

CREACIÓN, ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE PARKINSON IN VITRO

CREATION, STANDARDIZATION AND EVALUATION OF AN EXPERIMENTAL MODEL OF PARKINSON IN VITRO

Marisol Campuzano Castellanos¹, Liliana Francis Turner², Lina Ma. De los Reyes³

Grupo de Investigación en Modelos Experimentales para las Ciencias Zoohumanas.
Facultad de Ciencias. Programa de Biología. Universidad del Tolima

Recibido: Septiembre 30 de 2014

Aceptado: Octubre 10 de 2014

*Correspondencia del autor: maris491@hotmail.com

RESUMEN

La Enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a hombres y mujeres mayores de 65 años de edad. La disminución de las neuronas dopaminérgicas, en la sustancia negra (SNpc) causa pérdida de la función ejecutiva y enlentecimiento del procesamiento de la información. Los modelos experimentales *in vitro*, representan una alternativa para conocer el deterioro neuronal y disminuir el uso de animales en experimentación. Por lo anterior, se propuso crear, estandarizar y validar un modelo *in vitro* de la EP, como precedente para la evaluación de los mecanismos celulares implicados en la EP. Se establecieron cultivos primarios de mesencéfalo fetal de ratas Wistar de 13 días, fueron mantenidos con DMEM y medio Neurobasal, e incubados a 37 °C y CO₂ al 5%. El día 8 de cultivo se añadió la neurotoxina 6OHDA en diferentes concentraciones (nM): 25, 50, 75 y 100; se realizaron controles de supervivencia y de estrés oxidativo a las 2, 12, 24 y 48 horas de la aplicación de la neurotoxina, por inmunomarcaje de TH y tinción de Hoechst. El número de neuronas dopaminérgicas disminuye significativamente tras doce horas de exposición a la neurotoxina 6-OHDA, cuya dosis letal media según las dosis evaluadas, es a 25 nM, por tanto, el modelo de Parkinson *in vitro* basado en la lesión con 6 Hidroxidopamina evidencia similitud de la respuesta celular evaluada *In vivo*, representando un modelo alternativo para el estudio de los mecanismos implicados en la muerte neuronal y para disminuir el uso de animales de experimentación.

Palabras claves: Enfermedad de Parkinson, modelos experimentales, dopamina, cultivo *in vitro*

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a degenerative disease of the nervous system that affects both men and women over 65 years old, producing mental and physical disability, and even death. The decrease of dopaminergic neurons in the substantia nigra (SNpc) with inclusions in surviving neurons causes motor disorders, loss of executive function and slowing of information processing system. Experiments *in vitro* models represent an alternative for the neuronal damage at the cellular level and reduce the use of experimental animals to meet the standards stipulated by bioethics worldwide art (Agholme *et al.*, 2010). The object of this study was to create, standardize and validate an *in vitro* model of PD to be used in the evaluation of different substances with evidence of neuroprotective action. Primary cultures of embryonic midbrain Wistar rats 13 to 17 weeks (E-13 to E-17) were maintained in DMEM and Neurobasal medium settled, and were incubated at 37 ° C and 5% CO₂. On day 8 of culture the neurotoxin 6OHDA was added in different concentrations (nM): 25, 50, 75 and 100, in the different culture groups. Survival controls and oxidative stress at 2, 12, 24 and 48 hours after application of the neurotoxin for TH immunostaining and Hoechst staining were performed. It was observed a decrease in the number of dopaminergic neurons at 2, 12, 14 and 48 hours after neurotoxine 6-OHDA. Its lethal dose measured according to the evaluated doses. 25nM. Therefore, model Parkinson *in vitro* based on the lesion with 6 hydroxydopamine evidence similarity cell response assessed *In Vivo*, representing an alternative model for the study of the mechanisms involved in neuronal death and to reduce the use of experimental animals.

Keywords: Parkinson's disease, experimental models, dopamine, *in vitro* culture

INTRODUCCIÓN

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente en el mundo, después de la Enfermedad de Alzheimer. La EP es un trastorno neurodegenerativo crónico y progresivo que afecta a más de seis millones de personas en todo el mundo (Bové y Perier, 2012).

De acuerdo al estudio realizado por la EPIINFO, en Colombia hay alrededor de 180.000 afectados mayores de 50 años, aunque no se conocen datos certeros que informen el impacto de esta patología. El desarrollo de nuevas estrategias dirigidas a elucidar la fisiopatología y posibles tratamientos de esta Enfermedad se ha basado en el uso de modelos animales. Para esto, se han empleado modelos inducidos por toxinas que permiten conocer los mecanismos patogénicos asociados con la muerte neuronal y de esta manera generar alternativas para detener su progresión. Los modelos experimentales basados en la implementación de cultivos celulares se han convertido en una opción para estudiar dichos mecanismos y así reducir el uso de animales en la experimentación. Comúnmente, para el estudio de los mecanismos implicados en la EP, se utilizan neuronas aisladas de la sustancia nigra a partir de mesencéfalo de embriones de animales de experimentación

en etapas tempranas de desarrollo, debido a que se ha logrado establecer cultivos que permiten simular las condiciones y mecanismos que se manifiestan *in vivo* (Yang *et al.*, 2005). A partir de diferentes regiones cerebrales, ha sido posible establecer con éxito cultivos *in vitro* a partir de células madre de tejido neural. Algunos autores han logrado caracterizarlos por ensayos de formación de neuroesferas (Reynolds y Weiss, 1992), y han estudiado su capacidad para diferenciarse a neuronas y células gliales *in vitro* (Cai *et al.*, 2002;. Reynolds y Weiss, 1992;. Storch *et al.*, 2001, 2003).

Los cultivos fetales de neuronas, han sido utilizados como herramienta útil para estudiar características anatómicas, ontogénicas, propiedades electro fisiológicas y el repertorio de expresión molecular de las neuronas *in vitro*. La utilización de este modelo se incrementó recientemente por el aumento en los estudios de las vías de señalización intracelular y transducciones, que son más difíciles de estudiar en modelos *in vivo* (Mao y Wang, 2003). En general, estos cultivos fetales muestran su capacidad de diferenciación funcional a neuronas de dopamina (Potter *et al.*, 1999;. Storch *et al.*, 2001).

Teniendo como referencia estos estudios, se propuso la creación de este modelo como precedente para la eva-

luación de los mecanismos celulares implicados en las neuronas dopaminérgicas afectadas en la enfermedad de Parkinson. Para llevar a cabo estos objetivos, se estandarizaron las técnicas para establecer un cultivo de neuronas aisladas de mesencéfalo de origen embrionario y así inducir el modelo de Parkinson *in vitro* inducido con la toxina 6-Hidroxidopamina. De igual forma se compararon diferentes concentraciones de la neurotoxina y su efecto en las neuronas dopaminérgicas, para poder determinar la dosis letal media y de esa forma consolidar el modelo.

Adicionalmente se evaluó el tiempo óptimo para obtener una degeneración celular del 80 al 90 por ciento y su correlación con la concentración de la neurotoxina, datos que fueron imprescindibles para finalmente establecer el modelo *in vitro* de EP.

La estandarización del modelo de Parkinson *in vitro*, es una alternativa que permitirá el avance en el desarrollo de nuevos tratamientos para la neuroprotección de las células dopaminérgicas que se ven afectadas en esta enfermedad.

Materiales y Métodos

SUJETOS EXPERIMENTALES

Para la investigación se utilizaron 10 ratas Wistar convencionales, adultas, mayores a 3 meses. 7 hembras vírgenes y 3 machos con experiencia reproductiva y con peso corporal entre 210-250 gramos. Los animales fueron mantenidos en fotoperiodo 12/12, temperatura promedio de 21°C y humedad relativa del 70 – 80% con agua *ad libitum* y alimento racionado. Los animales se adquirieron y mantuvieron en el Bioterio de experimentación animal de la Universidad del Tolima. Bajo los principios Éticos de la Experimentación Animal, enunciados por ICLAS: International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS & CIOMS, 2012).

DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA CREACIÓN, ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE UN MODELO DE PARKINSON *IN VITRO*

Obtención de Tejido Mescencefálico de origen embrionario en Etapa 13 y Etapa 17 de desarrollo. Se realizó el apareamiento y seguimiento del ciclo estral de Ratas de la línea Wistar (*Rattus norvegicus*). Se consideró el día 0 (cero) de gestación, el día en el cual se observaron zooides y tampón de esperma en la hembra. Se controló

el peso y etapa del ciclo para comprobar la gestación. Como se muestra en la figura 6, en el día 13 de gestación (Etapa 13, E13), se extrajeron los mesencéfalos a partir de embriones en esta etapa de desarrollo embrionario siguiendo el protocolo de extracción propuesto y modificado de Jhonson M, 2009. El procedimiento se realizó de la misma manera en embriones en Etapa 17.

Establecimiento del Cultivo celular de Neuronas Dopaminérgicas. Se realizó la disgregación del tejido extraído siguiendo el protocolo de aislamiento neuronal y las células obtenidas fueron sembradas en cajas de Petri con coverslips previamente tratados con Poli-l Lysina, con una densidad de siembra de 100.000 células por coverslip, contadas en suspensión como lo indica el protocolo de conteo celular con cámara de Neubauer y luego se mantuvieron durante 6 horas en Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con suero fetal bovino al 10 % y P/S. Pasadas las seis horas se cambió el medio de cultivo a Medio Neurobasal suplementado con B27, glutamina y P/S, realizando cambio del 50 % de medio cada dos días hasta el día 8 de cultivo.

Lesión Neurotóxica con 6 Hidroxidopamina (6-OHDA). Para la creación del Modelo experimental de EP, se realizó lesión con la neurotoxina 6-OHDA a diferentes concentraciones (25, 50, 75 y 100 nM) para determinar la LD50 aplicada en el octavo día de desarrollo del cultivo y siguiendo el protocolo propuesto por Hanrott (2006), en el cual especifica que la neurotoxina debe aplicarse al cultivo y realizar una exposición por 15 minutos para originar la lesión y posteriormente retirarla mediante un lavado con el medio de cultivo empleado.

Seguimiento y evaluación del Daño dopaminérgico. Para validar los efectos producidos por la 6-OHDA, se retiraron los coverslips de los cultivos con lesión neurotóxica y fueron fijados con Metanol frío. El seguimiento se hizo a las 2, 12, 24 y 48 horas después de la exposición a la neurotoxina, para registrar la reacción de las neuronas dopaminérgicas tras ser lesionadas.

Inmunofluorescencia para la identificación de neuronas dopaminérgicas. Se realizó Inmunomarcaje con anticuerpo monoclonal Tirosina Hidroxilasa producido en Mouse (Sigma, ref. T2928) y anticuerpo fluorescente Alexa Fluor 488 antimouse, esto con el fin de conocer el efecto de la lesión sobre la población dopaminérgica.

Identificación celular con Tinción de Hoechst. Se rea-

lizó tinción con el colorante de Hoechst (Molecular Probes, ref. H3570). La tinción de Hoescht se realizó añadiendo una solución de Hoechst 33342 (1µg/mL) y son incubadas durante 5 minutos después de la inmunotinción con anti TH y observadas con microscopia de fluorescencia. Las imágenes fueron capturadas mediante el microscopio digital de inmunofluorescencia Fluid Cell Imaging Station de Life Technologies para la identificación de la población celular en fluorescencia y posteriormente se realizó el conteo en el programa de análisis de imágenes FIJI Image J. de libre adquisición.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza para datos paramétrico seguido de una análisis post hoc revelar las diferencias entre los grupos, de acuerdo a la variable dependiente número de células TH+.

RESULTADOS

En este trabajo se ha establecido un modelo *in vitro* de la EP, como precedente para el estudio de los mecanismos celulares que afectan a las neuronas dopaminérgicas implicadas en esta patología. De igual manera se ha logrado evaluar el método de lesión neurotóxica con 6-OHDA, consolidándolo como modelo experimental alternativo para la evaluación de posibles tratamientos que contribuyan a la protección y/o restauración del daño celular originado en la EP.

Obtención de neuronas dopaminérgicas a partir de tejido mesencefálico de rata Wistar.

LOS EMBRIONES EN E-13 Y E17 SON DIFERENTES MORFOLÓGICAMENTE, FACILITANDO SU RECONOCIMIENTO.

Durante el proceso de establecimiento del cultivo de neuronas fetales, se diferenciaron morfológicamente los embriones en etapas tempranas y tardías de desarrollo. Los embriones en etapas tempranas, (E13 y/o E14) son de menor tamaño y sus órganos internos no se encuentran bien definidos; no se observa una forma cerebral completa, se identifican claramente formas primarias del tubo neural lo que hace más fácil la extracción del tejido mesencefálico. Mientras que los embriones en etapas tardías de desarrollo (E-17 y/o E-18) tienen un mayor tamaño e incluso presentan movimiento, además sus órganos

están más diferenciados, entre esos el tronco encefálico (Jönsson, 2009).

Al igual que Jönsson M, 2009; se logró observar una mejor evolución en los cultivos de células mesencefálicas aisladas de embriones en E13. Esto se debe a que las conexiones neuronales aún no han comenzado a diferenciarse, lo que hace más fácil su establecimiento en el cultivo, ya que comienzan a enlazarse y a establecerse (ver figura 2). Por esto se recomienda emplear tejido mesencefálico de embriones en E13 para el establecimiento de cultivos celulares dopaminérgicos.

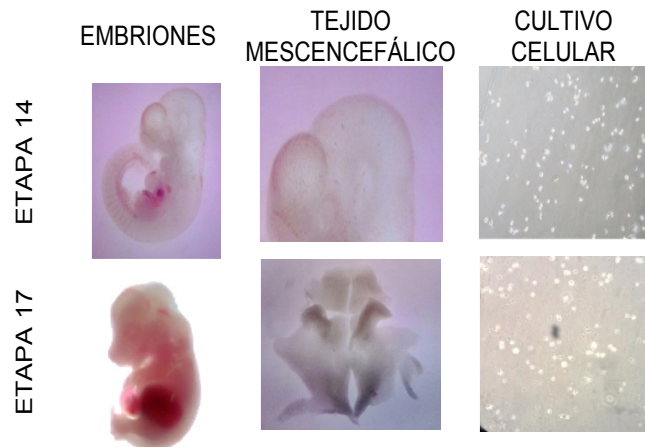


Figura 1. Etapas embrionarias escogidas para la obtención de neuronas dopaminérgicas a partir de tejido mesencefálico de rata Wistar. Se muestran la diferencia morfológica de embriones en etapa 13 y en etapa 17 de desarrollo embrionario. De igual forma se muestra el cultivo celular establecido a partir de mesencefalo de origen fetal.

Las condiciones ambientales en las cuales se mantienen los cultivos deben ser constantes y controladas estrictamente, debido a que alguna variación puede desencadenar la apoptosis o necrosis celular, convirtiéndose en un error metodológico en la aplicación del modelo (Jimenez y Merchant, 2003).

LA LESIÓN NEUROTÓXICA CON 6-OHDA, INDEPENDIENTE DE SU CONCENTRACIÓN, DISMINUYE LA ACTIVIDAD DOPAMINÉRGICA TRAS DOCE HORAS DE SU APLICACIÓN.

El uso de neurotoxinas para generar modelos de la EP ha sido la piedra angular de la investigación sobre la evolución y posible tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Luquin, 1998). La neurotoxina más ampliamente utilizada en el desarrollo de dichos modelos es la

6-OHDA (Luquin, 1998). En los cultivos se observó un número constante de células hasta el día de la lesión con 6 hidroxidopamina.

Comparando la cantidad de neuronas dopaminérgicas con marcaje positivo para tirosina hidroxilasa (TH), se encuentra diferencia significativa entre los grupos lesionados con 6-OHDA y el control en los diferentes tiempos después de la lesión, $F(4,15)=4,2470$, $p=,01701$ (Figura 3).

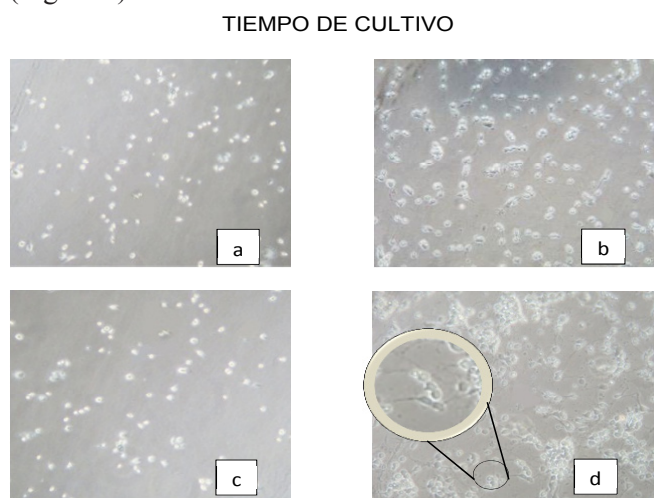


Figura 2. Cultivo de neuronas mesencefálicas obtenidas a partir de embriones en Etapa 13 de desarrollo embrionario. Se muestra la evolución en el crecimiento y aparición de proyecciones dendríticas en las primeras horas de evolución del cultivo (desde la figura a- d). a. Hora 0; b, 6 horas; c. 24 horas; d. 48 horas. En la figura d se amplía la imagen para observar proyecciones neurales.

Todas las dosis de 6-OHDA empleadas en este trabajo para producir lesión neurotóxica, producen daño celular en los cultivos, a partir de las doce horas después de su exposición. A las dos primeras horas después de la lesión, no se observa una acción significativa de la neurotoxina, por lo cual se afirma que el daño dopaminérgico se refleja es por efecto del tiempo y no de la concentración de la 6-OHDA, caso contrario a los resultados reportados por Hanrott, (2005), donde el aumento de la concentración de neurotoxina si tiene un efecto notable sobre los cultivos. Sin embargo, afirmamos que la dosis letal media que mejor representa el modelo de EP, es 25 nM, debido a que a esta concentración se genera una pérdida considerable de actividad dopaminérgica que simula lo ocurrido en la EP (ver figura 4). Por tanto, los datos reportados en esta investigación son un gran aporte sobre el efecto de pequeñas concentraciones de la neurotoxina 6-OHDA sobre los cultivos celulares de origen mesencefálico.

Al utilizar marcadores de ADN como el colorante Hoechst es posible observar el rompimiento celular causado por la acción de la toxina. Sin embargo, este efecto, evita utilizar este método para el conteo celular, debido a que horas después de la lesión, el ADN libre se agrupa formando una mancha que impide definir claramente las células presentes. En las primeras-

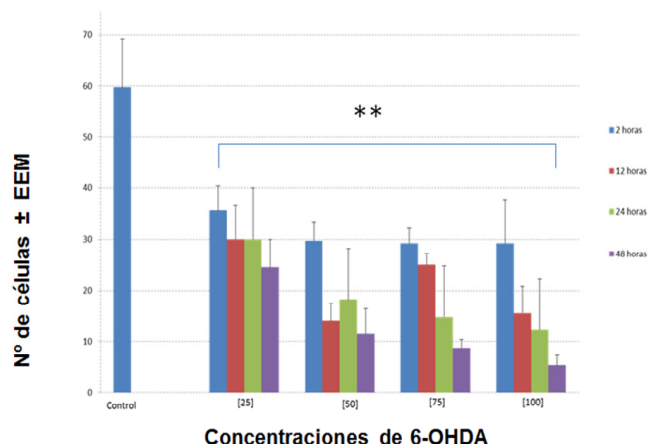


Figura 3. Comparación del número de neuronas con marcaje positivo para Tirosina Hidroxilasa después de la lesión con 6-OHDA, utilizando diferentes concentraciones de 6OHDA (25nM, 50nM, 75nM y 100nM, respectivamente), evaluados en diferentes tiempos (12, 24, 48 y 72 horas, respectivamente). Se observa una diferencia significativa con respecto al grupo control, $F(4,15)=4,2470$, $p=0,01701$.

horas de observación si fue posible observar que la lesión aumenta el número de células totales (tinción con Hoechst), aunque por limitantes metodológicas no fue posible emplear una tinción múltiple para identificar la aparición de otros tipos celulares no identificados como neuronas dopaminérgicas. Esto se logra explicar gracias a que otros autores describen que en modelos de lesión neurotóxica aumenta el número de células gliales como respuesta al daño dopaminérgico. De acuerdo a estudios realizados sobre el efecto de la microglía en modelos in vitro de la EP; la inflamación promovida tras un traumatismo cerebral, como por ejemplo la exposición a diferentes neurotoxinas, causa el aumento de la expresión de receptores dopaminérgicos en la microglía, proporcionando una vía común para la migración selectiva de células microgliales hacia las neuronas dopaminérgicas afectadas (Mastroeni et al., 2009; Falkeburger y Schulz, 2006). Por lo anterior se recomienda usar marcadores neuronales y gliales que puedan ser comparables gráficamente y de esta manera permitir la caracterización completa de los tipos celulares presentes en el cultivo.

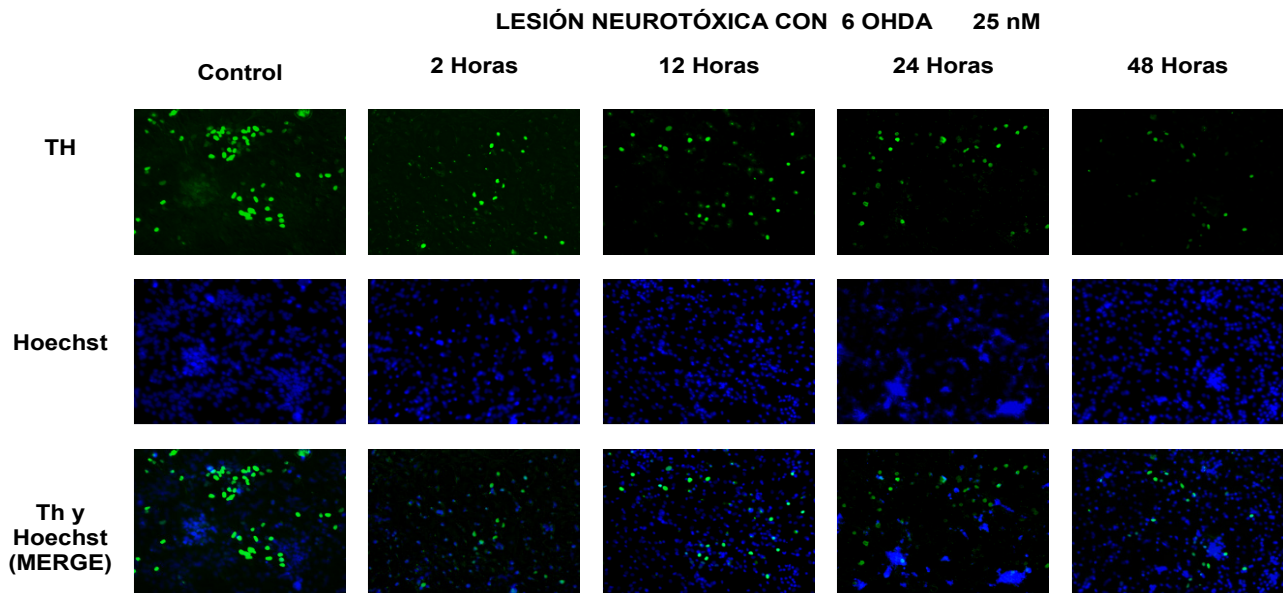


Figura 4. Inmunofluorescencia de Células cultivadas a partir de Mesencéfalo de embriones en etapa 13 y lesionadas con 6 OHDA (25 nM). Comparación de los cultivos a diferentes tiempos después de la lesión con 6-OHDA (25nM). Las fotografías muestran un número mayor de neuronas marcadas con TH en los controles respecto de los cultivos lesionados.

En esta investigación se logra demostrar que concentraciones bajas de la neurotoxina 6-OHDA producen la disminución de la actividad dopaminérgica de las neuronas mesencefálicas aisladas a partir de tejido mesencefálico embrionario; permitiendo la supervivencia de algunas neuronas dopaminérgicas y permitiendo demostrar que los efectos observados en el modelo propuesto en este trabajo, se asemejan a la respuesta celular que se observa en los modelos de la enfermedad de Parkinson *In vivo*, convirtiéndose en un modelo que permitirá indagar sobre sus posibles causas y tratamientos.

Los resultados de este estudio nos permiten concluir que los modelos experimentales *in vitro* de enfermedades neurodegenerativas representan una alternativa para el estudio de los mecanismos implicados en la muerte

celular. En este sentido, La aplicación de neurotoxinas *in vitro* permite simular los daños celulares que se originan en modelos *in vivo* de la enfermedad de Parkinson, convirtiéndose en un modelo que permitirá futuras investigaciones en la evaluación de posibles tratamientos que puedan contrarrestar los efectos de la EP; es por esto que La neurotoxina 6-OHDA a concentraciones de 25, 50, 75 y 100 nM, causa daño dopaminérgico observable después de las doce horas de exposición y se consolida como una neurotoxina eficiente para el modelo de la EP *in vitro*. En esta investigación se logró determinar que la dosis letal media de 6-OHDA aplicada en cultivos celulares de mesencéfalo es a 25 nM, siendo la dosis adecuada para simular lo sucedido en la EP *in vivo* y permitir la permanencia del cultivo por más días y así probar posibles tratamientos neurorestauradores como alternativa para el tratamiento de la EP.

BIBLIOGRAFÍA

1. af Bjerken, S., Marschinke, F., & Strömberg, I. (2008). Inhibition of astrocytes promotes long-distance growing nerve fibers in ventral mesencephalic cultures. *International Journal of Developmental Neuroscience : The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 26(7), 683–91. doi:10.1016/j.ijdevneu.2008.07.014
2. Agholme, L., Lindström, T., Kågedal, K., Marcusson, J., & Hallbeck, M. (2010). Linköping University Post Print An In Vitro Model for Neuroscience : Differentiation of SH-SY5Y Cells into Cells with Morphological and Biochemical Characteristics of Mature Neurons, (20), 1069–1082.
3. Alarcón Aguilar, Adriana; Santamaría del Ángel, Abel; Königsberg Fainstein, Mina . 2010. Modelos neurotóxicos de la enfermedad de parkinson y disfunción mitocondrial. *Revista de Educación Bioquímica de la Universidad Nacional Autónoma de México*. REB 29(3): 92-100. Bahena, R. F. G. A. J. (2000). Dopamina : síntesis , liberación y receptores en el Sistema, 11(1), 39–60.
4. Blanco L, Lorigado L, Serrano T, Francis L. (2010) “Aplicación del test de la barra transversal modificado para evaluar ratas hemiparkinsonizadas” . En: Colombia
5. *Acta Biologica Colombiana (Online)* ISSN: 1900-1649 ed: Facultad De Ciencias Universidad Nacional v.15 fasc.N/A p.1 - 25 ,
6. Blum, David et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson’s disease. In: *Progress in Neurobiology*. 2001. 65:135-172.
7. Bohnen Ni, Müller Ml, Koeppe Ra, Studenski Sa, Kilbourn Ma, Frey Ka, et al. History of falls in Parkinson disease is associated with reduced cholinergic activity. *Neurology*. 2009;17(20):1670-1676.
8. BOHNEN NI, ALBIN RL. The cholinergic system and Parkinson’s disease. *Behav Brain Res*. 2010;221(2):564-573.
9. Bové, J., & Perier, C. (2012). Neurotoxin-based models of Parkinson’s disease. *Neuroscience*, 211, 51–76. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.10.057
10. Campuzano M., Alcazar J., Francis L. (2013). “Efecto de dos dietas en la eficiencia reproductiva y desarrollo embionario en ratas de la Línea Wistar”. “memorias xlv congreso nacional de ciencias biológicas” en: Colombia.
11. Caudle, W. M., J. R. Richardson, et al. (2007). “Reduced vesicular storage of dopamine causes progressive nigrostriatal neurodegeneration.” *J Neurosci* 27(30): 8138-8148.
12. Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. *The biochemical basis of neuropharmacology*. 7th. Ed. New York/Oxford, Oxford University Press, 1996:293-351.
13. Charles MP, Adamski D, Kholler B (2003). Induction of neurite outgrowth in PC12 cells by bacterial nucleoside N6 metildioxadenosina is mediated through adenosine A2a receptor and via camp and MARK signalling pathways. *Biochem Biophys Res. Communication*: 304: 785-800.
14. Choi, H. K., L. A. Won, et al. (1991). “Immortalization of embryonic mesencephalic dopaminergic neurons by somatic cell fusion.” *Brain Res* 552(1): 67-76.
15. Datos CIP - Editorial Ciencias Médicas Fenton Tait María C Temas de Enfermería Médico-Quirúrgica/ María C. Fenton Tait, Carlos A. León Román.
16. La Habana: Editorial Ciencias Médicas: 2007 XVIII. 552p.
17. Eisenhofer, G., I. J. Kopin, et al. (2004). “Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine.” *Pharmacol Rev* 56(3): 331-349.
18. Fenton M. C. Tait. (2007). *Temas de Enfermería Médico-Quirúrgica*. Tercera parte. Datos CIP - Editorial Ciencias Médicas.
19. Fibiger HC. Mesolimbic dopamine: an analysis of its role in motivated behavior. *Semin Neurosci* 1993; 5:321-
20. Francis L. (2010) “memorias xlv congreso nacional de ciencias biológicas” en: colombia. Evento: xlv congreso nacional de ciencias biológicas ponencia:evaluación del trasplante de hm-sc- gpf+ sobre el deterioro motor en un modelo experimental de parkinson. Libro: , p. - , v. <, fasc.
21. Freund TF, Powell JF, Smith AD. Tyrosine hydroxylaseimmunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neurosci* 1984;

- 13:1189-215.
22. Gerhard, A., N. Pavese, et al. (2006). "In vivo imaging of microglial activation with [¹¹C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease." *Neurobiol Dis* 21(2): 404-412.
 23. Grenne JG., Greenamyre JT. (1996). Bionergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog Neurobiol* 48: 613-634.
 24. Guo, H., Tang, Z., Yu, Y., Xu, L., Jin, G., & Zhou, J. (2002). Apomorphine induces trophic factors that support fetal rat mesencephalic dopaminergic neurons in cultures. *European Journal of Neuroscience*, 16(10), 1861–1870. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.02256.x
 25. Hanrott, K., Gudmunsen, L., O'Neill, M. J., & Wonnacott, S. (2006). 6-hydroxydopamine-induced apoptosis is mediated via extracellular auto-oxidation and caspase 3-dependent activation of protein kinase Cdelta. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(9), 5373–82. doi:10.1074/jbc.M511560200
 26. Highlights. (2014). *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 312(1), 1–3. doi:10.1001/jama.2013.279585
 27. Höglinger, G. U., Sautter, J., Meyer, M., Spenger, C., Seiler, R. W., Oertel, W. H., & Widmer, H. R. (1998). Rat fetal ventral mesencephalon grown as solid tissue cultures: influence of culture time and BDNF treatment on dopamine neuron survival and function. *Brain Research*, 813(2), 313–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9838177>
 28. Innamorato, N. G. (n.d.). Papel del factor de transcripción Nrf2 en neuroinflamación y neurodegeneración en modelos experimentales de enfermedad de Parkinson Papel del factor de transcripción Nrf2 en neuroinflamación y neurodegeneración en modelos experimentales de enfermedad de P.
 29. International Council for Laboratory Animal Science & Council for international Organization of Medical Sciences. (2012). *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*. Recuperado de <http://iclas.org/wp-content/uploads/2013/03/CIOMS-ICLAS-Principles-Final.pdf>
 30. Jackson DM, Westlind-Danielsson A. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioral aspects. *Pharmacol Ther* 1994; 64: 291-369.
 31. Jiménez F., merchant H. *Biología Celular y Molecular*. 2003. Pearson Educación, México. 912p. Ke-babian JW, Calne DB. Multiple receptors for dopamine. *Nature* 1979; 277:93-6.
 32. Jönsson Marie (2009). . *Neurobiology of Aging* 30 :1805–1817 . Identification of dopamine neuron progenitors in the embryonic midbrain and stem cell cultures. Laboratory of Molecular Neurobiology Department of Medical Biochemistry and Biophysics Karolinska Institute, Stockholm. Lund University.
 33. Levitt M, Spector S, Sjoerdsma A, Udenfriend S. Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart. *J Pharmacol Exp Ther* 1965; 23:1493-501.
 34. Lesuisse C1, Martin LJ (2002). Long-term culture of mouse cortical neurons as a model for neuronal development, aging, and death. *J Neurobiol. Apr*;51(1):9-23.
 35. Limin Mao and John Q. Wang. Primary Striatal Neuronal Culture. *Methods in Molecular Medicine*, 2003, Volume 79, V, 379-386, DOI: 10.1385/1-59259-358-5:379.
 36. Lui C, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK, Reppert SM (1997). Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock *Neurons* 19(1): 91-102.
 37. Luquin, M^a del Rosario. (2000). Modelos Experimentales de la Enfermedad de Parkinson. En: *Revista de Neurología*. 31 (1):60-66.
 38. M M Dale; H P Rang; Maureen M Dale; et al 2011. Rang & Dale's pharmacology
 39. Mastroeni D., Grover A., Leonard B., Joyce J., Coleman P., Kozik B., Bellinger D., Rogers J. 2009. Microglial responses to dopamine in a cell culture model of Parkinson's disease.
 40. Meyer, A. K., Jarosch, A., Schurig, K., Nuesslein, I., Kißenkötter, S., & Storch, A. (2012). Fetal mouse mesencephalic NPCs generate dopaminergic neurons from post-mitotic precursors and maintain long-term neural but not dopaminergic potential in vitro. *Brain Research*, 1474, 8–18. doi:10.1016/j.brainres.2012.07.034
 41. Mínguez Mínguez S. (2013). Tesis doctoral. Enfermedad de Parkinson, estudios sobre la adherencia al tratamiento, calidad de vida y uso del meta-análisis para la evaluación de fármacos. Universidad de Castilla-La Mancha. Albacete. España.

42. Nagatsu T, Levitt M, Uderfriend S. Tyrosine hydroxylase: the initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem* 1964; 239:2910-7.
43. Pacini, E. (2002). Types of Pollen Dispersal Units in Orchids, and their Consequences for Germination and Fertilization. *Annals of Botany*, 89(6), 653–664. doi:10.1093/aob/mcf138
44. Parkinson, J. (1817). “An essay on the shaking palsy. 1817.” *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14(2):223-236; discussion 222.
45. Rössler, R., Boddeke, E., & Copray, S. (2010). Differentiation of non-mesencephalic neural stem cells towards dopaminergic neurons. *Neuroscience*, 170(2), 417–28. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.07.023
46. Ramos-Moreno, T., Lendínez, J. G., Pino-Barrio, M. J., Del Arco, A., & Martínez-Serrano, A. (2012). Clonal human fetal ventral mesencephalic dopaminergic neuron precursors for cell therapy research. *PloS One*, 7(12), e52714. doi:10.1371/journal.pone.0052714
47. Roger L. Albin, Anne B. Young, John B. Penney (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders
48. Salum, C., Raisman-Vozari, R., Michel, P. P., Gomes, M. Z., Mitkovski, M., Ferrario, J. E., ... Del Bel, E. a. (2008). Modulation of dopamine uptake by nitric oxide in cultured mesencephalic neurons. *Brain Research*, 1198, 27–33. doi:10.1016/j.brainres.2007.12.054
49. Sanchez J, Lopez D, Francis L, De los Reyes L. (2011). “Effect of estradiol and IGF-1 on the sodium Calcium Exchanger in rat cultured cortical neurons” . En: Estados Unidos Cellular And Molecular Neurobiology ISSN: 0272-4340 ed: Springer v.31 fasc. p.619 - 627 ,2011
50. Shimohama, S.; Sawada, H.; Kitamura, Y. Y Tamiguchi, T. Disease model.
51. Simola, N; Morelli, M; Carta, A. 2007. The 6-Hydroxydopamine model of Parkinson’s disease. *Neurotoxicity Research*. 11(3,4);151-167.
52. Smith M.P. y Cass W.A. Oxidative stress and dopamine depletion in an intrastriatal 6-hydroxydopamine model of Parkinson’s disease. In: *Neuroscience*. 2007. 144:1057-1066.
53. Smith, P. F. (2008). “Inflammation in Parkinson’s disease: an update.” *Curr Opin Investig Drugs* 9(5):478-484.
54. Schulz, J. B., J. Lindenau, et al. (2000). “Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration.” *Eur J Biochem* 267(16): 4904-4911.
55. SMITH M.P. y CASS W.A. Oxidative stress and dopamine depletion in an intrastriatal 6-hydroxydopamine model of Parkinson’s disease. In: *Neuroscience*. 2007. 144:1057-1066.
56. Yoo, M. et al. Oxidative stress regulated genes in nigral dopaminergic neuronal cells: correlation with the known pathology in Parkinson’s disease. In: *Molecular Brain research*. 2003. 110:76-84.