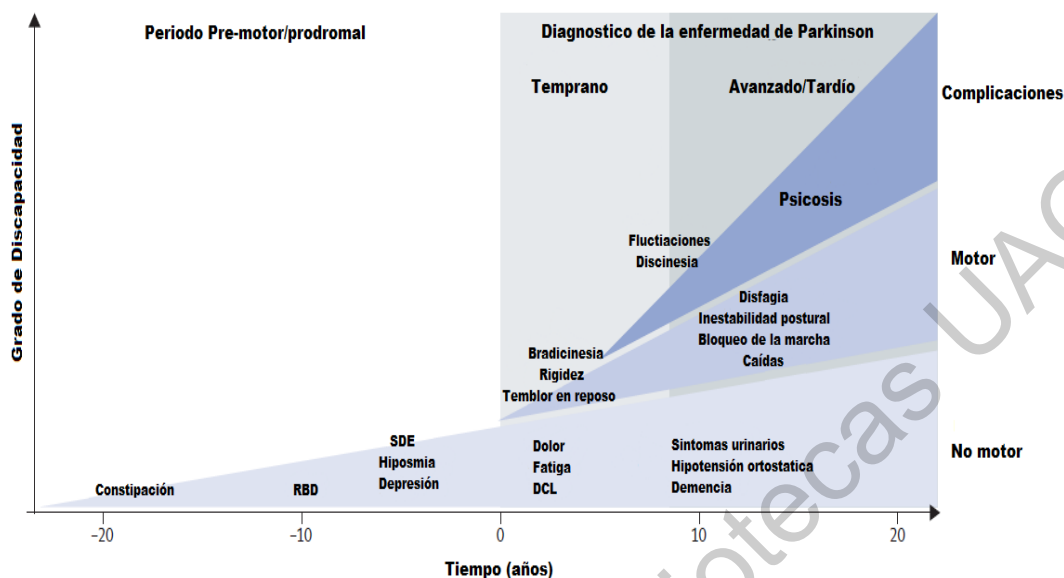


Figura 5. Síntomas clínicos y curso de tiempo de la progresión de la enfermedad de Parkinson. Modificado de Kalia y Lang, 2015.

3.1.3. Diagnóstico de la enfermedad de Parkinson

En la EP, la sintomatología y degeneración neuronal se presentan respectivamente de forma gradual y paulatina, desencadenándose de forma lenta cada uno de los síntomas. Por ello, el diagnóstico de la EP no se puede llevar a cabo sin la detección inequívoca primeramente de bradicinesia, para evitar la fácil confusión de los síntomas que conlleven a un mal diagnóstico, por la presencia de trastorno depresivo, fatiga, síntomas y signos de la disfunción autonómica, la alteración del sueño y síntomas motores. Sin embargo, el progreso de la enfermedad conduce directamente a la sintomatología motora de la EP (Cuadro 1) (Braak *et al.*, 2003; Lees *et al.*, 2009).

La bradicinesia es el síntoma más incapacitante de la EP, debido a que desencadena problemas motores en la vida diaria del paciente, repercutiendo en su calidad de vida. La incapacidad por bradicinesia corresponde a la lentitud de los movimientos voluntarios simples y complejos, resultado de la anormalidad en el sistema neuronal motor. La forma de evaluación de este síntoma se lleva a cabo tocando rápidamente el pie del paciente y pidiéndole caminar. La

evaluación clínica más adecuada es pedir al paciente realizar la escritura o dibujar espirales para determinar a través de parámetros establecidos la afectación motriz (Lees *et al.*, 2009; Otero-Cerdeira, 2012).

El diagnóstico para la EP puede establecerse a partir de trastornos como la rigidez en las articulaciones distales, debido al incremento del tono muscular en el movimiento pasivo que está presente en todos los ángulos, generalmente presentada después de realizar la función motora. Dicho proceso afecta principalmente los músculos flexores y los extensores, tanto en los miembros como en el tronco; la presencia de rigidez en las articulaciones proximales y el tronco predicen un mal pronóstico para los pacientes con la EP (Lees *et al.*, 2009).

La EP también se caracteriza por temblor lento en reposo en las manos (4-6 Hz de frecuencia), este síntoma es generalmente el primero que el paciente notifica, debido a que está presente hasta en el 69% de los casos al momento del diagnóstico y 75% en cualquier otro momento del curso evolutivo de la enfermedad. Dicho temblor se presenta de forma oscilatoria y rítmica, afectando una o varias partes del cuerpo, evidente en manos y dedos, en forma de “cuenta monedas o pildoreo”. Éste síntoma se presenta, aunque el paciente se mantenga en movimiento, al igual que otros temblores, se incrementa en estados de estrés o estados emocionales diversos. El temblor en reposo, por lo tanto, representa un síntoma más benigno, en comparación con la bradicinesia, debido a que es menos incapacitante y su impacto se refleja en las actividades cotidianas (Grosset y Lees, 2005; Otero-Cerdeira, 2012).

El diagnóstico clínico de la EP está enfocado en identificar tres síntomas cardinales que respondan adecuadamente al tratamiento con Levodopa (L-dopa), considerando la bradicinesia, la rigidez y el temblor en reposo como parte de la patología de conexiones de estructuras de ganglios basales, sin descartar que los trastornos motores en pacientes con EP avanzada son fundamentales

de la patología de estructuras no dopaminérgicas. Los síntomas, como inestabilidad postural, alteración del lenguaje, trastorno de la marcha, rigidez axial en los miembros, ausencia de temblor en reposo, disfunción anatómica y escasa respuesta a la L-dopa, deberían generar un análisis sobre un posible diagnóstico de parkinsonismo no idiopático (Katzenschlager *et al.*, 2003; Olanow *et al.*, 2009). El diagnóstico en el paciente con EP se basa en la evaluación clínica después de la realización de un interrogatorio de la evolución y las características de los síntomas en el tiempo, mediante escalas que permiten tener un diagnóstico certero (Cuadro 2).

Cuadro 2. Criterios clínicos para el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson (Samii *et al.*, 2004).

Posible

Uno de los siguientes factores:

- Temblor de reposo asimétrico (4 a 6 Hz).
- Rigidez asimétrica.
- Bradicinesia asimétrica.

Probable

Dos de los siguientes factores:

- Temblor de reposo asimétrico.
- Rigidez asimétrica.
- Bradicinesia simétrica.

Definida

Criterios de probabilidad junto con respuesta al tratamiento anti-parkinsoniano.

Criterios de exclusión:

- Exposición a fármacos que pueden generar la enfermedad de Parkinson.
- Signos cerebelosos.
- Signos del tracto córticoespinal.
- Anormalidades de movimientos oculares.
- Disautonomía severa.
- Alteraciones en la marcha en forma temprana.
- Historia de encefalitis o daño recurrente de cabeza (pugilístico).
- Enfermedad severa subcortical, hidrocefalia u otras alteraciones visibles en la imagen por resonancia magnética.

De esta forma, el análisis para el diagnóstico de la EP se realiza sobre la historia de la evolución de los síntomas del paciente. Además de los datos clínicos en el momento del interrogatorio, el paciente que presenta bradicinesia y los síntomas citados previamente, definirán en un 88% de posibilidad de presentar EP. En ausencia de estos síntomas tendrá un 9% de probabilidad de padecer la enfermedad (Otero-Cerdeira, 2012).

3.1.4. Factores de riesgo

La edad es el factor más grande de predisposición para el desarrollo de la EP (con casos de aparición en jóvenes que pueden formar una población de pacientes diferente por Parkinson de tipo familiar), con ello se incrementa la prevalencia y la incidencia de forma exponencial, teniendo un pico después de los 80 años de edad (Kempster *et al.*, 2010; Pringsheim *et al.*, 2014).

El género es un factor de riesgo establecido, con una relación hombre-mujer de 3:1. Sin embargo, la pérdida de la producción de estrógenos en mujeres debido al periodo menopaúsico elimina el posible efecto protector; además, la menopausia precoz, la histerectomía y la extirpación de los ovarios aumentan el riesgo de EP en mujeres (Popat *et al.*, 2005). El etnicismo es también un factor de riesgo importante, debido a que se ha observado en un estudio poblacional en Estados Unidos de Norteamérica (EE.UU.), que la incidencia aumenta en personas de origen étnico hispano, seguido por personas de raza blanca no hispanas, asiáticos y finalmente personas de raza negra (Van Den Eeden, 2003).

Las causas genéticas cada vez son más comunes, debido a que pueden representarse en un 40% de las personas en situación de riesgo en poblaciones autosómicas dominantes, recesivas con susceptibilidad de genes, asociados a la historia familiar de EP y temblor en reposo. La evidencia más convincente se tuvo con el descubrimiento de formas monogénicas de la EP (Cuadro 3) (Hardy, 2010; Noyce *et al.*, 2012).

Cuadro 3. Formas monogénicas de la enfermedad de Parkinson (Modificado de Hardy, 2010).

Proteína		Mutaciones patogénicas
Autosómica Dominante		
SNCA	α -Sinucleína	Mutaciones sin sentido (A18T, A29S, A30P, E46K, H50Q, G51D, A53E, A53T); multiplicaciones (duplicaciones, triplicados).
LRRK2	Cinasa 2 rica en repeticiones de leucina	Mutaciones sin sentido (I1371V, N1437H, R1441C, R1441G, R1441H, Y1699C, G2019S [más común], I2020T).
VPS35	Proteína vacuolar clasificación 35	Mutación sin sentido (D620N.)
EIF4G1	Factor de iniciación de la traducción eucariótica 4- γ -1	Mutaciones sin sentido (R1205His, A502V).
DNAJC13	Endocitosis mediada por el receptor 8 (REM 8)	Mutación sin sentido (N855S)
CHCHD2	Dominio que contiene espiral-bobina-hélice-espiral-bobina-hélice tipo 2	Mutaciones sin sentido (T61I, R145Q), alteración del sitio de empalme
Autosómica Recesiva		
Parkina	Parkina	Reordenamientos del exón incluyendo supresiones o multiplicaciones, pequeñas deleciones o inserciones, alteraciones en sitio de empalme.
PINK1	Cinasa putativa inducida por PTEN 1	
DJ-1	DJ-1	

Por otra parte, la exposición a diversas sustancias químicas aumenta el riesgo de EP. Entre estas sustancias se encuentra principalmente la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinal (MPTP), la cual causa toxicidad en las neuronas dopaminérgicas. Además, diversos pesticidas tienen la habilidad de conjugarse estructuralmente, como el paraquat, herbicida comercial que es capaz de destruir las neuronas dopaminérgicas en roedores e inclusive en

humanos, incrementando de esta forma el riesgo de desarrollo de EP. La rotenona, pesticida utilizado por jardineros, también funciona de la misma forma que el paraquat, sin embargo, no hay casos humanos reportados (Tanner *et al.*, 2012).

Otras causas incluyen solventes industriales como *n*-hexano y metanol; intoxicación por monóxido de carbono, sulfuro de hidrógeno y manganeso, que desencadenan la degeneración de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales y características distónicas en el caso de personas soldadoras (Kenborg *et al.*, 2012).

3.1.5. Factores protectores

El humo de tabaco, beber café, el uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y bloqueadores de los canales de calcio son factores ambientales que están asociados a la disminución del desarrollo de la EP (Noyce *et al.*, 2012; Kalia y Lang, 2015).

La efectiva reducción de la incidencia en la EP por fumar está documentada y es atribuida a la nicotina durante la fase prodromal de la EP. La nicotina es inmediatamente el candidato de la acción neuroprotectora por su acción como agonista nicotínico α -7 (Kalia y Lang, 2015); además, se ha observado que dichos receptores sufren daño en el modelo MPTP de la EP en monos, y que, al ser tratados con L-dopa, por ello los receptores nicotínicos α -7 tienen un papel importante (Morissette *et al.*, 2016). Por otra parte, otro mecanismo involucrado al fumar es la disminución de la actividad de la monoamina oxidasa B (MAO-B) en el cerebro. Sin embargo, los cigarrillos contienen más de 4,000 componentes que favorecen el desarrollo de cáncer de pulmón, lo cual tiene daños colaterales para los pacientes con EP (Quik *et al.*, 2009).

Por otro lado, consumo de cafeína parece tener un efecto protector contra el desarrollo de EP, en mayor medida en hombres que en mujeres. Esto debido a que se ha demostrado que la cafeína ejerce su efecto neuroprotector sobre modelos experimentales de EP, a través de la participación de la vía del receptor adenosina A2a (Chen *et al.*, 2001; Palacios *et al.*, 2012).

3.2. Mecanismos moleculares de la enfermedad de Parkinson

A nivel celular, la EP está relacionada con el exceso en la producción de ROS, las cuales desencadenan alteraciones en el metabolismo de las catecolaminas, específicamente de la dopamina, modificaciones en la función del cambio del transportador de la cadena de electrones mitocondrial o un mayor depósito de hierro en la SNpc. El fallo del proceso celular normal puede deberse a la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas por el envejecimiento (Schapira y Jenner, 2011; Rodríguez *et al.*, 2014). La forma familiar de la EP implica mutaciones asociadas a varios genes, disfunción mitocondrial, neuroinflamación y factores ambientales que incrementan considerablemente la susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas en la EP, y son características de las dos formas de la enfermedad, la esporádica y la familiar (Figura 6) (Ryan *et al.*, 2015).

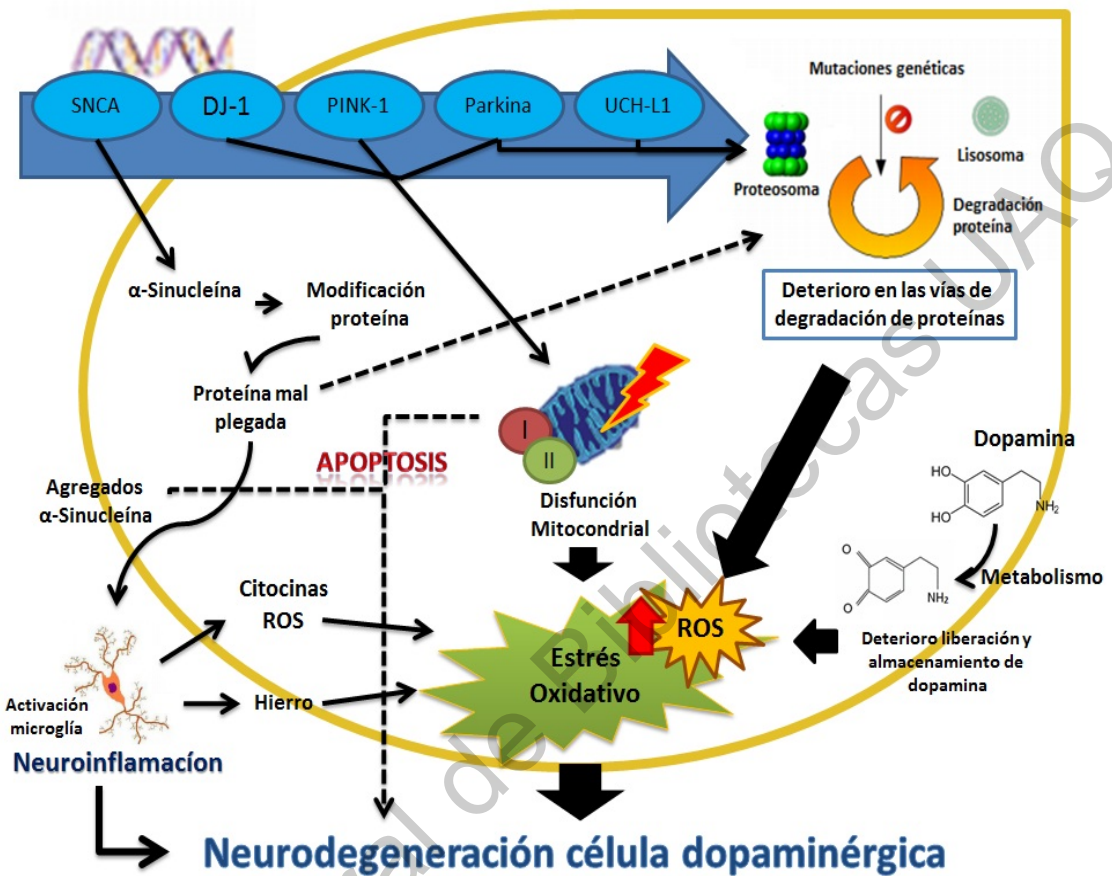


Figura 6. Mecanismos moleculares que contribuyen a la neurodegeneración dopaminérgica de la enfermedad de Parkinson (Dexter y Jenner, 2013; Blesa *et al.*, 2015).

3.2.1. Falla sináptica en el metabolismo de dopamina

La degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc sugiere que la propia dopamina podría ser una fuente de estrés oxidativo (Segura-Aguilar *et al.*, 2014). La dopamina se sintetiza a partir de la tirosina por la tirosina hidroxilasa (TH) y la descarboxilasa de aminoácido L-aromático. Después de esta, la dopamina es almacenada en vesículas sinápticas para posteriormente ser recapturada por el transportador vesicular de monoamina tipo 2 (VMAT2). Sin embargo, un exceso en los niveles de dopamina citosólica, la cual está

relacionada con la alta concentración de neuromelanina en las neuronas de la *sustancia nigra*, no podrá ser capturada en las vesículas sinápticas y la excesiva dopamina es metabolizada por la MAO o por la auto-oxidación por ROS citotóxicas, causando daño a la neurona dopaminérgica, lo cual contribuirá a la activación de la neuroinflamación en la neuroglía (Figura 7) (Zucca *et al.*, 2014).

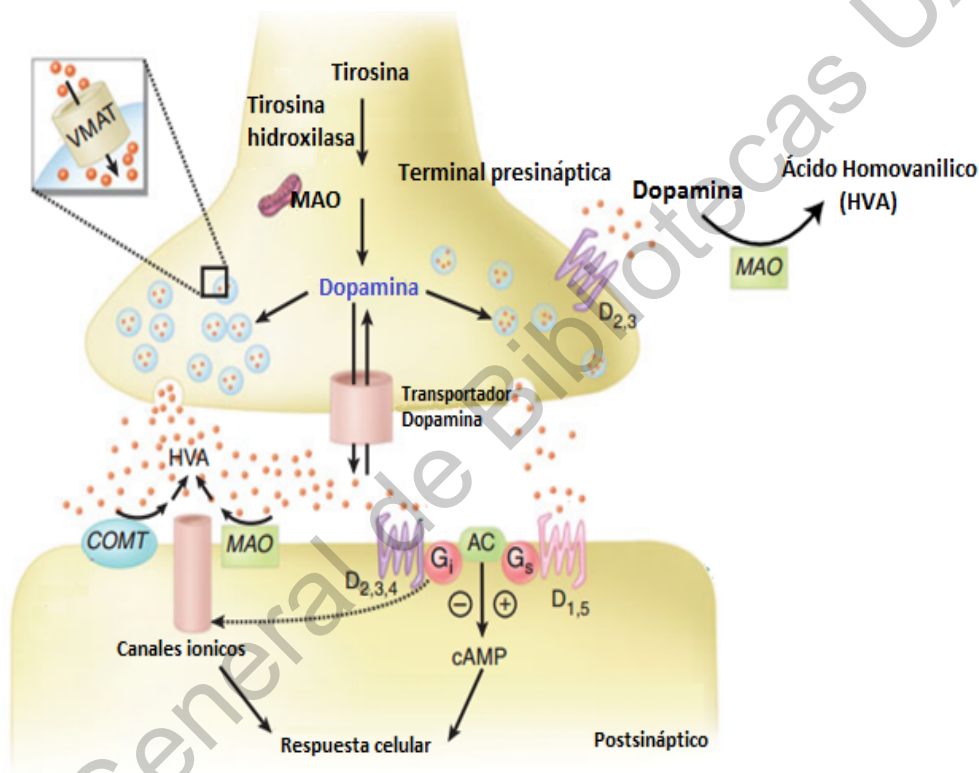


Figura 7. Modelo de la sinapsis dopaminérgica. Modificado de Nestler *et al.*, 2009. MAO; enzima monoamina oxidasa, D_{2,3}; receptores dopaminérgicos tipo dos y tres, COMT; enzima catecol-O-metiltransferasa.

Estos procesos oxidativos alteran la respiración mitocondrial e inducen cambios en la permeabilidad de los poros de transición mitocondrial de las neuronas. También, la auto-oxidación de la dopamina produce dopamina quinona con deficiencia de electrones o dopamina semiquinona. La dopamina quinona puede inducir mutaciones en las proteínas relacionadas con la EP, tales como la α -sinucleína, la parkina, el DJ-1, la superóxido dismutasa 2 (SOD-2); lo anterior se observa por la inactivación del transportador de dopamina y la enzima TH, así

como la disfunción mitocondrial por alteraciones y disfunción de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (Blesa *et al.*, 2015).

Por lo tanto, el aumento de dopamina en el estriado elevará los niveles de oxidación dopaminérgica, lo cual degenera proporcionalmente las terminales dopaminérgicas. Esto se ha observado recientemente en un modelo de ratones transgénicos en los cuales se incrementan los niveles de dopamina y del transportador de dopamina, resultando en daño oxidativo, pérdida neuronal y déficit motor (Masoud *et al.*, 2015).

3.2.2. Agregados de α -sinucleína

La α -sinucleína es una proteína de 140 aminoácidos abundante en las terminales nerviosas presinápticas; es capaz de unirse a lípidos a través de su parte amino-terminal cuando se multimeriza y se convierte en una estructura α -helicoidal. También puede auto ensamblarse a través de dicha región, donde forma un núcleo de filamentos de hojas-beta en la estructura de la proteína α -sinucleína (Bendor *et al.*, 2013). En las terminales nerviosas, la α -sinucleína se une externamente a la superficie de las vesículas sinápticas, uniéndose a la membrana para estar en equilibrio con la forma citosólica, jugando un papel sobre la neurotransmisión de dopamina. En las terminales presinápticas, la unión de membrana de las vesículas sinápticas es inhibida por la agregación de α -sinucleína (Burré *et al.*, 2015).

El incremento de los niveles de α -sinucleína se deriva del catabolismo defectuoso por parte de los lisosomas y los proteosomas en las neuronas dopaminérgicas. Dicho incremento promueve una autoagregación proteica, interfiriendo con la función proteosomal y lisosomal, lo que subsecuentemente genera una mayor agregación de la α -sinucleína, por lo tanto, una deficiente limpieza de los sistemas (Dexter y Jenner, 2013). Además, la acumulación de α -sinucleína genera la redistribución de las proteínas de anclaje SNAP-25,

sintaxina 1 y sinaptobrevina 2, con la reducción de la exocitosis y la subsecuente limitación subsecuente de dopamina liberada en la hendidura sináptica. También, en el sistema nervioso conlleva a un proceso inflamatorio y de estrés oxidativo que culminará en la apoptosis (Figura 6) (Zúñiga-Ramírez, 2012).

3.2.3. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es parte fundamental en los procesos relacionados con la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la EP. Dicho estrés es generado por el incremento potencial en la generación de radicales libres, marcadores expresados en la peroxidación lipídica (malondialdehído, hidroperóxidos lipídicos, 4-hidroxinonenal y productos finales de la glicación avanzada), oxidación de proteínas, y oxidación del ADN (8-hidroxiguanosina) en la SNpc. En la EP se ha observado una correlación negativa entre los niveles de urato en plasma y la progresión de la enfermedad, debido a la alteración de la actividad antioxidante, lo cual es reflejo de la disminución de los niveles de glutatión reducido (con cambios en la catalasa y glutatión peroxidasa) (Ascherio *et al.*, 2009; Cipriani *et al.*, 2010).

El origen del estrés oxidativo en las neuronas dopaminérgicas sigue en disputa, determinando fuentes neuronales y gliales, pero las causas más probables son el incremento en la formación de radicales libres procedentes de las mitocondrias e inclusive de retículo endoplásmico, alterado por la acumulación de hierro en la SNpc, cambios en la actividad de los canales de calcio, alteración de la proteólisis (proteosomal y lisosomal), cambios en la agregación de la proteína α -sinucleína, y la presencia de mutaciones en proteínas (ejemplo, DJ-1 y parkina) (Surmeier, 2007; Schapira y Jenner, 2011; Zúñiga-Ramírez, 2012).

3.2.4. Alteración de la función mitocondrial

El daño mitocondrial está estrechamente relacionado con el incremento de la formación de ROS en la EP. Esto sucede como consecuencia del mecanismo de fosforilación oxidativa, que es un mecanismo que suministra energía para la actividad neuronal, a través de mecanismos propios de las mitocondrias, enzimas y la misma energía liberada por la oxidación de nutrientes para la formación de adenosín trifosfato (ATP). Consecuentemente, esta vía metabólica contribuye a la formación del anión superóxido y peróxido de hidrógeno, los cuales llevan a la propagación de radicales libres que contribuirán a la patología (Hall *et al.*, 2012).

Las deficiencias del complejo I de la cadena respiratoria contribuyen mayormente en la generación de apoptosis y es considerada una de las principales fuentes de ROS en la EP. Por lo tanto, la inhibición del complejo I resultará en el aumento de la producción de ROS, los cuales pueden seguir inhibiendo el complejo I. Esta disminución de la actividad del complejo I en SNpc de los pacientes con EP esporádica ya ha sido previamente descrita (Hattingen *et al.*, 2009).

Además, la disfunción mitocondrial está relacionada con el estrés oxidativo y el daño de las neuronas dopaminérgicas por mutaciones de genes como el SNCA, la parkina, el DJ-1 o el PINK1, asociados a la EP (Figura 6) (Zuo y Motherwell, 2013). La Parkina y el PINK1 están localizados en la mitocondria y sus funciones están estrechamente relacionadas con su función correcta. El PINK1 se acumula en la membrana externa de la mitocondria causando un daño y reclutando Parkina para la disfunción de la mitocondria. En humanos, se ha observado que mutaciones en el gen Parkina ocasiona daño mitocondrial por el desacople del complejo I (Müftüoğlu *et al.*, 2004; Pickrell y Youle, 2015).

Por su parte, la acumulación de la α -sinucleína en las neuronas dopaminérgicas reduce la actividad mitocondrial del complejo I, elevando la producción de ROS que conlleva a la muerte de la célula. El estrés oxidativo promovido por la acumulación y oligomerización extracelular de α -sinucleína en oligodendrocitos y la inducción de modificaciones postranscripcionales de α -sinucleína pueden incrementar la toxicidad de las neuronas dopaminérgicas (Pukass y Richter-Landsberg, 2014).

Las mutaciones en el gen DJ-1 son otra causa de la EP familiar. De manera normal, este gen es capaz de unirse a las subunidades del complejo I mitocondrial y regular su actividad. Sin embargo, una porción de la proteína DJ-1 está entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembranal, y su translocación hacia la mitocondria es estimulada por el estrés oxidativo (Hayashi *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que el DJ-1 está involucrado en la respuesta del estrés oxidativo que lleva a la regulación positiva del proteosoma, inhibiendo su actividad, así como el rescate de proteínas parcialmente plegadas hacia la degradación (Moscovitz *et al.*, 2015). El sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) es el encargado de depurar las proteínas agregadas y mal plegadas, que son altamente tóxicas y capaces de inducir la muerte neuronal. La autofagia lisosomal es otro sistema que complementa dichas acciones de aclaramiento de los productos tóxicos celulares. Estos dos sistemas pueden incurrir en la falla por la presencia defectuosa de la proteína Parkina aunada a la PINK-1 deficiente (Xie *et al.*, 2010).

3.2.5. Neuroinflamación

El cambio inflamatorio en el cerebro en la EP comienza con la microglía HLA-positiva activada en SNpc. Posteriormente, se han encontrado una serie de alteraciones en las citocinas como la interleucina 1 α (IL-1 α), IL-1 β y el factor de

necrosis tumoral α (TNF- α), en el cerebro y el fluido cerebroespinal de pacientes con EP. Además, se ha observado en cerebros *post mortem* de pacientes con EP la presencia de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), lo que indica que tuvieron activación de la microglía durante la enfermedad. La iNOS es una fuente de óxido nítrico (NO), que a su vez puede reaccionar con el superóxido de la glía o fuentes neuronales para la formación de peroxinitrito altamente reactivo. Esto puede nitrar proteínas y otras biomoléculas presentes en la SNpc en la EP (Dexter y Jenner, 2013). Sin embargo, existe evidencia emergente que indica que la respuesta inflamatoria sostenida por la infiltración de células T (CD4⁺ y CD8⁺) y la activación glial, son características comunes en la EP en humanos y modelos animales de la EP; ambos tienen un rol importante en la degeneración de neuronas dopaminérgicas. La microglía es uno de los mayores tipos celulares que están relacionados con la respuesta inflamatoria del sistema nervioso central. Esto ha sido comprobado mediante estudios realizados con tomografías por emisión de positrones (PET), observando la presencia de la microglía en varias regiones del cerebro de pacientes con EP (Bartels *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015).

Por otro lado, se ha propuesto que la activación de la microglía puede ser beneficiosa, por lo menos en la fase temprana del proceso de neurodegeneración. Por ejemplo, se ha demostrado que la supresión de *Jmjd3*, que es esencial para polarización de la microglía M2, en la *sustancia nigra in vivo* provoca sobreactivación microglial y muerte exacerbada de neuronas dopaminérgicas en un modelo de EP animal, lo que indica un papel protector de la microglía M2 en este proceso (Moehle y West, 2015). Sin embargo, a largo plazo la sobreactivación de la microglía en el cerebro de pacientes con EP regula la expresión de un gran grupo de citocinas pro-inflamatorias incluyendo TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ , que contribuyen a la aceleración de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas nigrales (Tang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015).

Además, proteínas como la α -sinucleína, Parkina, LRRK2 y DJ-1 se ha reportado que son capaces de llevar a cabo la activación de la microglía. La α -sinucleína liberada extracelularmente de las células neuronales funciona como un agonista endógeno de los receptores tipo Toll 2, los cuales activan respuestas inflamatorias en la microglía. La expresión de DJ-1 es regulada en los astrocitos reactivos en pacientes con EP. Debido a que DJ-1 regula negativamente las respuestas inflamatorias de los astrocitos y la microglía, facilitando la interacción entre STAT1 y su fosfatasa SHP-1. De tal forma, que las funciones anormales de la glía son críticas en las mutaciones en la EP, por que incrementan la vulnerabilidad de la degeneración de la SNpc relacionada con la inflamación (Blesa *et al.*, 2015).

3.2.5.1. Respuesta celular inmune

En el cerebro, el proceso inflamatorio se lleva a cabo por la acumulación de células inflamatorias de la microglía y mediadores inflamatorios como interleucinas. Los estudios de los procesos inflamatorios crónicos que participan en la EP han determinado que la microglía y los astrocitos tienen un papel importante en la aparición de la inflamación. Se han identificado niveles excesivos de activación microglial en la SNpc de pacientes con EP y los niveles de expresión de iNOS, un importante mediador de estrés oxidativo, se ven incrementados. La iNOS se co-localiza con la activación y la multiplicación de las células de la microglía, lo que implica que induce la regulación positiva de proteínas y aumenta los niveles de producción de nitrotirosina. La inducción de citocinas proinflamatorias del sistema inmunológico, tales como citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-1 inducen la expresión de iNOS agravando la lesión neuronal dopaminérgica inducida por el NO. Posteriormente, citocinas proinflamatorias aceleran la activación de la microglía y su infiltración a través de la barrera hematoencefálica, lo que conduce a la activación en mayor proporción de microglía y macrófagos perivasculares residentes, resultando en una respuesta inflamatoria crónica. Cuando esta respuesta inflamatoria persiste, puede causar

la progresión de la EP (Figura 8) (Taylor *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015).

Por su parte, los astrocitos son mediadores importantes en la homeostasis del medio ambiente extracelular de las neuronas, su papel en el cerebro puede ser protector o perjudicial ya que tiene roles vitales en los procesos neuroinflamatorios en la EP. También pueden inhibir el estrés oxidativo, prevenir el daño mitocondrial y producir factores neurotróficos. Los astrocitos tienen un efecto protector sobre las neuronas dopaminérgicas mediante el aumento de los niveles de expresión de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) y glutatión peroxidasa. La alta expresión de GFAP resulta en cambios estructurales y funcionales específicos. Sin embargo, activan el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB) de astrocitos reactivos en la SNpc, lo cual puede conducir a la pérdida de neuronas dopaminérgicas, esto en una sinergia con la activación de la microglía (Figura 8) (Taylor *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015).

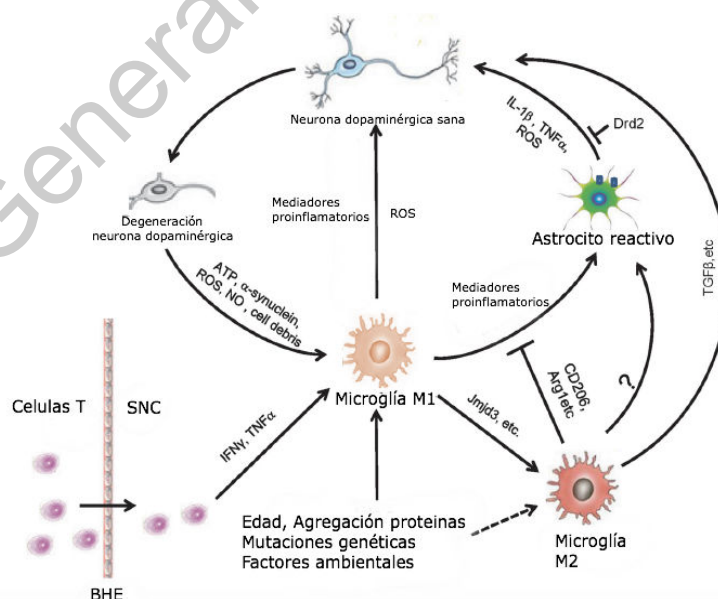


Figura 8. Mecanismo inflamatorio en la enfermedad de Parkinson. Modificado de Wang *et al.*, 2015. Abreviaciones: BHE, Barrera hemato-encefálica; SNC, Sistema nervioso central; ROS, Especies reactivas de oxígeno; Arg1, arginasa 1; CD206, Receptor de manosa.

3.3. Tratamientos para la enfermedad de Parkinson

La EP solo es tratada en la sintomatología motora y no motora. El objetivo importante en la investigación de la EP es el poder desarrollar e implementar fármacos y/o terapias que logren modificar la enfermedad, con el fin de detener o retrasar el proceso neurodegenerativo. Las causas del desarrollo de la EP son heterogéneas, las cuales se deben a múltiples procesos celulares, implicados de forma variable en la neurodegeneración. Por lo tanto, la estrategia más eficiente es la de orientar las vías moleculares disfuncionales de pacientes específicos, para llevar a cabo un tratamiento con varios medicamentos específicos. Los blancos farmacológicos potenciales para lograr la modificación de la EP incluyen la neuroinflamación, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo, la actividad de los canales de calcio, la actividad de las cinasas LRRK2, así como la acumulación y agregación de α -sinucleína (AIDakheel *et al.*, 2014; Tran *et al.*, 2014). Potencialmente se utilizan intervenciones quirúrgicas incluyendo la terapia dirigida a genes, trasplante de células y la estimulación cerebral profunda de núcleo subtalámico (Coune *et al.*, 2012; Bjorklund y Kordower, 2013; Charles *et al.*, 2014).

Los fármacos dirigidos al aumento de las concentraciones de dopamina intracerebral, o que se encargan de estimular los receptores dopaminérgicos siguen siendo los principales fármacos de elección para el tratamiento de los síntomas motores. Estos fármacos incluyen el uso de agonistas de la dopamina como la L-dopa, inhibidores de la MAO-B y, en menor frecuencia, la amantadina. El uso de este tipo de terapia no es neuroprotector o modificador de la enfermedad. Por lo tanto, el tratamiento debe iniciarse cuando los síntomas motores causan incapacidad o incomodidad en el paciente con EP, con el objetivo de mejorar la calidad de vida. La terapia con agonistas dopaminérgicos e inhibidores de la MAO-B son sumamente benéficos para la sintomatología de bradicinesia y rigidez; sin embargo, para síntomas más graves o la discapacidad

progresiva, es necesaria la administración de L-dopa (Cuadro 4) (Connolly y Lang, 2014).

Cuadro 4. Tratamientos farmacológicos para síntomas motores de la enfermedad de Parkinson (modificado de Connolly y Lang, 2014).

	Tratamiento de síntomas motores		Tratamiento de complicaciones motoras	
	Monoterapia	Adjunto con Levodopa	Fluctuaciones	Discinesia
Levodopa				
L-dopa/Carbidopa	+	..	+	-
L-dopa/benserazida	+	..	+	-
Agonistas dopamina (no-línea ergotamina)				
Apomorfina	-	+	+	-
Piribedil	+	+	-	-
Pramipexol	+	+	+	-
Ropinirol	+	+	+	-
Rotigotina	+	+	+	-
Agonistas dopamina (ergotamina)				
Bromocriptina	+	+	+	-
Cabergolina	+	+	+	-
Inhibidor MAO-B				
Rasagilina	+	+	+	-
Selegilina	+	-2	-2	-
Inhibidor COMT				
Entacapona	..	+	+	-
Tolcapona	..	+	+	-
Otros				
Amantadina	+	+	-	+
Anticolinérgicos	+‡	+‡	-	-
Clozapina	+‡	+‡	-	+

Abreviaciones: L-dopa, Levodopa; MAO-B, Monoamino oxidasa tipo B; COMT, Catecol-O-metiltransferasa; +: eficiente o muy eficiente; -: no eficiente; ..: no aplica; †: incluye benztropina, etopropazina, trihexifenidil y otros; ‡: tratamiento del temblor en reposo; 2: Insuficiente evidencia, pero en la práctica es eficiente.

Todos estos fármacos disponibles para el tratamiento de los síntomas motores de la EP actúan mediante complejas interacciones neurológicas en el cuerpo estriado que afectan la actividad motora. Esta interacción está designada por la

convergencia de aferentes dopaminérgicas desde la *sustancia nigra*, aferentes glutamatérgicas de la corteza cerebral y el tálamo, e interneuronas colinérgicas estriatales, para influir sobre la actividad de las neuronas GABAérgicas espinosas medianas, neuronas eferentes principales del estriado. Para que la L-dopa lleve a cabo su acción, ésta es transportada desde la circulación periférica a través de la barrera hematoencefálica y centralmente en la *sustancia nigra*, es convertida a dopamina, reemplazando el neurotransmisor deficiente en la EP.

Para garantizar la presencia de la L-dopa en la *sustancia nigra*, en la circulación periférica, son utilizados inhibidores de la dopamina descarboxilasa (DDCIs), los cuales bloquean la conversión de L-dopa a dopamina, e inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) que evitan su degradación a 3-O-metildopa (3-OMD). Por su parte, en el estriado la L-dopa, los agonistas de la dopamina y los inhibidores de la MAO-B tienen efectos dopaminérgicos. Además, los fármacos anticolinérgicos y la amantadina actúan sobre los receptores postsinápticos para la liberación de otros neurotransmisores en el estriado. Estos neurotransmisores se unen y activan múltiples subtipos de receptores diferentes presentes en las neuronas aferentes presinápticas del estriado, así como las neuronas espinosas medianas eferentes postsinápticas (Figura 9) (Connolly y Lang, 2014).

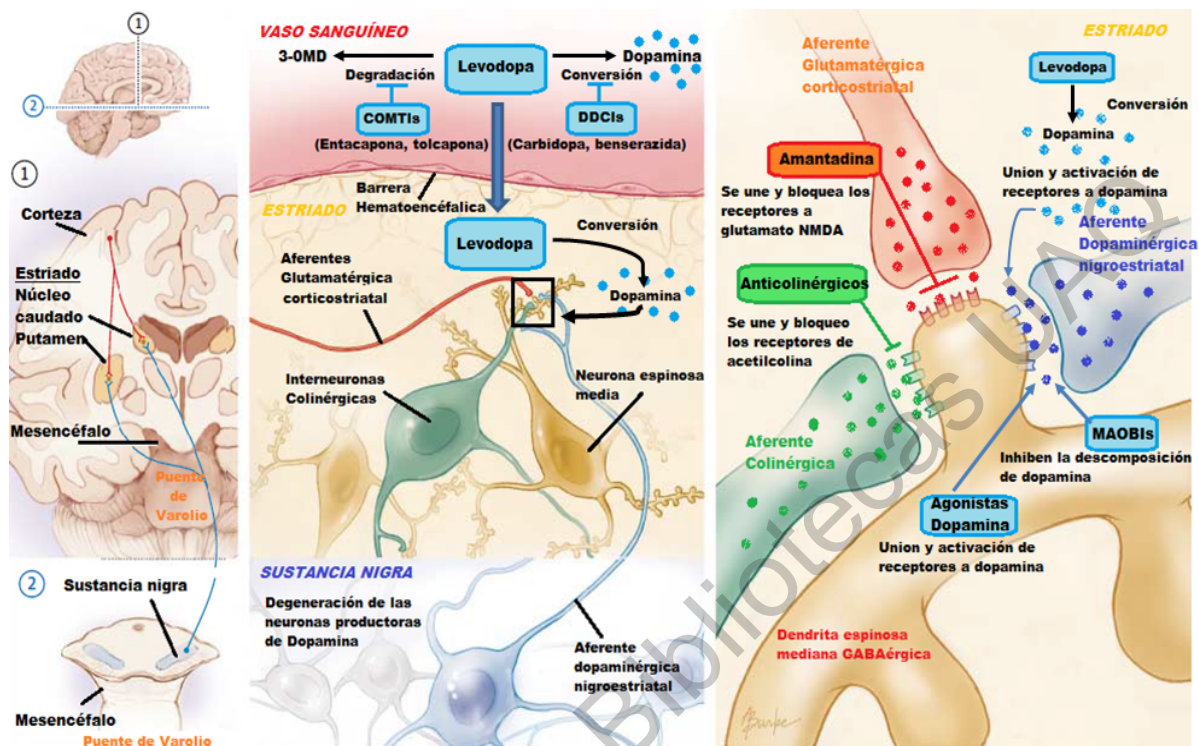


Figura 9. Sitios de acción de los fármacos para el tratamiento de los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson. Modificado de Connolly y Lang, 2014.

La limitación de los tratamientos es a menudo para los síntomas no motores, disminuyendo las opciones de tratamiento y respuesta. Sin embargo, en la clínica existen una variedad de tratamientos disponibles capaces de controlar de forma eficaz o mejorar la discapacidad de los síntomas no motores, como psiquiátricos, trastornos del sueño, disfunción autonómica, depresión, ansiedad y fatiga entre otras. La depresión en la EP generalmente es el síntoma no motor más importante, que es tratado con antidepresivos tricíclicos, específicamente clorhidrato de desipramina y nortriptilina. En la práctica clínica se usa inhibidores de la recaptura de serotonina, como el citalopram, escitalopram, fluoxetina, paroxetina y sertralina. Los fármacos utilizados para el tratamiento de los síntomas no motores se enlistan en el Cuadro 5 (Seppi *et al.*, 2011; Connolly y Lang, 2014).

Cuadro 5. Tratamientos farmacológicos para los síntomas no motores de la enfermedad de Parkinson.

Síntoma	Clase de fármaco	Nombre del fármaco
Deterioro cognitivo		
Demencia	Inhibidor acetilcolinesterasa	Rivastigmina
Síntomas psiquiátricos		
Depresión	Agonistas de dopamina	Pramipexol
	SSRI	Citalopram, fluoxetina, paroxetina, sertralina
	SNRI	Venlafaxina
	Antidepresivo tricíclico	Clorhidrato de desipramina, nortriptilina
Psicosis	Antipsicótico atípico	Clozapina, quetiapina
	Inhibidor acetilcolinesterasa	Rivastigmina
Desórdenes del sueño		
Trastorno de conducta del sueño REM	Benzodiacepina	Clonazepam
	Hormona	Melatonina
Disfunción autonómica		
Constipación	Laxativo osmótico	Polietileno glicol
	Activador canal de cloro	Lubiprostona
Motilidad gastrointestinal	Antagonista dopamina	Domperidona
Hipotensión ortostática	Antagonista dopamina	Domperidona
	Mineralcorticoide	Fludrocortisona
	Vasopresor	Midodrina
	Inhibidor acetilcolinesterasa	Piridostigmina
	Prodroga de norepinefrina	Droxidopa
Sialorrea	Anticolinérgico	Atropina, glicopirrolato
	Neurotóxica	Toxina botulínica A, B
Otros		
Fatiga	Estimulante	Metilfenidato, modafinil

Los tratamientos actuales son carentes y deficientes, por lo cual es importante la búsqueda de nuevas terapias preventivas o correctivas de la EP.

3.4. Ácido valerénico, sesquiterpeno de la *Valeriana officinalis* L.

La *Valeriana officinalis* L. (*V. officinalis*) es una planta perteneciente a la familia de las *Valerianaceae* (Figura 10). En la medicina tradicional, regularmente se utilizan los órganos subterráneos (rizomas, raíces y estolones) de la planta, para el tratamiento de estados neurotóxicos, como casos de ansiedad, trastornos de sueño y como anticonvulsivo (Villar del Fresno y Carretero-Accame, 2001; Hadley y Petry, 2003).



Figura 10. *Valeriana officinalis* L.

Dentro de la composición química de la raíz de la *V. officinalis* se incluyen principalmente sesquiterpenos e iridoides, todos de composición terpénica. Los sesquiterpenos son oxigenados de tipo cetónico (valeranona), alcoholes

(valerianol, alcohol kesílico), ésteres (éster del valerianol), aldehídos (valerenal) y ácidos (valerénico (Figura 11), acetoxivalerénico e hidroxivalerénico) (Villar del Fresno y Carretero-Accame, 2001). Sin embargo, la disponibilidad de estos compuestos depende del período estacional del cultivo y/o lugar de recolección de la planta (Bos *et al.*, 1998).

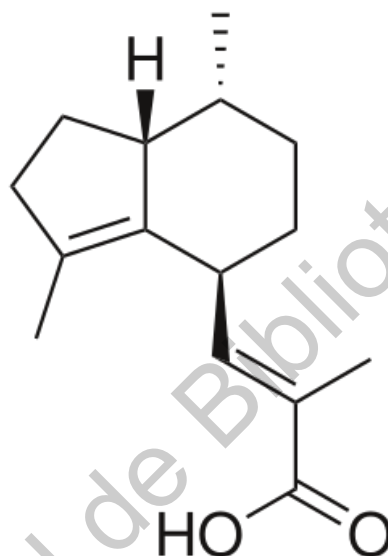


Figura 11. Estructura del ácido valerénico

Los extractos de la raíz de la *V. officinalis* se han usado por siglos en la medicina tradicional para trastornos del sueño y ansiedad principalmente. Sin embargo, recientemente, se determinó su efecto neuroprotector en patologías cerebrales como Alzheimer (Malva *et al.*, 2004) e isquemia cerebral (Yoo *et al.*, 2015) y EP. En ensayos *in vitro* en modelos de la EP, se observó efecto citoprotector en células SH-SY5Y de neuroblastoma, inducidas a las características de la enfermedad con rotenona (Oliveria *et al.*, 2009). En otro modelo de EP de rotenona inducido en *Drosophila melanogaster* se observó disminución del efecto de la rotenona para la inducción del modelo, restableciendo los niveles del ARNm de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), y aumentando los niveles del gen de la tirosina hidroxilasa (TH), así como el incremento en la viabilidad de las moscas (Sudati *et al.*, 2013). Por último, se ha

observado un efecto benéfico del extracto de raíz de *V. officinalis* mediante sus propiedades GABAérgicas y antioxidantes, disminuyendo las alteraciones del movimiento de masticación inducido en ratas con reserpina (Pereira *et al.*, 2011).

Además, los extractos de la *V. officinalis* han presentado actividad antioxidante *in vitro* a través de la disminución de la peroxidación lipídica en la corteza cerebral y de la degradación de la desoxirribosa, en cerebros de ratas expuestos *in vitro* a agentes pro-oxidantes (Sudati *et al.*, 2009). El efecto del extracto podría estar relacionado con la presencia de ácido valerénico, toda vez que se ha evaluado su concentración en los extractos etanólicos. El ácido valerénico y los extractos de valeriana han tenido efecto en la disminución de moléculas neurotóxicas como la D-galactosa, la cual en ratas reduce la memoria, proliferación celular, diferenciación de neuroblastos, los niveles de corticosterona y la peroxidación lipídica (Nam *et al.*, 2013).

Dichos efectos podrían estar ligados a la combinación de sesquiterpenos presentes en el aceite volátil, los cuales se conforman de los ácidos: valerénico, acetoxivalerénico e hidroxivalerénico, a los cuales se les ha atribuido un efecto tranquilizante, sedativo, espasmolítico y relajante muscular (Birnbaum *et al.*, 1978; Boyadzhiev *et al.*, 2004). Por otro lado, también se piensa que el ácido valerénico podría tener efecto anti-inflamatorio, esto debido a su capacidad de inhibición de la vía de NF- κ B (Jacobo-Herrera *et al.*, 2006). Los efectos del ácido valerénico están mediados a través de la activación de diversos receptores de tipo GABAérgicos, glutamato y serotoninérgicos 5-HT_{2B} y 5-HT_{5A} (Dietz *et al.*, 2005; Khom *et al.*, 2010; Del Valle-Mojica *et al.*, 2011).

El efecto del ácido valerénico en el receptor 5-HT_{5A} ocurre mediante su activación en astrocitos. Al ser un receptor acoplado a una proteína G inhibitoria, inhibiría el proceso de gliosis en dichas células, evitando la progresión de la neuroinflamación. Además es un receptor que se relaciona con la vía de señalización de NF- κ B (Jacobo-Herrera *et al.*, 2006; Miyazaki y Asanuma, 2016).

4. HIPÓTESIS

El ácido valerénico disminuye el proceso neuroinflamatorio en un modelo de enfermedad de Parkinson inducido en ratón, mediante la activación del receptor 5-HT_{5A}.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Determinar el efecto del ácido valerénico en la modulación del estado inflamatorio en un modelo de enfermedad de Parkinson inducido en ratón.

5.2. Objetivos Específicos

- Implementar el modelo de enfermedad de Parkinson por inyección intraperitoneal de MPTP en ratón para evaluar el efecto del ácido valerénico sobre la función motora.
- Evaluar la presencia de neuronas dopaminérgicas (TH+) y astrocitos (GFAP) en mesencéfalo por inmunohistoquímica.
- Cuantificar las proteínas TH+ y GFAP mediante *Western blot*.
- Evaluar los cambios en las concentraciones de IL-1, IL-6, IFN- γ y TNF- α por técnica de ELISA.
- Determinar los cambios poblacionales de leucocitos periféricos mediante citometría de flujo.
- Estudiar las interacciones del ácido valerénico y el receptor serotoninérgico 5-HT_{5A} por análisis de acoplamiento molecular.

6. METODOLOGÍA

6.1. Equipos y reactivos

6.1.1. Equipos

- Aparato de campo abierto (60 x 60 cm)
- Aparato para prueba de caminata sobre viga (1 metro)
- Pantalla de alambre para fuerza de agarre (40 x 40 cm)
- Aparato para evaluación de fuerza en toma de alimento
- Equipo de disección
- Criostato (Leica CM1850)
- Ultra Turrax
- Espectrofotómetro
- Lector de ELISA BioRad 680
- Citómetro de flujo FACS Verse™
- Microscopio confocal Zeiss LSM 700

6.1.2. Reactivos

- Etanol 70%
- Metanol grado HPLC
- Ácido valerénico
- Neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP)
- Pentobarbital sódico
- Paraformaldehído 4%
- Sacarosa 30%
- Amortiguador de fosfatos (PBS)
- Anticuerpo policlonal anti-TH+
- Anticuerpo anti-GFAP
- Anticuerpos Alexa fluor 488 y 568
- Albúmina sérica bovina (BSA)
- Inhibidor de proteasas
- Revelador de placas fotográficas
- Fijador de placas fotográficas
- Placas hipersensibles a la luz
- Reactivo de Bradford
- Medio de cultivo RPMI
- Kit's para ELISA para IL-1, IL-6, IFN- γ y TNF- α (PeproTech®)

6.2. Animales y tratamientos

Se utilizaron ratones macho de las cepas C57BL/6J y CD-1, de 8 a 10 semanas de edad (peso de 25-30 g), los cuales se mantuvieron en ciclos luz/oscuridad 12/12 h a 21 ± 2 °C con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Los ratones C57BL/6 son los más utilizados en investigación; corresponden a una cepa endogámica con homogeneidad genética establecida (subcepas comunes: C57BL/6J – Jackson Laboratory y C57BL/6N-NIH); por otro lado, los ratones CD-1 corresponden a un stock (exogámico), representando variabilidad genética y menor sensibilidad a MPTP (Hsieh et al., 2017; Carreras et al., 2019; Wang et al., 2019). La implementación del modelo de la EP en ratones se realizó mediante la inyección intraperitoneal de MPTP (Sigma Aldrich, USA) con una dosis al día de 30 mg/kg, durante 7 días. Se suministró ácido valerénico (Sigma Aldrich, USA) para el pre-tratamiento, a una dosis de 2 mg/kg de peso de ratón. Ambos tratamientos se suministraron vía intraperitoneal, en su caso, aplicando primero el tratamiento de ácido valerénico y después de 8 h administrando el MPTP. Los ratones se dividieron en 4 grupos por cada cepa, cada grupo con 8 ratones C57BL/6J o 10 ratones CD-1, dos ratones más para CD-1 debido a su mayor variabilidad genética. Se trabajaron los siguientes grupos: 1: control de ratones sanos, 2: ratones tratados con MPTP, 3: ratones sanos + ácido valerénico (V.A.), 4: pre-tratamiento de ácido valerénico + MPTP (V.A. + MPTP). Los ratones se manejaron de acuerdo con la norma de bioética NOM-062-ZOO-1999, y el protocolo fue aprobado por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la U.A.Q. (58FCN2016).

6.3. Evaluación de la función motora

Los grupos de ratones de ambas cepas se sometieron a un periodo de entrenamiento y adecuación a las pruebas motoras, las cuales se llevaron a cabo tres días antes de los tratamientos, realizando tres veces cada una de las pruebas (caminata sobre viga, campo abierto y fuerza de agarre). Al finalizar los

tratamientos se efectuaron las pruebas para la evaluación de la función motora; estas pruebas se realizaron por triplicado en el mismo día de la evaluación.

6.3.1. Prueba de caminata sobre viga (función neuromuscular)

Se realizó la prueba de caminata sobre viga de acuerdo al aparato de Brooks y Dunnett (2009). El aparato está conformado por dos pedestales, en el primero está la plataforma de salida y en el segundo se ubica la caja hogar del ratón; dichos pedestales están unidos por una viga de madera de 1 m de largo con una inclinación de 15°, con un grosor de 20 mm, 10 cm de alto y 75 cm de altura sobre el suelo (Figura 12). Los animales debían caminar hasta alcanzar su caja hogar desde la parte más baja del aparato. Con un cronómetro se midió el tiempo total en que los animales tardaban en cruzar la viga, registrando a su vez, el número de caídas de alguna pata del animal o si éste presentaba desbalance. Los ratones se sometieron a la prueba para el acondicionamiento durante tres días (tres pruebas por día), antes de implementar el modelo de la enfermedad de Parkinson. Para la evaluación fueron sometidos a la prueba después de la implementación del modelo y de llevar a cabo los diversos tratamientos.

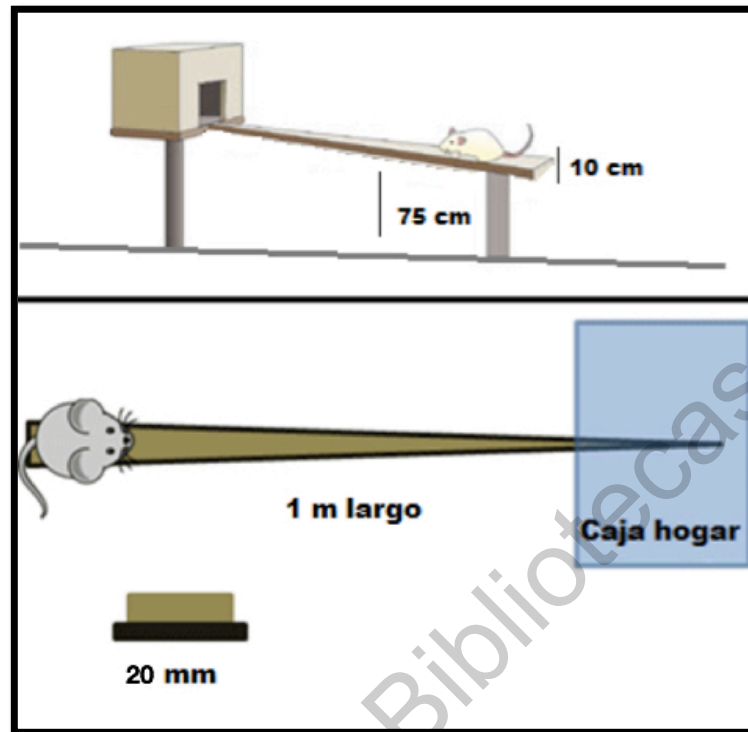


Figura 12. Esquema del aparato de caminata sobre viga.

6.3.2. Prueba de campo abierto (actividad motora en nuevo ambiente)

La prueba proporcionó una evaluación sistemática de la exploración del ambiente, la actividad locomotora en general, y la visualización del comportamiento relacionado con la ansiedad en roedores. Se utilizó un diseño de campo abierto de madera, con una cámara cuadrada de tamaño 60 x 60 cm, paredes con una altura de 30 cm. El campo se dividió en zonas cuadriculadas de igual tamaño de 15 x 15 cm con líneas dibujadas en el suelo del campo, dividiendo como zona basal los 4 cuadrantes centrales con un tamaño total de 30 x 30 cm, y zona exploratoria a los cuadrantes externos. Para el procedimiento se colocaron los ratones uno por uno en el aparato en ensayos separados, colocándolos en el centro del campo. Se evitaron movimientos o ruidos durante la prueba para evitar que esto afectara la sesión. Se evaluó el tiempo activo exploratorio del ratón (cuadrantes externos) y se comparó entre grupos, tomando

un tiempo máximo de evaluación de 5 minutos. Además, se contabilizó el número de levantamientos que realizó el ratón sobre sus patas posteriores sin apoyo en las paredes del aparato, esto para evaluar la fuerza motora y el equilibrio que presentaba el ratón. Al final se realizó la sumatoria de las unidades de actividad para determinar el comportamiento motor de los ratones y el nivel de ansiedad.

6.3.3. Prueba de fuerza de agarre en rejilla (función neuromuscular)

La prueba de fuerza de agarre se realizó con el test de Kondziela's de acuerdo con Deacon (2013). Se fabricó una pantalla invertida, la cual consistió en un marco cuadrado de 40 x 40 cm, con una malla de alambre que consiste en cuadrados de 12.5 mm, con alambre de 1 mm de diámetro (Figura 13). El marco está rodeado por soportes profundos de madera de 4 cm (que evitan que el ratón ocasionalmente intentara subirse o dar vuelta hacia la parte posterior del marco).

Para todas las pruebas que se realizaron, se llevaban a los ratones al cuarto de pruebas de 5 a 20 min antes de su realización para asegurarse que se encontraban adecuadamente activos. Se utilizó como regla general permitir la recuperación de la fuerza muscular entre las repeticiones, colocando a los ratones en la jaula después de cada prueba motora para que descansaran.

El procedimiento fue el siguiente, colocando al ratón en el centro de la pantalla de malla de alambre, se inició el cronómetro, inmediatamente se invirtió la pantalla, realizando un giro de 180°, quedando la cabeza del ratón en declive. Se mantuvo la pantalla en la misma posición, con una altura de 40 a 50 cm por encima de una superficie acolchonada. Se midió el tiempo que tardó el ratón sostenido de la rejilla, hasta un máximo de 90 s para cada prueba. Inmediatamente se anotó el tiempo de permanencia sin caerse, de acuerdo con los valores del Cuadro 6.

Cuadro 6. Valores de evaluación en prueba de fuerza de agarre en rejilla.

Caída del ratón del aparato (segundos)		Valor
Evaluación 1 min máximo	Evaluación 2 min máximo	
1 – 10	1 – 10	1
11 – 25	11 – 25	2
26 - 60	26 – 60	3
Después de 60	61 – 90	4
-----	Después de 90	5

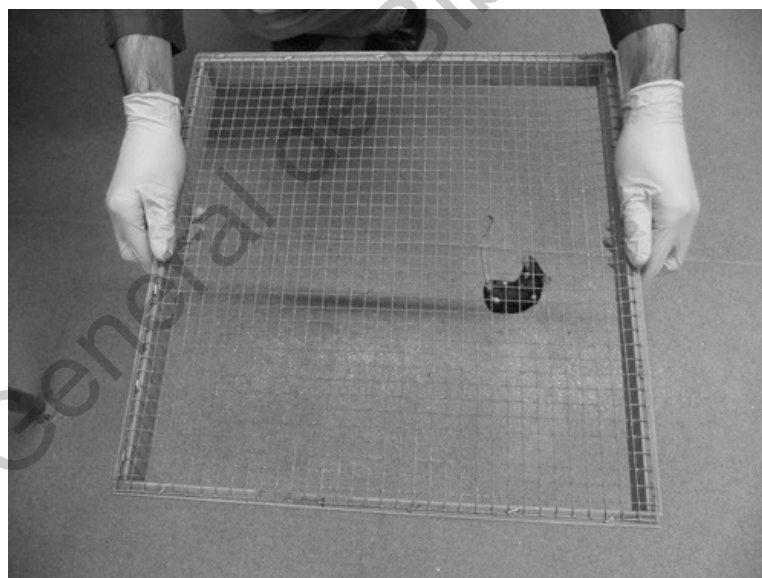


Figura 13. Aparato para realizar la prueba de fuerza de agarre (Deacon, 2013).

6.4. Disección de tejidos

Los animales se sacrificaron 24 h después de haber concluido las pruebas motoras, de acuerdo con los protocolos de bioética (NOM-062-ZOO-1999). Los

ratones se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg/Kg) vía intraperitoneal antes de ser sacrificados.

Los animales que se utilizaron en los ensayos de inmunohistoquímica se perfundieron con paraformaldehído al 4% en PBS, seleccionando 4 ratones por grupo de la cepa C57BL/6J y 5 ratones CD-1. Se llevó a cabo la extracción del encéfalo e inmediatamente se realizó la disección cortando el encéfalo por la mitad y tomando la parte posterior para realizar cortes coronales de la zona del mesencéfalo.

Para las técnicas de *Western blot* y ELISA, los ratones se sacrificaron por decapitación para que los tejidos estuviesen frescos, posteriormente, de los encéfalos se disectaron las áreas de interés, en este caso mesencéfalo, guardando los tejidos a -80 °C para posteriormente llevar a cabo la extracción de proteínas, para estas técnicas se utilizaron 4 ratones.

6.5. Inmunohistoquímica

Para la detección por inmunohistoquímica de las proteínas TH+ y GFAP se utilizó la región del cerebro situada de -2,65 mm a -3,85 mm posterior a bregma.

6.5.1. Fijación y crioprotección de tejidos

El tejido se colocó en paraformaldehído al 4% en PBS, durante 16 h a 4 °C para su post-fijación. Posteriormente, después de haber realizado la fijación, los tejidos se lavaron con PBS tres veces y se colocaron en una solución de sacarosa al 30% en PBS para su crioprotección, durante toda la noche. Después se colocaron en cajas de papel aluminio con medio congelador de tejidos *tissue freezer medium*® y se guardaron a -80 °C hasta su utilización.

6.5.2. Corte de tejidos

Los cortes de cerebro se realizaron en un crióstato (Leica CM1850), de manera coronal plano longitudinal de 15 μm , para después colocarse en laminillas perfectamente identificadas, que se conservaron en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización en la técnica de inmunofluorescencia.

6.5.3. Inmunofluorescencia

Se seleccionaron laminillas de los cortes de mesencéfalo, después se colocaron dentro de una cámara húmeda con tapadera y se les realizaron tres lavados con PBS de 10 min cada uno. Después de cada lavado se desechó el exceso de PBS y se agregó el siguiente lavado, teniendo la precaución de no desprender el tejido de la laminilla.

Al término de los lavados, se le agregó a cada laminilla 300 μl de tratamiento bloqueador de albúmina sérica bovina (BSA) al 3% en PBS, durante 2 h. Se retiró el bloqueo y se hicieron tres lavados con PBS 1X, para proseguir a agregar los anticuerpos primarios anti-tirosina hidroxilasa+ hecho en conejo (Millipore AB152, 1:1000) y anti-GFAP fabricado en ratón (Millipore MAB360, 1:500), dejándose en incubación toda la noche (16 h o más).

Al día siguiente se retiraron los anticuerpos primarios, se realizaron tres lavados con PBS 1X y se les agregó los anticuerpos secundarios Alexa Flour® 568-conjugado anti-conejo IgG producido en burro (Invitrogen A-10042, 1:1500) y CF™ 488-conjugado anti-ratón IgG generado cabra (Sigma SAB4600238, 1:1500), posteriormente se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Después de transcurrido este tiempo se hicieron tres lavados con PBS 1X con el fin de retirar el exceso de anticuerpo. Finalmente, se fijaron los tejidos con una gota de glicerol y se observaron las laminillas en el microscopio confocal de fluorescencia Zeiss LSM-700.

6.6. Extracción y cuantificación de proteínas

6.6.1. Extracción de proteínas

Una vez que se obtuvieron las muestras del encéfalo (mesencéfalo y cuerpo estriado), se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$; posteriormente se les agregó 5 ml de amortiguador de extracción de proteínas totales (50 mM Tris-HCl pH 9.0-9.5) por cada ml de muestra.

La homogenización se llevó a cabo utilizando el equipo ultra Turrax durante 30 s en posición '1', en presencia de inhibidores de proteasas. La extracción se realizó durante una hora a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, con agitación magnética (en hielo). Concluida la hora, se centrifugó durante 15 min a 3,000 rpm, se recogió el sobrenadante y éste se volvió a centrifugar durante 15 min a 12,000 rpm; se tomó nuevamente el sobrenadante, el cual se guardó en alícuotas de 200 μl hasta su análisis en las diversas técnicas (*Western blot* y test de ELISA).

6.6.2. Cuantificación de proteínas totales

Después de obtener los homogenizados de cerebro, se realizó la cuantificación de proteína total contenida en cada una de las muestras, utilizando el ensayo para proteínas de Bio-Rad basado en el método de Bradford (Bradford, 1976).

Se prepararon cinco diluciones por triplicado de una proteína estándar (Albúmina sérica bovina (BSA) 0.1 $\mu\text{g/ml}$) a partir de la cual se elaboró la curva de calibración; las diluciones que se elaboraron, se muestran en el Cuadro 7 (considerando que el rango lineal para BSA será de 1.2 a 10 $\mu\text{g/ml}$). El colorante que se empleó es una solución ácida de azul brillante de Coomassie.

Se cuantificaron las proteínas de las muestras, midiendo 800 μl de cada muestra a los cuales se agregaron 200 μl de colorante. La cuantificación se realizó en ensayos por triplicado y las muestras se diluyeron 1:10, solo en los casos necesarios. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 5 min y su absorbencia fue leída a 595 nm.

Con las absorbancias obtenidas y haciendo uso de la curva de calibración, se obtuvieron las concentraciones de las proteínas de las muestras.

Cuadro 7. Diluciones para la preparación de la curva de calibración de cuantificación de proteínas.

TUBOS (por triplicado)	BSA ($\mu\text{g/ml}$)	Estándar (0.1 mg/ml)	BSA H ₂ O (μL)	Reactivo de Bradford (μl)	de Bio-Rad
Blanco	0	0	800	200	
1	2.5	25	775	200	
2	5	50	750	200	
3	10	100	700	200	
4	20	200	600	200	

6.7. Semi-cuantificación de las proteínas TH+ y GFAP mediante *Western blot*

6.7.1. Electroforesis SDS-PAGE

Se llevó a cabo la separación de las proteínas de concentraciones conocidas de las muestras, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Se calculó el volumen necesario para tener 150 μg de

proteína en cada pozo; este volumen se completó con el amortiguador de la muestra para tener un máximo de 30 μ l por pozo (en peines de 10 pozos). Posteriormente, las muestras se calentaron a 100 °C durante 5 min.

Se trabajó con geles de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras, utilizando peines de 10 pozos, en los cuales se colocaron las muestras (30 μ l tomando en cuenta una proporción 1:1 con amortiguador de carga, como máximo) y los marcadores de peso molecular (10 μ l), dispuestos en los pozos de cada extremo. Las muestras se corrieron a un voltaje constante de 100 V los primeros 15 min y posteriormente a 150 V durante el tiempo necesario para que la muestra llegara hasta el final del gel (aproximadamente 40 min).

6.7.2. Electrotransferencia de proteínas

Una vez separadas las proteínas en función de su diferente peso molecular, se transfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa. Se les aplicó un campo eléctrico de 200 mA durante una hora; de esta manera las proteínas son transferidas fuera del gel de poliacrilamida hasta la superficie de la membrana donde quedan fuertemente adheridas; de esta manera el patrón de proteínas que se tenía en el gel de poliacrilamida no cambió al ser transferido hacia la membrana.

Posteriormente, se realizaron tres lavados de 10 min en PBS para retirar los restos de poliacrilamida, después se bloqueó la membrana para evitar la unión inespecífica a la superficie de los anticuerpos utilizados para la detección de la proteína de interés. La membrana se bloqueó durante una hora en leche (Bio-Rad) al 3% en una solución de PBT 0.5%. Después de bloquear la membrana, se realizaron tres lavados en PBS.

Se prosiguió a incubar las membranas de nitrocelulosa toda la noche con los anticuerpos primarios anti-tirosina hidroxilasa+ producido en conejo (Millipore AB152, 1:1000) y anti-GFAP fabricado en ratón (Millipore MAB360, 1:1500), todos se diluyeron en leche al 1% en PBT 0.5%. Transcurrido ese tiempo, se realizaron tres lavados en PBS, posteriormente se incubaron las membranas con sus respectivos anticuerpos secundarios conjugados con HRP (peroxidasa de rábano picante) y anti-ratón 1:750 and anti-conejo 1:500 de Life Technologies, según fue el caso, dejándose incubar durante dos horas. Enseguida, se realizaron tres lavados más en PBS para proceder al revelado con quimioluminiscencia. Como control de carga (proteína de referencia) del ensayo de *Western blot* se utilizó anticuerpo anti-beta actina (Santa Cruz Biotechnology, 1:1000) con su anticuerpo secundario anti-cabra 1:500 de Invitrogen.

6.7.3. Revelado con quimioluminiscencia

El revelado con quimioluminiscencia (ECL, por sus siglas en inglés) se realizó en un cuarto totalmente oscuro. Se prepararon las siguientes diluciones: 35 ml de fijador GBX (Carestream dental, USA) en 160 ml H₂O destilada y 35 ml de revelador GBX (Kodak, USA) en 160 ml de H₂O destilada.

Se midieron volúmenes iguales (10 ml de c/u) de las soluciones A y B para la preparación del sustrato para quimioluminiscencia ECL, elaborado de manera casera por el grupo de investigación del laboratorio (Rodríguez-Cruz, 2013); se mezclaron las soluciones y posteriormente las membranas se sumergieron durante 1 minuto en dicha mezcla. Se utilizaron placas fotográficas hipersensibles para revelado (Amersham General Electric) y una lámpara de luz roja ajustable (Kodak, modelo B).

La membrana de nitrocelulosa se presionó contra la placa de revelado en un “*hypercassette*” durante 1 minuto. Luego, la placa fotográfica se sumergió en el

revelador, enseguida se realizó un lavado en agua destilada, después se sumergió en el fijador y por último se enjuagó con agua destilada; sumergiéndola 1 minuto en cada una de las soluciones. Se obtuvieron como resultado las placas con patrones de bandeó. Estas bandas se evaluaron por medio del análisis densitométrico con el software Quantity One de Bio-Rad.

6.8. Cuantificación por ELISA de IL- β , IL-6, TNF- α e IFN- γ .

Se cuantificaron las concentraciones de las citocinas pro-inflamatorias IL- β , IL-6, TNF- α e IFN- γ mediante la técnica de ELISA con los kits de PeproTech®, en las muestras de homogenizados de proteínas de los cerebros de los cuatro y cinco ratones de las cepas C57BL/6J y CD-1 respectivamente de cada grupo evaluado. Este análisis se realizó para observar el efecto y la relación de dichos tratamientos con la disminución del proceso inflamatorio en el cerebro con el modelo de EP y la expresión de las citocinas proinflamatorias.

Siguiendo la metodología de los kit de PeproTech® de ELISA-sándwich-ABTS para cada una de las citocinas proinflamatorias evaluadas, las soluciones y anticuerpos utilizados eran parte del kit. Primero se diluyó el anticuerpo de captura con PBS hasta la concentración de 1 μ g/ml e inmediatamente, se adicionaron 100 μ l en cada pozo del plato de ELISA. Posteriormente, se selló el plato y se incubó a temperatura ambiente toda la noche. Al día siguiente, se aspiró y removió el líquido de los pozos y se lavaron cuatro veces, cada lavado consistió en adicionar 300 μ l de solución amortiguadora de lavado por pozo, seguido de la aspiración del líquido y después de cada lavado se removió el residuo invirtiendo el plato sobre una toalla de papel. Enseguida se adicionaron 300 μ l de solución amortiguadora de bloqueo en cada pozo y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente, transcurrido ese tiempo se realizaron cuatro lavados más.

Los estándares de la curva de calibración se diluyeron, se colocaron 100 µl de cada estándar o muestras en cada pozo, por triplicado y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Al finalizar la incubación se realizaron cuatro lavados, se colocó 100 µl del anticuerpo de detección (biotinilado) a una concentración de 0.5 µg/ml y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Después de la incubación se hicieron cuatro lavados, se agregó 100 µl por pozo de un conjugado de avidina-HRP diluido 1:2000 en amortiguador del kit y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente.

Finalmente, al concluir el tiempo de incubación de la avidina-HRP se realizaron cuatro lavados, se agregaron 100 µl por pozo de solución sustrato ABTS, se incubó a temperatura ambiente hasta presenciar el cambio de coloración e inmediatamente se leyó la placa a 405 nm en un equipo de ELISA con una corrección de la longitud de onda a 650 nm.

6.9. Citometría de flujo

Con el fin de conocer si existía infiltración de leucocitos periféricos, los cuales representan un proceso inflamatorio que es nocivo para las neuronas, se prosiguió a evaluar los cambios poblacionales de leucocitos periféricos. De los grupos de ratones CD-1 se tomaron muestras sanguíneas por punción cardíaca cuando se sacrificaron, realizando la extracción antes de la perfusión con paraformaldehído. Este estudio solo se realizó sobre la cepa CD-1, ya que al no encontrar diferencias en los resultados en dicha cepa ya no se prosiguió con la otra cepa asumiendo que los patrones del estadio inflamatorio se encontraban similares en ambas cepas. Las muestras sanguíneas se les separó el suero por centrifugación y la técnica Ficoll-Paque™ (GE Healthcare, Alemania), la cual consistió en tomar la muestra con anticoagulante y mantener su preservación a 4 °C, se diluyó la sangre en una proporción 1:1 con PBS 1X o solución salina. Posteriormente, en un tubo cónico de 15 ml y se le agregaron 3 ml de Ficoll-

Paque y 4 ml de muestra de sangre previamente diluida. Después, se procedió a centrifugar de 30 a 40 min a 12,000 rpm, después de la centrifugación se formaron 4 fases en el tubo en el siguiente orden de abajo hacia arriba: eritrocitos, ficoll, células nucleares y plasma. Se tomó con una pipeta nueva la capa de las células mononucleares caracterizado por ser un anillo blanco y se re suspendieron en una proporción 1:3 en PBS 1X en un tubo nuevo. Se volvieron a centrifugar durante 10 a 15 min a 12,000 rpm y se removió el sobrenadante y al final se resuspendieron en PBS 1X.

Las muestras se evaluaron en el citómetro de flujo BD FACS VERSE, y se observaron los cambios porcentuales de las poblaciones de leucocitos por grupos, evaluándolos por tamaño y granularidad.

6.10. Acoplamiento molecular de la interacción del ácido valerénico con el receptor serotoninérgico 5-HT_{5A}

Para realizar el acoplamiento molecular fue necesario contar con la estructura tridimensional del receptor 5-HT_{5A}, la cual no se había resuelto experimentalmente y, por lo tanto, se usó la secuencia canónica del receptor 5-HT_{5A} en *Mus musculus* (UniProt P30966) para modelar la proteína con el servidor web GPCR-I-TASSER (Roy *et al.*, 2010; Yang y Zhang , 2015; Zhang *et al.*, 2017), utilizando el mejor modelo predicho por el servidor para cálculos adicionales. Las estructuras 3D de los ligandos, como la serotonina, la dietilamida del ácido lisérgico (LSD) y el ácido valerénico, se obtuvieron de Pubchem (números CID: 5202, 5761 y 6440940) (National Center for Biotechnology Information, 2019a, 2019b, 2019c). Posteriormente, la raíz torsional y las ramas de los ligandos, así como las cargas parciales de Gasteiger, se asignaron utilizando MGLTools 1.5.6, lo que permite la flexibilidad de todos los enlaces rotativos, excepto el enlace amida (MF Sanner, 1999; Morris *et al.*, 2009).

Los cálculos de acoplamiento se realizaron utilizando AutoDock 4.2.6 (Morris *et al.*, 2009), utilizando un cuadro de cuadrícula de búsqueda de X: 76.185, Y: 80.375 y Z: 81.624 con un espaciado de cuadrícula de 0.375 Å centrado en el dominio transmembrana del receptor. El algoritmo genético lamarckiano se usó como un método de búsqueda para un total de 25 ejecuciones con un número máximo de 5,000,000 de evaluaciones de energía con 150 conformadores como la población inicial. El mejor modo de unión para cada conformación se analizó utilizando Maestro publicado en 2019-1 (Schrödinger, LLC) (Schödinger, 2019).

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para encontrar diferencias significativas en las pruebas motoras se llevaron a cabo pruebas de ANOVA de dos vías con sus respectivas pruebas *post hoc* (Bonferroni). También se realizaron las pruebas de ANOVA y *post hoc* (Bonferroni) para las concentraciones de las citocinas proinflamatorias. La comparación entre cepas se analizó con la prueba *post hoc* Sidak-Bonferroni. El análisis de datos de la técnica de *Western blot* se llevó a cabo mediante el software Quantity One de Bio-Rad, para evaluar la densidad óptica de las marcas generadas en las placas fotográficas. Los datos obtenidos en los análisis por citometría de flujo se evaluaron con el software BD FACsuite™. En todos los gráficos generados se representó la media \pm el error estándar.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Pruebas de función motora

De acuerdo con las pruebas motoras realizadas (fuerza de agarre en rejilla, prueba de cruzamiento de viga, movilidad en campo abierto y levantamiento de las patas posteriores), los grupos de MPTP para las dos cepas de ratones presentaron una implementación adecuada del modelo de EP (Nagarajan *et al.*, 2015), y el grupo de ácido valerénico no presentó ningún efecto y/o afectación

de la condición motora en comparación con el grupo control; este comportamiento se observó en todas las pruebas motoras realizadas (Figura 14). Por otro lado, el grupo de la EP (MPTP) presentó una puntuación reducida en la prueba de fuerza de agarre en rejilla; sin embargo, el grupo de MPTP con el tratamiento previo con ácido valerénico (V.A. + MPTP) presentó aumento en el tiempo evaluado (el puntaje de ajuste de tiempo evaluado según Deacon, 2013). Esta proyección móvil de agarre se presenta de manera similar para ambas cepas (Figura 14A). Además, el grupo con tratamiento previo de ácido valerénico, V.A. + MPTP, presentó disminución significativa en el tiempo de cruce en la prueba de caminata sobre la viga con respecto al grupo de MPTP; esta condición de recuperación del equilibrio y caminata estaba presente en ambas cepas de ratón, siendo la cepa C57BL/6J más sensible al tratamiento (Figura 14B). Alternativamente, en la prueba de campo abierto, se observó mejora de la movilidad en el grupo de V.A. + MPTP, respecto al grupo con EP (MPTP), aumentando el tiempo de movilidad en ambas cepas (Figura 14C). Por último, hubo aumento significativo en el número de levantamientos de las patas traseras en el grupo tratado V.A. + MPTP en comparación con el grupo de la enfermedad (MPTP), lo que resultó en una mejora en el manejo y dominio del cuerpo al aplicar el tratamiento previo con ácido valerénico, con un comportamiento similar en ambas cepas de ratón (Figura 14D).

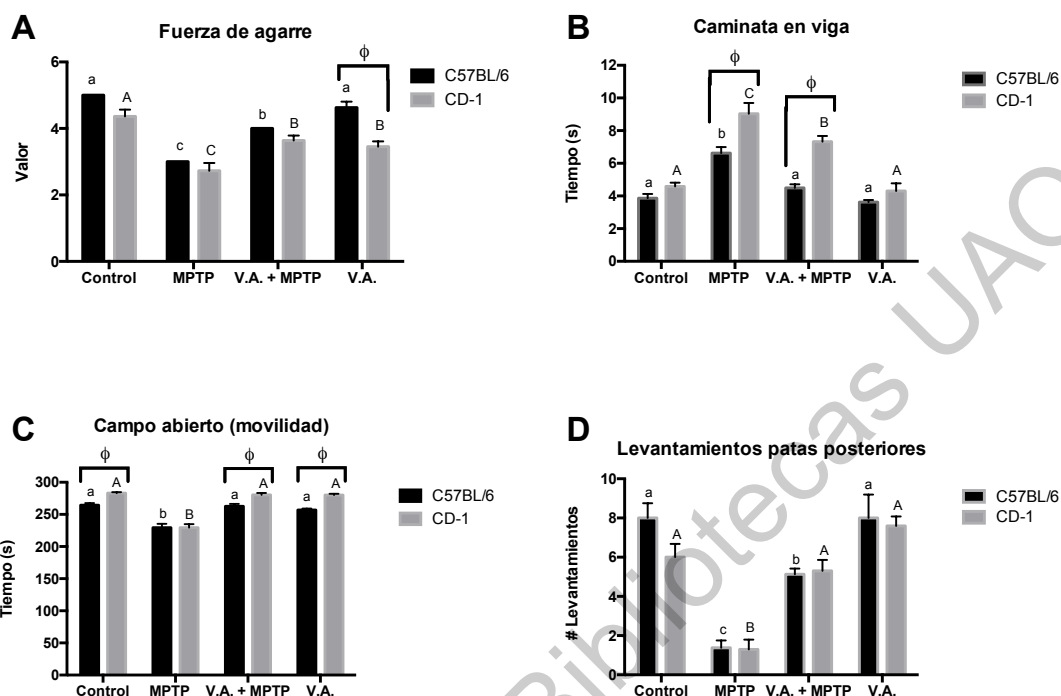


Figura 14. Pruebas de función motora. A. Fuerza de agarre. B. Caminata en viga. C. Campo abierto (movilidad). D. Levantamientos en patas posteriores. Las letras diferentes representan diferencias significativas (letras minúsculas, comparación entre grupos de la cepa C57BL/6J; letras mayúsculas, comparación entre grupos de la cepa CD-1), ANOVA de dos vías – *post hoc* Bonferroni, $p > 0.05$. ϕ , representa diferencia significativa, Multiple t-test – *post hoc* Sidak-Bonferroni, $p > 0.05$.

Los resultados presentan consistencia en la implementación del modelo de MPTP de EP reportado en la literatura, ésto al mostrar disminución en la capacidad motora en las cepas de ratones C57BL/6J y CD-1. Además, los ratones de la cepa C57BL/6J presentaron mayor sensibilidad a la neurotoxina, lo que resultó en un mayor déficit motor en comparación con la cepa CD-1. Esta observación en la diferencia en la sensibilidad a la toxina MPTP en la implementación del modelo de la EP, es consistente con lo reportado por Muthane *et al.* (1994) y Vidyadhara *et al.* (2017), quienes mencionan que los ratones de la cepa C57BL/6J muestran mayor neurodegeneración dopaminérgica en comparación con los ratones CD-1 en su evaluación

inmunohistoquímica. Por lo tanto, los resultados presentados en las pruebas motoras de nuestros estudios (Figura 14) muestran la afectación locomotriz en el modelo de la EP en ambas cepas. Se logró determinar que el tratamiento con ácido valerénico es efectivo en cepas que difieren en la expresión de enzimas hepáticas (Wang *et al.*, 2019).

8.2. Inmunofluorescencia y *Western blot* del análisis de TH+ y GFAP.

De acuerdo con las imágenes obtenidas de inmunofluorescencia y el análisis del *Western blot*, la proteína tirosina hidroxilasa positiva en el mesencéfalo mostró disminución significativa en el grupo de MPTP (Figuras 15 y 16A). En el caso del grupo V.A. + MPTP, los datos mostraron aumento con respecto al grupo MPTP, que puede comprobarse en el análisis del *Western blot*, no obstante, la observación no es concluyente para la evaluación por inmunofluorescencia, a falta de pruebas de significancia estadística. La expresión de GFAP en el mesencéfalo de ambas cepas se incrementó en el grupo de MPTP y disminuyó en el grupo V.A. + MPTP según las imágenes de inmunofluorescencia y el análisis de densitometría de los *Western blot* (Figuras 15 y 16B), con diferencias significativas para el análisis de proteína.

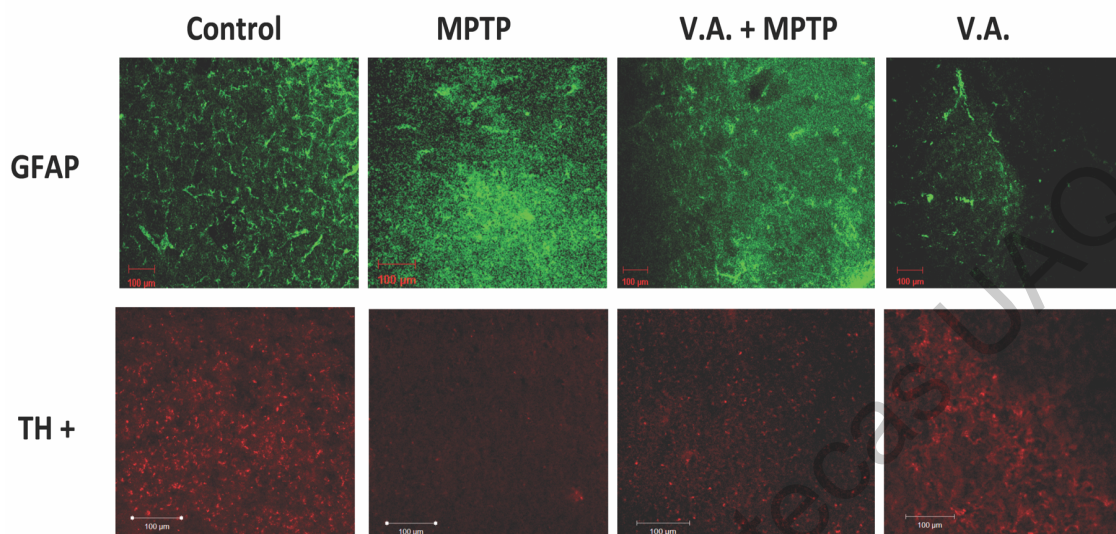


Figura 15. Detección por inmunofluorescencia de las proteínas TH y GFAP en el cerebro medio. Expresión de la tirosina hidroxilasa (TH+) y proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en el mesencéfalo. Imágenes representativas de las repeticiones de las dos cepas (C57BL/6J y CD-1).

La tirosina hidroxilasa es un marcador de células especializadas en la síntesis de catecolaminas, como lo son las neuronas dopaminérgicas; la disminución de la proteína tirosina hidroxilasa, evidenciada por *Western blot* y por inmunofluorescencia concuerda con el fenotipo para el modelo de enfermedad de Parkinson en ratón, como se observó en las pruebas motoras para los ratones tratados con MPTP (Figura 14). Por otro lado, la activación de células gliales, particularmente astrocitos, está implicada en el proceso de neuroinflamación, que también está asociado a la EP, por lo que el aumento en la cantidad de proteína GFAP, evidenciado por ambas técnicas, coincide con el modelo de dicha enfermedad. El tratamiento con ácido valerénico inhibió la disminución de proteína tirosina hidroxilasa y el aumento de proteína GFAP en mesencéfalos del grupo de ratones tratados con MPTP (Figuras 15 y 16), por lo que se sugiere que tiene un efecto protector contra el daño de la neurotoxina. La atenuación del proceso neuroinflamatorio es importante, y al evaluar el ácido valerénico podemos observar que disminuye el daño probablemente en parte por la

atenuación de la inflamación cerebral (Taylor *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015).

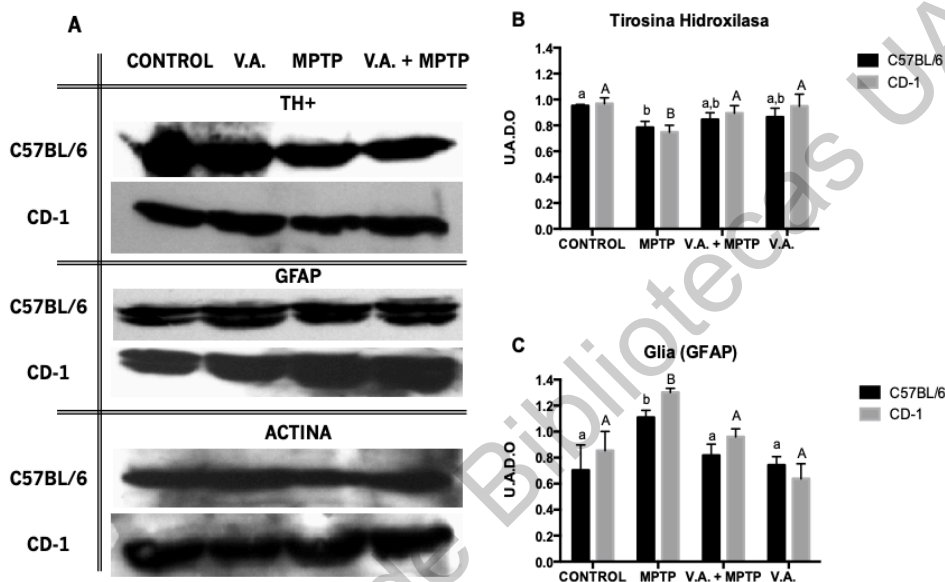


Figura 16. Cuantificación de la expresión de las proteínas TH y GFAP en cerebro medio por *Western blot*. A. Inmunoblots representativos de la expresión de las proteínas TH y GFAP en el cerebro medio. B. Análisis semi-cuantitativo de la expresión de TH en ambas cepas de ratón. C. Análisis semi-cuantitativo de la expresión de GFAP en ambas cepas de ratón. U.A.D.O, Unidades arbitrarias de Densidad Óptica. Las letras diferentes representan diferencias significativas (letras minúsculas, comparación entre grupos de la cepa C57BL/6J; letras mayúsculas, comparación entre grupos de la cepa CD-1), ANOVA de dos vías – *post hoc* Tukey’s, $p > 0.1$. Multiple t-test – *post hoc* Sidak-Bonferroni, $p > 0.1$, entre cepas.

8.3. Evaluación de citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ .

Después de analizar la concentración de citocinas proinflamatorias en el cerebro medio de las cepas de ratón, se observó aumento en todas las citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ) en el grupo de MPTP en comparación con el grupo control en ambas cepas. Hubo disminución de las citocinas en los grupos V.A. + MPTP,

mientras que en el grupo de V.A., no cambió con respecto al grupo control (Figura 17). Las únicas diferencias entre las cepas fue en los grupos control al evaluar IFN- γ (Figura 17D).

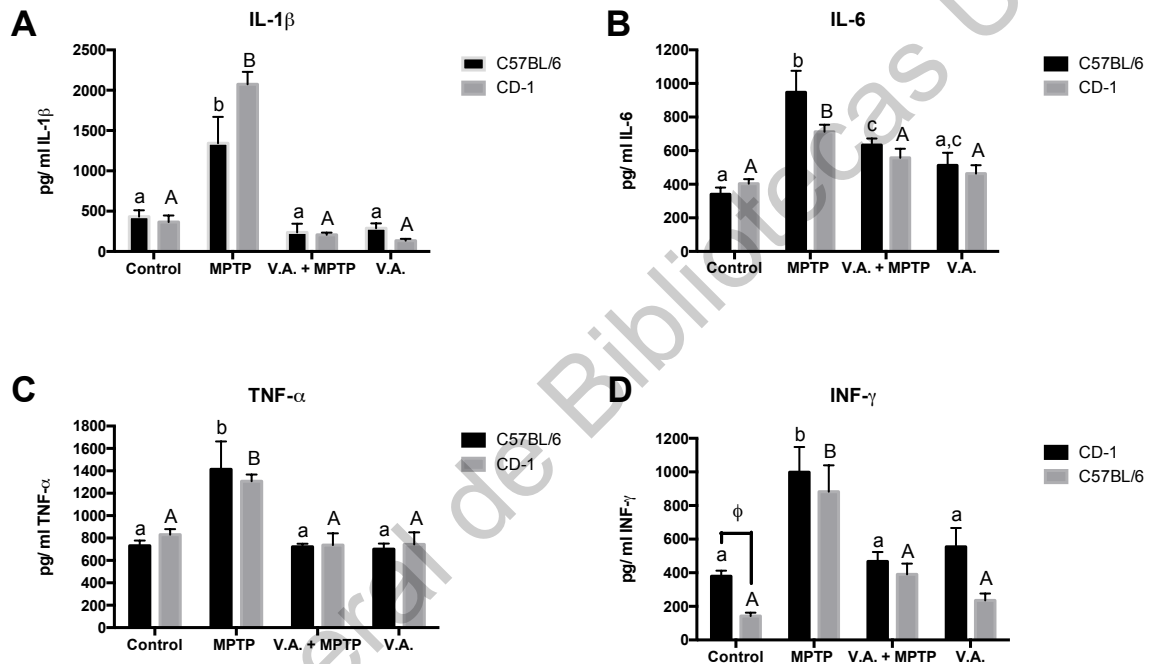


Figura 17. Cuantificación de citocinas proinflamatorias por ELISA. (A) IL-1- β . (B) IL-6. (C) TNF- α . (D) IFN- γ . Las letras diferentes representan diferencias significativas (letras minúsculas, comparación entre grupos de la cepa C57BL/6J; letras mayúsculas, comparación entre grupos de la cepa CD-1). ANOVA de dos vías – *post hoc* Bonferroni, $p > 0.05$. ϕ , representa diferencia significativa entre grupos de la misma cepa, Multiple t-test – *post hoc* Sidak-Bonferroni, $p > 0.05$.

El proceso neuroinflamatorio es un mecanismo que juega un papel muy importante en la EP. Una de las vías moleculares que generan neuroinflamación en la EP es la de NF- κ B, la cual al estar activa, aumenta el

proceso neuroinflamatorio mediante la activación de la proliferación de las células microgliales (IFN- γ), produciendo aumento en la neurotoxicidad de las neuronas dopaminérgicas debido a la secreción de citocinas proinflamatorias de la glía, tales como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Arcuri *et al.*, 2017; Sominsky *et al.*, 2018). Además, se ha observado aumento de la actividad de NF- κ B en las neuronas dopaminérgicas cuando se presenta la EP (Hunot *et al.*, 1997), lo que quiere decir que dicha vía es primordial en la atenuación de la EP. Por otro lado, se ha demostrado que la modulación mediante la inhibición de la vía NF- κ B podría ser un potencial blanco para evitar la progresión de la neurodegeneración en la EP (Boireau *et al.*, 1997; Ghosh *et al.*, 2007; Flood *et al.*, 2011).

En el presente trabajo, los grupos que presentan la EP (grupo MPTP) mostraron aumento en las citocinas proinflamatorias evaluadas (IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ) en el homogenizado proteico de cerebro medio en comparación con los grupos control, en ambas cepas evaluadas (Figura 17); dicha observación en ratones es consistente con lo observado en los trabajos de Yao y Zhao (2018) y Kabel *et al.* (2018). Sin embargo, cuando se suministró el ácido valerénico en ambas cepas (C57BL/6J y CD-1) como tratamiento preventivo ante la inducción de la EP con MPTP (grupos V.A.+MPTP), las concentraciones de todas las citocinas proinflamatorias evaluadas disminuyeron significativamente en comparación con las del grupo de la EP (MPTP). Esta observación nos podría indicar que se está presentando una atenuación del proceso neuroinflamatorio en la EP por acción del ácido valerénico, que muy probablemente estaría relacionado con su acción en la inhibición de la vía NF- κ B. La relación de la inhibición del ácido valerénico sobre la vía NF- κ B es debido a que se ha reportado que el ácido valerénico es inhibidor de dicha vía (Jacobo-Herrera *et al.*, 2006). La disminución en las citocinas proinflamatorias evaluadas en ambas cepas tiene una relación cercana con la disminución en el proceso neuroinflamatorio, que se ha asociado como una medida importante en el proceso de neuroprotección en la EP; se esperaría que posteriormente se active la microglía M1 generando la liberación de

citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ), que se encargan de promover la producción de iNOS, agravando la lesión neuronal dopaminérgica inducida por el NO. Posteriormente, las citocinas proinflamatorias aceleran la activación de la microglía y su infiltración a través de la barrera hematoencefálica, lo que conduce a la activación en mayor proporción de microglía y macrófagos perivasculares residentes, resultando en una respuesta inflamatoria crónica. Cuando esta respuesta inflamatoria persiste, puede causar la progresión de la EP al dañar neuronas dopaminérgicas (Gelders *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2019).

8.4. Análisis de leucocitos periféricos mediante citometría de flujo.

Se realizó el análisis por citometría de flujo de la población de leucocitos en los diferentes grupos de la cepa CD-1, esto con el fin de observar si existía algún cambio en la migración y/o activación del sistema inmunológico a nivel periférico. De acuerdo con los datos de la Figura 18, no se presentan cambios en el modelo de la enfermedad (MPTP), así como tampoco existe cambio estadístico en el porcentaje presentado en los demás grupos con respecto al control y entre estos. Por lo tanto, la migración de leucocitos del sistema periférico hacia al cerebro no se presentó en ningún grupo; esto debido a que no existe un cambio en el porcentaje de estas células en sistema periférico, lo cual nos indica que en ninguno de los casos, el proceso inflamatorio se extendió al sistema periférico (Figura 18), manteniéndose el proceso inflamatorio en cerebro, evitando que el daño fuese más nocivo por la infiltración de linfocitos periféricos (Hirsch y Hunot, 2009; Calabrese *et al.*, 2018).

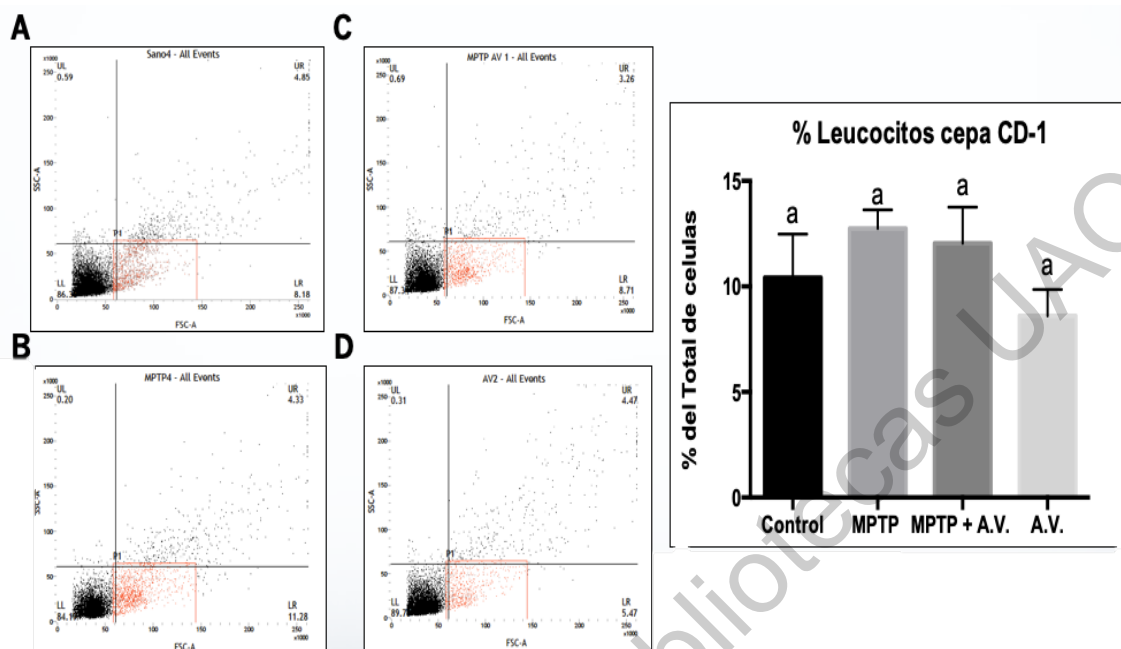
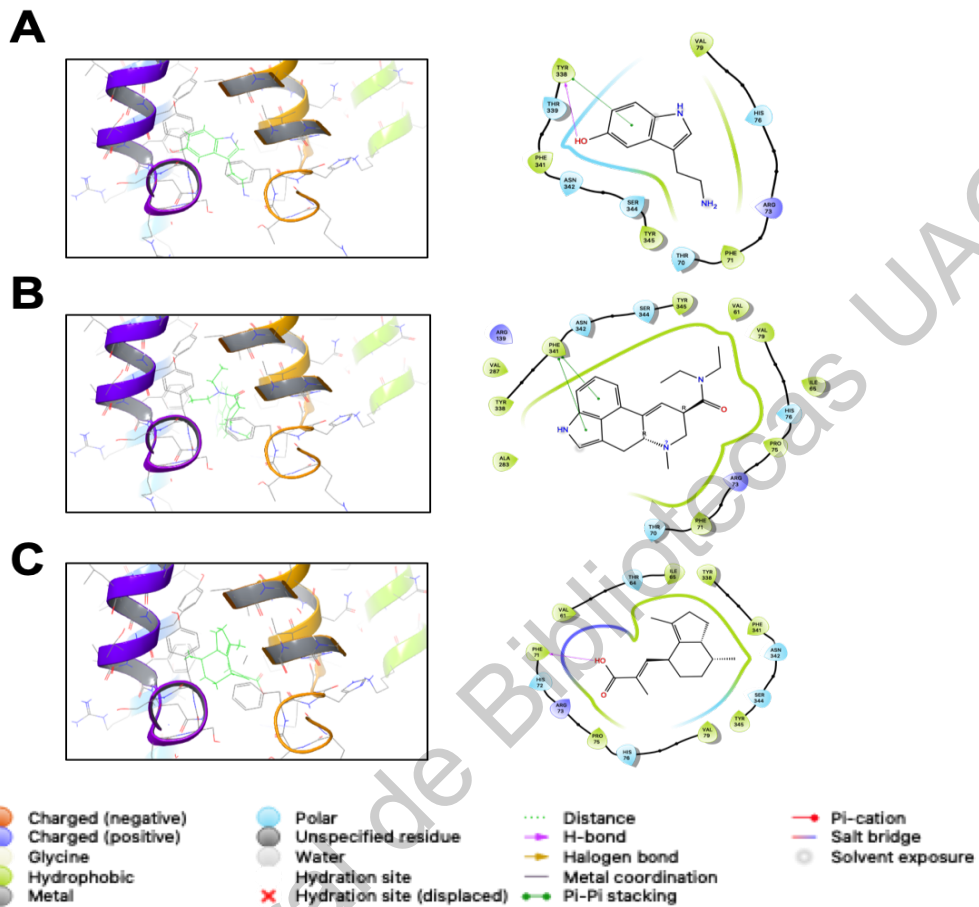


Figura 18. Citometría de flujo de leucocitos periféricos. Porcentaje de leucocitos periféricos en la cepa CD-1. A) Control. B) MPTP. C) MPTP +A.V. D) A.V. Diferencia significativa, letras diferentes. Análisis de Kruskal wallis, $p < 0.05\%$. A.V., ácido valerénico.

8.5. Resultados del acoplamiento molecular del ácido valerénico con el receptor 5-HT_{5A}.

Posteriormente, se quería saber qué vía de señalización podría activar el ácido valerénico para llevar a cabo su efecto anti-neuroinflamatorio, la posible inhibición de NF- κ B y por consiguiente, su efecto neuroprotector. Se sabía que el ácido valerénico podría unirse como un agonista parcial al receptor serotoninérgico 5-HT_{5A}; por lo tanto, se decidió confirmar la interacción mediante ensayos de acoplamiento molecular. Los resultados mostraron que el ácido valerénico se une al receptor 5-HT_{5A} como agonista (Figura 19). De acuerdo con los cálculos de acoplamiento, la interacción principal de la serotonina con el receptor 5-HT_{5A} se lleva a cabo en la Tyr338 mediante la interacción π - π con el

anillo aromático de serotonina y un hidrógeno unido a un grupo hidroxilo, así como contactos cercanos con los residuos 70-79 y 338-345 (Figura 19A). Para el LSD, la interacción principal es llevada a cabo por una interacción π - π de los anillos aromáticos con el residuo Phe341 y contactos cercanos con los residuos 70-79 y 338-345 (Figura 19B). Finalmente, el ácido valerénico presenta su interacción principal por un enlace de hidrógeno entre Phe71 y el ácido carboxílico del ligando, así como contactos cercanos con los residuos 61-65, 71-79 y 338-345 (Figura 19C). La evaluación se realizó con los programas AutoDock 4.2.6 (Morris *et al.*, 2009). Utilizando el mejor modo de unión para cada conformación, analizado en el programa: Maestro, publicado en 2019-1 (Schöding, 2019).



Ligando	Energía lineal de interacción(Kcal/mol)
A. Serotonina	- 4.05
B. LSD	- 6.98
C. Ácido valerénico	- 8.25

Figura 19. Resultados de los cálculos del acoplamiento molecular. Diagramas de interacción relevante ligando-proteína del receptor 5-HT_{5A} y los modelos de estudio. A. serotonina, B. LSD, C. ácido valerénico.

Estos hallazgos del acoplamiento molecular confirman los estudios experimentales de la unión agonista del ácido valerénico presentados por Dietz et al. (2005). Esto nos lleva a sustentar la teoría de que el ácido valerénico podría unirse a los receptores 5-HT_{5A} expresados en los astrocitos, inhibiendo la

acumulación de AMPc y suprimiendo la reactividad. Esta disminución podría atenuar el proceso neuroinflamatorio de la enfermedad y con ello disminuir la pérdida neuronal dopaminérgica (Carson et al., 1996). De la misma manera que los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, los cuales se han propuesto en los astrocitos para el tratamiento de la EP, el posible mecanismo de acción del ácido valerénico sería mediante la unión a los receptores 5-HT_{5A} sería parte del mecanismo de la modulación del proceso neuroinflamatorio a través de astrocitos, junto con la inhibición de NF-κB, que tendrían un efecto neuroprotector (Miyazaki y Asanuma, 2016). De acuerdo con la información recabada en los diferentes experimentos se construyó una propuesta de la vía de señalización del efecto del ácido valerénico, la cual se presenta en la Figura 20.

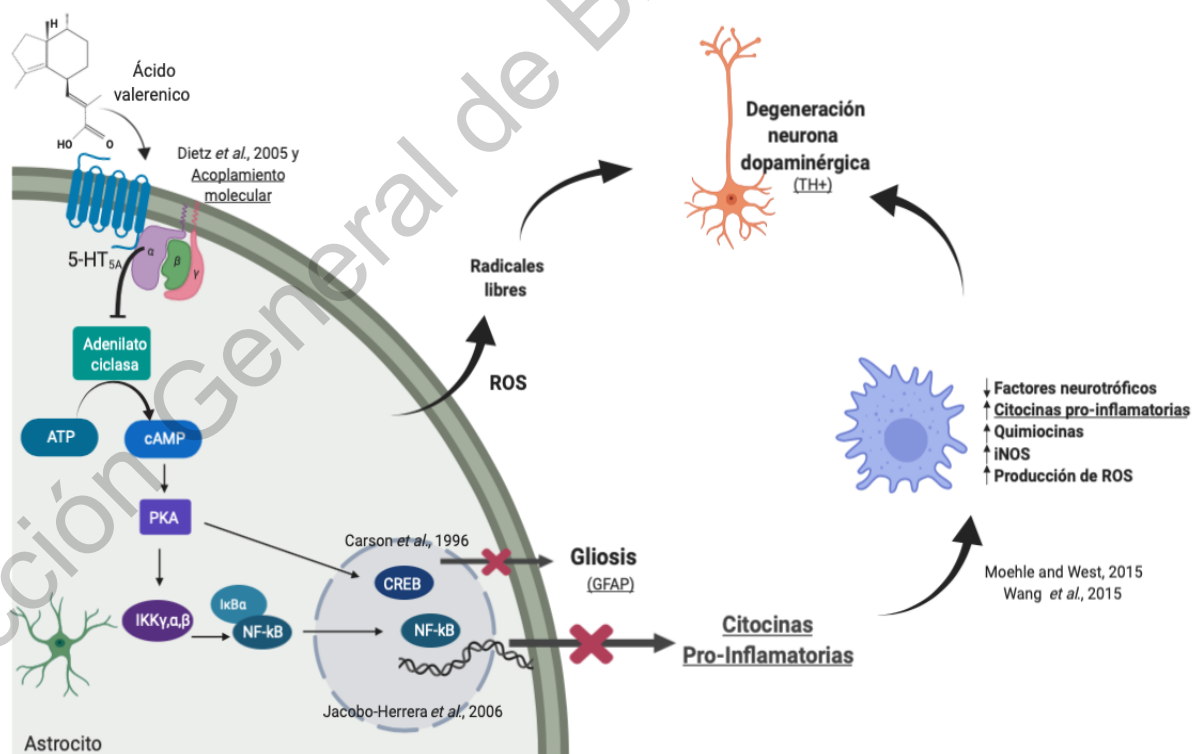


Figura 20. Propuesta de la vía de señalización del ácido valerénico en la disminución del proceso neuroinflamatorio (modificado de Rodríguez-Cruz *et al.*, 2020).

9. CONCLUSIÓN

En conclusión, el trabajo presentado evidencia que el ácido valerénico (el componente principal del aceite esencial de *V. officinalis*) tiene un efecto regulatorio en la disminución de los procesos neuroinflamatorios en la EP, utilizando un modelo de ratón, inducido por la neurotoxina MPTP. El mecanismo de acción por el cual el ácido valerénico reduce la neuroinflamación podría ser mediante la activación del receptor 5-HT_{5A}, y la inhibición de NF-κB en los astrocitos. Es necesario realizar más pruebas que garanticen su inocuidad y nula toxicidad, antes de poder ser propuesto como un coadyuvante de los tratamientos farmacológicos de la enfermedad de Parkinson existentes.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDakheel A, Kalia LV, Lang AE. 2014. Pathogenesis-target, disease-modifying therapies in Parkinson disease. *Neurother.* 11: 6-23.

Alves G, Forsaa EB, Pedersen KF, Gjerstad MD, Larsen JP. 2008. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol.* 255 (Suppl 5): 18-32.

Arcuri C, Mecca C, Bianchi R, Giambanco I, Donato R. 2017. The Pathophysiological Role of Microglia in Dynamic Surveillance, Phagocytosis and Structural Remodeling of the Developing CNS. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10:1–22 Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2017.00191/full>

Ascherio A, LeWitt PA, Xu K, Eberly S, Watts A, Matson WR, Marras C, Kieburtz K, Rudolph A, Bogdanov MB, Schwid SR, Tennis M, Tanner CM, Beal MF, Lang AE, Oakes D, Fahn S, Shoulson I, Schwarzschild MA. 2009. Urate as a predictor of the rate of clinical decline in Parkinson disease. *Arch Neurol.* 66: 1460-1468.

Ávila-Cobo MR. 2012. Enfermedad de Parkinson, un enfoque actual: Aspectos epidemiológicos de la enfermedad. Editor Carlos Zúñiga Ramírez. Editorial Alfil. México. 3-7.

Bach JP, Ziegler U, Deuschl G, Dodel R, Doblhammer-Reiter G. 2011. Projected Numbers of People With Movement Disorders in the Years 2030 and 2050. *Mov Disord.* 26 (12): 2286-2290.

Bartels AL, Willemsen AT, Doorduyn J, de Vries EF, Dierckx RA, Leenders KL. 2010. [11C]-PK11195 PET: quantification of neuroinflammation and a monitor of anti-inflammatory treatment in Parkinson's disease?. *Parkinsonism Relat disord.* 16: 57-59.

Bendor JT, Logan TP, Edwards RH. 2013. The function of α -synuclein. *Neuron.* 79: 1044-1066.

Birnbaum GL, Findlay JA, Krepinsky JJ. 1978. Stereochemistry of valerenane sesquiterpenoids, crystal structure of valerenolic acid. *J Org Chem.* 43: 272-276.

Bjorklund A, Kordower JH. 2013. Cell therapy for Parkinson's disease: what next?. *Mov Disord.* 28: 110-115.

Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. 2015. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat.* 9: 91.

Boireau A, Bordier F, Dubédat P, Pény C, Impérato A. 1997. Thalidomide reduces MPTP-induced decrease in striatal dopamine levels in mice. *Neuroscience Letters* 234:123–126.

Bos R, Woerdenbag HJ, van Putten FM, Hendricks H, Scheffer JJC. 1998. Seasonal Variation of the Essential Oil, Valerenic Acid and Derivatives in

Valeriana officinalis Roots and Rhizomes, and the Selection of Plants Suitable for Phytomedicines. *Planta Med.* 64 (2): 143-147.

Boyadzhiev L, Kancheva D, Gourdon C, Metcheva D. 2004. Extraction of valerenic acids from valerian (*Valeriana officinalis* L.) rhizomes. *Pharmazie.* 59: 727-728.

Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RAI, Steuer ENHJ, Braak E. 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 24(2): 197-211.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.

Brooks SP, Dunnett SB. 2009. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci.* 10(7): 519-529.

Burré J, Sharma M, Südhof TC. 2015. Definition of a molecular pathway mediating α -synuclein neurotoxicity. *J Neurosci.* 35: 5221-5232.

Calabrese V, Santoro A, Monti D, Crupi R, Di Paola R, Latteri S, Cuzzocrea S, Zappia M, Giordano J, Calabrese EJ, Franceschi C. 2018. Aging and Parkinson's Disease: inflammaging, neuroinflammation and biological remodeling as key factors in pathogenesis. *Free Radic Biol Med* 115:80–91.

Carreras E, de Andrés MV, Orta-Macará M, Simões IT, Catalá C, Zaragoza O, Lozano F. 2019. Discordant susceptibility of inbred C57BL/6 versus outbred CD1 mice to experimental fungal sepsis. *Cell Microbiol.* 21(5): e12995. DOI: 10.1111/cmi.12995.

Carson MJ, Thomas EA, Danielson PE, Sutcliffe JG. **1996**. The 5-HT(5A) serotonin receptor is expressed predominantly by astrocytes in which it inhibits cAMP accumulation: A mechanism for neuronal suppression of reactive astrocytes. *Glia* 17:317–326.

Charles D, Konrad PE, Neimat JS, Molinari AL, Tramontana MG, Finder SG, Gill CE, Bliton MJ, Kao CC, Phibbs FT, Hedera P, Salomon RM, Cannard KR, Wang L, Song Y, Davis TL. **2014**. Subthalamic nucleus deep brain stimulation in early stage Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 20: 731-737.

Chaudhuri KR, Schapira AH. **2009**. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol*. 8: 464-474.

Chen JF, Xu K, Petzer JP, Staal R, Xu YH, Beilstein M, Sonsalla PK, Castagnoli K, Castagnoli JrN, Schwarzschild MA. **2001**. Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *J Neurosci*. 21:RC143.

Cipriani S, Chen X, Schwarzschild MA. **2010**. Urate: a novel biomarker of Parkinson's disease risk, diagnosis and prognosis. *Biomark Med*. 4: 701-712.

Connolly B, Lang AE. **2014**. Pharmacological treatment of Parkinson's disease: a review. *JAMA*. 311: 1670-1683.

Coune PG, Schneider BL, Aebischer P. **2012**. Parkinson's disease: gene therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2: a009431.

Cremades N, Cohen SIA, Deas E, Abramov AY, Chen AY, Orte A, Sandal M, Clarke RW, Dunne P, Aprile FA, Bertoncini CW, Wood NW, Knowles TPJ, Dobson CM, Klenerman D. **2012**. Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of α -synuclein. *Cell*. 149: 1048- 1059.

Deacon RMJ. **2013**. Measuring the Strength of Mice. *J Vis Exp*. 76: e2610.

Dickson DW, Braak H, Duda JE, Duyckaerts C, Gasser T, Halliday GM, Hardy J, Leverenz JB, Del Tredici K, Wszolek ZK, Litvan I. **2009**. Neuropathological assessment of Parkinsons disease refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol*. 8:1150-1157.

Dietz BM, Mahady GB, Pauli GF, Farnsworth NR. **2005**. Valerian extract and valerenic acid are partial agonists of the 5-HT_{5A} receptor in vitro. *Molecular Brain Research*. 138: 191-197.

de Lau LML, Breteler MMB. **2006**. Epidemiology of Parkinson´s disease. *Lancet Neurol*. 5: 525-535.

de Oliveria DM, Barreto g, De Andrade DVG, Saraceno E, Aon-Bertolino L, Capani F, El Bacha RDS, Giraldez LD. **2009**. Cytoprotective effect of *Valeriana officinalis* extract on an *in vitro* experimental model of Parkinson disease. *Neurochem Res*. 34: 215-220.

Del Valle-Mojica LM, Ayala-Marín YM, Ortiz-Sanchez CM, Torres-Hernández BA, Abdalla-Mukhaimer S, Ortiz JG. **2011**. Selective Interactions of *Valeriana officinalis* Extracts and Valerenic Acid with [³H] Glutamate Binding to Rat Synaptic Membranes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011:1-7.

Dexter DT, Jenner P. 2013. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*. 62: 132-144.

Duncan GW, Khoo TK, Yarnall AJ, O'Brien JT, Coleman SY, Brooks DJ, Barker RA, Burn DJ. 2014. Health-related quality of life in early Parkinson's disease: the impact of non motor symptoms. *Mov Disord*. 29: 195-202.

Doherty KM, Silveira-Moriyama L, Parkkinen L, Healy DG, Farrell M, Mencacci NE, Ahmed Z, Brett FM, Hardy J, Quinn N, Counihan TJ, Lynch T, Fox ZV, Revesz T, Less AJ, Holton JL. 2014. Parkin disease: A clinicopathologic entity?. *JAMA Neurol*. 70(5): 571-579.

Dorsey ER, Sherer T, Okun MS, Bloem BR.. 2018. The emerging evidence of the Parkinson pandemic. *J Parkinsons Dis*. 8: S3-S8. DOI: 10.3233/JPD-181474.

Flood PM, Qian L, Peterson LJ, Zhang F, Shi JS, Gao HM, Hong JS. 2011. Transcriptional factor NF-kb as a target for therapy in Parkinson's disease. *Parkinson's Disease* 2011:11-14.

Gelders G, Baekelandt V, Van der Perren A. 2018. Linking Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Journal of Immunology Research* 2018:1-12

Ghosh A, Roy A, Liu X, Kordower JH, Mufson EJ, Hartley DM, Ghosh S, Mosley RL, Gendelman HE, Pahan K. 2007. Selective inhibition of NF-kappaB activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:18754-18759 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18000063>.

Goedert M, Spillantini MG, Del Tredici K, Braak H. 2012. 100 years of Lewy pathology. *Nat Rev Neurol.* 9: 13-24.

Grosset D, Lees AJ. 2005. Long duration asymmetric postural tremor in the development of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 76:9.

Hadley S, Petry JJ. 2003. Valerian. *Am Fam Physician.* 67: 1755-1758.

Hall CN, Klein-Flügge MC, Howarth C, Attwell D. 2012. Oxidative phosphorylation, not glycolysis, powers presynaptic and postsynaptic mechanisms underlying brain information processing. *J Neurosci.* 32: 8940-8951.

Hardy J. 2010. Genetic analysis of pathways to Parkinson disease. *Neuron.* 68: 201-206.

Hattingen E, Magerkurth J, Pilatus U, Mozer A, Seifried C, Steinmetz H, Zanella F, Hilker R. 2009. Phosphorus and proton magnetic resonance spectroscopy demonstrates mitochondrial dysfunction in early and advanced Parkinson's disease. *Brain.* 132: 3285-3297.

Hayashi T, Ishimori C, Takahashi-Niki K, Taira T, Kim Y, Maita H, Ariga H, Iguchi-Ariga SM. 2009. DJ-1 binds to mitochondrial complex I and maintains its activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 390: 667-672.

Hirsch EC, Hunot S. 2009. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 8:382–397.

Hsieh LS, Wen JH, Miyares L, Lombroso PJ, Bordey A. 2017. Outbred CD1 mice are as suitable as inbred C57BL/6J mice in performing social tasks.

Neuroscience Letters 637:142–147 Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.11.035>.

Hunot S, Brugg B, Ricard D, Michel PP, Muriel MP, Ruberg M, Faucheux B a, Agid Y, Hirsch EC. 1997. Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. Pnas 94:7531–7536.

Jacobo-Herrera NJ, Vartiainen N, Bremmer P, Gibbons S, Koistinaho J, Heinrich M. NF-Kb Modulators from *Valeriana officinalis*. Phytother Res. 20: 917-919.

Jankovic J. 2008. Parkinson´s disease: clinical features and diagnosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 79: 368-376.

Kabel AM, Omar MS, Alhadhrami A, Alharthi SS, Alrobaian MM. 2018. Linagliptin potentiates the effect of L-dopa on the behavioural, biochemical and immunohistochemical changes in experimentally-induced Parkinsonism: Role of toll-like receptor 4, TGF-β1, NF-κB and glucagon-like peptide 1. Physiology and Behavior 188:108–118 Available at:
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.01.028>.

Kalia LV, Kalia SK, McLean PJ, Lozano AM, Lang AE. 2013. α-Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease. Ann Neurol. 73: 155-169.

Kalia LV, Lang A. 2015. Parkinson´s disease. Lancet. 386: 896-912.

Kalia LV, Lang A, Hazrati L-N, Fujioka S, Wszolek ZK, Dickson DW, Ross OA, Van Deerlin VM, TROJANOWSKI Jq, Hurting HI, Alcalay RN, Marder KS, Clark LN, Gaig C, Tolosa E, Ruiz-Martínez J, Marti-Masso JF, Ferrer I, de

Munain AL, Goldman SM, Schüle B, Langston JW, Aasly JO, Giordana MT, Bonifati V, Puschmann A, Canesi M, Pezzoli G, De Paula AM, Hasegawa K, Duvckaerts C, Brice A, Stoessl AJ, Marras C. **2015**. Clinical correlations with lewy body pathology in LRRK2-related Parkinson disease. *JAMA Neurol.* 72(1): 100-105.

Katzenschlager R, Cardozo A, Avila-Cobo MR, Tolosa E, Lees AJ. **2003**. Unclassifiable parkinsonism in two European tertiary referral centres for movement disorders. *Mov Disord.* 18: 1123-1131.

Kempster PA, O'Sullivan SS, Holton JL, Revesz T, Lees AJ. **2010**. Relationships between age and late progression of Parkinson's disease: a clinic-pathological study. *Brain.* 133: 1755-1762.

Kenborg L, Lassen CF, Hasen J, Olsen JH. **2012**. Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders among welders: a Danish cohort study. *Mov Disord.* 27: 1283-1289.

Khom S, Strommer B, Ramharter J, Schwarz T, Schwarzer C, Erker T, Ecker GF, Mulzer J, Hering S. **2010**. Valerenic acid derivatives as novel subunit-selective GABA_A receptor ligands – *in vitro* and *in vivo* characterization. *Br J Pharmacol.* 161: 65-78.

Kramer E, Aron L, Schulz J, Klein R. Aid system for aging nerve cells. Research report-Max Planck Institute of Neurobiology [serie en internet] **2008** [consultado 2016 abril 4] Disponible en: http://www.neuro.mpg.de/373976/research_report_328335?c=374257.

Lee Y, Lee S, Chang S-C, Lee J. **2019**. Significant roles of neuroinflammation in Parkinson's disease: therapeutic targets for PD prevention. *Archives of Pharmacal Research.* doi:10.1007/s12272-019-01133-0.

Lees AJ, Hardy J, Revesz T. **2009**. Parkinson's disease. *Lancet*. 373:2055-2066.

Malva JO, Santos S, Macedo T. **2004**. Neuroprotective of *Valeriana officinalis* Extracts. *Neurotoxicity Research*. 6(2): 131-140.

Masoud ST, Vecchio LM, Bergeron Y, Hossain MM, Nguyen LT, Bermejo MK, Kile B, Sotnikova TD, Siesser WB, Garnetdinov RR, Wightman RM, Caron MG, Richardson JR, Miller GW, Ramsey AJ, Cyr M, Salahpour A. **2015**. Increased expression of the dopamine transporter leads to loss of dopamine neurons, oxidative stress and L-DOPA reversible motor deficits. *Neurobiol Dis*. 74: 66-75.

M.F. Sanner. **1999** Python: a programming language for software integration and development. *J Mol Graph Model* 17.

Miyazaki I, Asanuma M. **2016**. Serotonin 1A Receptors on Astrocytes as a Potential Target for the Treatment of Parkinson's Disease. *Current Medicinal Chemistry* 23:686–700

Moehle MS, West AB. **2015**. M1 and M2 immune activation in Parkinson's disease: Foe and ally?. *Neuroscience*. 302: 59-73.

Morissette M, Morin N, Grégoire L, Rajput A, Rajput AH, Di Paolo T. **2016**. Brain $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in MPTP-lesioned monkeys and parkinsonian patients. *Biochemical Pharmacology*. 1-8. DOI:10.1016/j.bcp.2016.03.023.

Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. **2009**. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J Comput Chem* 30:2785–2791.

Moscovitz O, Ben-Nissan G, Fainer I, Pollack D, Mizrahi L, Sharon M. 2015.
The Parkinson's-associated protein DJ-1 regulates the 20S proteasome.
Nat Commun. 6: 6609.

Müftüoğlu M, Elibol B, Dalmizrak O, Ercan A, Kulaksiz G, Ogüs H, Dalkara T, Ozer N. 2004. Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations. Mov Disord. 19: 544-548.

Muthane U, Ramsay KA, Jiang H, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Fernando S, Ferrerira M, Prsedborski S. 1994. Differences in Nigral Neuron Number and sensitivity to 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57/bl and CD-1 mice. Experimental Neurology:195–204.

Nagarajan S, Chellappan DR, Chinnaswamy P, Thulasingam S. 2015. Ferulic acid pretreatment mitigates MPTP-induced motor impairment and histopathological alterations in C57Bl/6 mice. Pharmaceutical Biology 53:1591–1601.

Nam SM, Choi JH, Yoo DY, Kim W, Jung HY, Kim JW, Kang S-Y, Park J, Kim D-W, Kim WJ. 2013. *Valeriana officinalis* extract and its main component, valerenic acid, ameliorate D-galactose-induced reductions in memory, cell proliferation, and neuroblast differentiation by reducing corticosterone levels and lipid peroxidation. Exp Gerontol. 48: 1369-1377.

Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC. 2009. Molecular Neuropharmacology. Editorial Mc Graw Hill Medical. United States. 154-156.

National Center for Biotechnology Information. 2019a. Serotonin, CID=5202.
PubChem Database Available at:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Serotonin> [Accessed February 25, 2019]xidine.

National Center for Biotechnology Information. 2019b. Lysergic acid diethylamide, CID=5761. PubChem Database Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5761> [Accessed February 25, 2019].

National Center for Biotechnology Information. 2019c. Valerenic acid, CID=6440940. PubChem Database Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6440940> [Accessed February 25, 2019].

Noyce AJ, Bestwick JP, Silveira-Moriyama L, Hawkes CH, Giovannoni G, Lees AJ, Schrag A. **2012.** Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Ann Neurol.* 72: 893-901.

Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Benitez-Temino B, Blesa FJ, Guridi J, Marin C, Rodriguez M. **2008.** Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 23:S548-S559.

Olanow CW, Stern MB, Sethi K. **2009.** The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease. *Neurology.* 72(suppl 4): S1-S136.

Otero-Cerdeira E. **2012.** Enfermedad de Parkinson, un enfoque actual: Enfermedad de Parkinson con síntomas motores. Editor Carlos Zúñiga Ramírez. Editorial Alfil. México. 21-24.

Palacios N, Gao X, McCullough ML, Schwarzschild MA, Shah R, Gapstur S, Ascherio A. **2012**. Caffeine and risk of Parkinson's disease in a large cohort of men and women. *Mov Disord.* 27: 1276-1286.

Pereira RP, Fachinetto R, de Souza PA, Wagner C, Sudati JH, Boligon AA, Athayde ML, Morsh VM, Rocha JB. **2011**. Valeriana officinalis ameliorates vacuous chewing movements induced by reserpine in rats. *J Neural Transm.* 118 (11): 1547-1557.

Phani S, Loike JD, Przedborski S. **2012**. Neurodegeneration and inflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 18: S207-S209.

Pickrell AM, Youle RJ. **2015**. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron.* 85: 257-273.

Popat RA, Van Den Eeden SK, Tanner CM, McGuire V, Berntein AL, Bloch DA, Leimpeter A, Nelson LM. **2005**. Effect of reproductive factors and postmenopausal hormone use on the risk of Parkinson disease. *Neurology.* 65: 383-390.

Postuma RB, Aarsland D, Barone P, Burn DJ, Hawkes CH, Oertel W, Ziemssen T. **2012**. Identifying prodromal Parkinson's disease: pre-motor disorders in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 27: 617-626.

Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TDL. **2014**. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord.* 29: 1583-1590.

Pukass K, Richter-Landsberg C. **2014**. Oxidative stress promotes uptake, accumulation, and oligomerization of extracellular α -sinucleína in oligodendrocytes. *J Mol Neurosci.* 52: 339-352.

Quik M, Huang LZ, Parameswaran N, Bordia T, Campos C, Perez XA. 2009. Multiple roles for nicotine in Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol.* 78: 677-685.

Rodríguez M, Morales I, Rodríguez-Sabate C, Sánchez A, Castro R, Brito JM, Sabate M. 2014. The degeneration and replacement of dopamine cells in Parkinson's disease: the role of aging. *Front Neuroanat.* 8: 80.

Rodríguez-Cruz A. 2013. Estandarización de sustrato-ECL no comercial en análisis de expresión de receptores 5-HT_{5A} y de melatonina en linfocitos por Western Blot. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis que para obtener el grado de Químico Farmacéutico Biólogo.

Rodríguez-Cruz A, Romo-Mancillas A, Mendiola-Precoma J, Escobar-Cabrera JE, García-Alcocer G, Berumen LC. 2020. Effect of valerianic acid on neuroinflammation in a MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. *IBRO Reports.* 8:28-35. DOI: 10.1016/j.ibror.2019.12.002.

Rodríguez-Oroz MC, Jahanshahi M, Krack P, Litvan I, Macias R, Bezard E, Obeso JA. 2009. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. *Lancet Neurol.* 8: 1128-1139.

Roy A, Kucukural A, Zhang Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5:725–738.

Ryan BJ, Hoek S, Fon EA, Wade-Martins R. 2015. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. *Trends Biochem Sci.* 40: 200-210.

Samii A, Nutt JG, Ransom BR. 2004. Parkinson's disease. *Lancet*. 363(9423): 1783-1793.

Schapira AH, Jenner P. 2011. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 26: 1049-1055.

Schödinger. 2019. Release 2019-1 Maestro.

Schulz-Schaeffer WJ. 2010. The pathology of α -synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. *Acta Neuropathol*. 120: 131-143.

Segura-Aguilar J, París I, Muñoz P, Ferrari E, Zecca L, Zucca FA. 2014. Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 129: 898-915.

Seppi K, Weintraub D, Coelho M, Perez-Lloret S, Fox SH, Katzenschlager R, Hametner EM, Poewe W, Rascol O, Goetz CG, Sampaio C. 2011. The Movement Disorder Society evidence based medicine review update: treatments for the non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 26: S42-80.

Sominsky L, De Luca S, Spencer SJ. 2018. Microglia: Key players in neurodevelopment and neuronal plasticity. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 94:56-60.

Sudati JH, Fachinetto R, Pereira RP, Boligon AA, Athayde ML, Soares FA, de Vargas Barbosa NB, Rocha JBT. 2009. In vitro Antioxidant Activity of *Valeriana officinalis* Against Different Neurotoxic Agents. *Neurochem Res*. 34: 1372-1379.

Sudati JH, Vieira FA, Pavin SS, Dias GRM, Seeger RL, Golombieski R, Athayde ML, Soares FA, Rocha JBT, Barbosa NV. **2013**. *Valeriana officinalis* attenuates the rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *NeuroToxicology*. 37: 118-126.

Surmeier DJ. **2007**. Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 6: 933-938.

Tang Y, Li T, Li J, Yang J, Liu H, Zahang XJ, Le W. **2014**. Jmjd3 is essential for the epigenetic modulation of microglia phenotypes in the immune pathogenesis of Parkinson's disease. *Cell Death Differ*. 21: 369-380.

Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, Marras C, Bhudhikanok GS, Kasten M, Chade AR, Comyns K, Richards MB, Meng C, Priestley B, Fernandez HH, Cambi F, Umbach DM, Blair A, Snadler DP, Langston JW. **2012**. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect*. 119: 866-872.

Tansey MG, Goldberg MS. **2010**. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis*. 37: 510-518.

Taylor JM, Main BS, Crack PJ. **2013**. Neuroinflammation and oxidative stress: Co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. *Neurochemistry International*. 6: 803-819.

Tran HT, Chung CH-Y, Iba M, Zhang B, Trojanowski JQ, Luk KC, Lee VMY. **2014**. α -Synuclein immunotherapy blocks uptake and templated propagation of misfolded α -synuclein and neurodegeneration. *Cell Rep*. 7: 2054-2065.

Van Den Eeden SK. 2003. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol.* 157: 1015-1022.

Vidyadhara DJ, Yarreiphang H, Raju TR, Alladi PA. 2017. Admixing of MPTP-Resistant and Susceptible Mice Strains Augments Nigrostriatal Neuronal Correlates to Resist MPTP-Induced Neurodegeneration. *Molecular Neurobiology* 54:6148–6162

Villar del Fresno AM, Carretero-Accame ME. 2001. *Valeriana officinalis* Fitoquímica, farmacología y terapéutica. *Farmacia Profesional.* 15 (9): 98-106.

Wang S, Chen L, Wang Q, He Z, Chen S, Zhang H, Li H, Guo P, Li Q, Zhang R, Xing X, Zeng X, Lin W, Xiao Y, Dong G, Ma L, Gurram N, Zhang A, Chen W, Li D. 2019. Strain differences between CD-1 and C57BL/6 mice in expression of metabolic enzymes and DNA methylation modifications of the primary hepatocytes. *Toxicology.* 412: 19-28. DOI: 10.1016/j.tox.2018.11.011.

Wang Q, Liu Y, Zhou J. 2015. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Translational Neurodegeneration.* 4:1-9.

Xie W, Wan O, Chung K. 2010. New insights into the role of mitochondrial dysfunction and protein aggregation in Parkinson's disease. *Acta Biochim Biophys.* 1802: 935-941.

Yan J, Fu Q, Cheng L, Zhai M, Wu W, Huang L, Du G. 2014. Inflammatory response in Parkinson's disease (Review). *Molecular Medicine Reports.* DOI: 10:2223-2233.

- Yang J, Zhang Y. 2015.** I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research* 43:W174–W181.
- Yao K, Zhao YF. 2018.** Aging modulates microglia phenotypes in neuroinflammation of MPTP-PD mice. *Exp Gerontol.* 1(111): 86-93. DOI: 10.1016/j.exger.2018.07.010.
- Yoo DY, Jung HY, Nam SM, Kim JW, Choi JH, Kwak Y-G, Yoo M, Lee S, Yoon YS, Hwang IK. 2015.** *Valeriana officinalis* Extracts Ameliorate Neuronal Damage by Suppressing Lipid Peroxidation in the Gerbil Hippocampus Following Transient Cerebral Ischemia. *J Med Food.* 18(6): 642-647.
- Zhang C, Freddolino PL, Zhang Y. 2017.** COFACTOR: Improved protein function prediction by combining structure, sequence and protein-protein interaction information. *Nucleic Acids Research* 45:W291–W299
- Zucca FA, Basso E, Cupaioli FA, Ferrari E, Sulzer D, Casella L Zecca L. 2014.** Neuromelanin of the human substantia nigra: an update. *Neurotox Res.* 25: 13-23.
- Zúñiga-Ramírez C. 2012.** Enfermedad de Parkinson, un enfoque actual: Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson. Editor Carlos Zúñiga Ramírez. Editorial Alfil. México. 10-11.
- Zuo I, Motherwell MS. 2013.** The impact of reactive oxygen species and genetic mitochondrial mutations in Parkinson's disease. *Gene.* 532: 18-23.