



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**EVALUACIÓN DE LOS POSIBLES EFECTOS  
ANTIPARKINSONIANOS DEL EXTRACTO ETANÓLICO  
DE *Nertera granadensis* EN RATONES**

**DIANA PATRICIA MOLANO PÉREZ**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad, Departamento de Farmacia  
Bogotá, Colombia

2022



**EVALUACIÓN DE LOS POSIBLES EFECTOS  
ANTIPARKINSONIANOS DEL EXTRACTO ETANÓLICO  
DE *Nertera granadensis* EN RATONES**

**DIANA PATRICIA MOLANO PÉREZ**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título  
de:

**Magister en Ciencias-Farmacología**

Director (a):

Ph.D., María del Pilar Olaya Osorio

Línea de Investigación:

Farmacología experimental del sistema nervioso central

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigaciones en Farmacología Molecular (FARMOL)

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad, Departamento de Farmacia  
Bogotá, Colombia

2022



## **Declaración de obra original**

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



---

**DIANA PATRICIA MOLANO PÉREZ**

Fecha 06/05/2022

## Agradecimientos

A mis padres quienes siempre han estado a mi lado apoyándome y guiándome en mi camino, a mi hija por ser mi motivación más grande para avanzar y ser mejor cada día.

A Dios padre por iluminar mi vida y darme la oportunidad de crecer como profesional y como persona.

Al profesor Luis Fernando Ospina, docente y director del Bioterio del Departamento de Farmacia por su apoyo y colaboración en el desarrollo de esta investigación.

A la profesora Maritza Rojas por proveernos el extracto etanólico de *Nertera granadensis* para poder realizar nuestra investigación.

## Resumen

### **Evaluación de los posibles efectos antiparkinsonianos del extracto etanólico de *Nertera granadensis* en ratones**

**Introducción:** La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo de carácter motor, de evolución progresiva y de curso prolongado; causado principalmente por la disminución de dopamina a nivel del cerebro la cual está íntimamente involucrada en la actividad motora, aunque hoy día se cuenta con una amplia gama de medicamentos para el control y manejo de la sintomatología en la EP, aún no se dispone de ningún fármaco que enlentezca la progresión de la enfermedad o que posea características de neuroprotección. La terapéutica está enfocada y adaptada al tratamiento de síntomas, tiempo de evolución, fase de la enfermedad y la discapacidad que conlleva. Actualmente el tratamiento de elección para el manejo de los síntomas motores asociados a la EP es la L-Dopa, precursor de la dopamina, pero a medida que transcurre el tiempo el tratamiento va perdiendo eficacia, debido a la evolución del deterioro neuronal, con lo cual la dosis debe ser ajustada e incrementada, y tras el uso crónico de la L-Dopa se pueden presentar importantes efectos adversos. Con el ánimo de buscar alternativas terapéuticas se ha dado espacio importante a la etnofarmacéutica y sus aportes como compuestos o prototipos para el desarrollo de nuevas alternativas coadyuvantes en el tratamiento de este tipo de enfermedades.

**Objetivo:** Evaluar los posibles efectos antiparkinsonianos del extracto etanólico de *Nertera granadensis* en ratones.

**Metodología:** Se empleó el modelo de reserpina como inductor de sintomatología parkinsoniana para poder evaluar los posibles efectos antiparkinsonianos del extracto de *Nertera granadensis*, así como los efectos de la asociación del extracto con levodopa/carbidopa. Además, se evaluó la posible actividad antioxidante del extracto por medio del ensayo de TBARs.

**Resultados:** En el modelo de reserpina la dosis de 300 mg/kg del extracto etanólico de *Nertera granadensis* presentó tendencia a revertir la hipocinesia. La asociación de esta dosis con levodopa/carbidopa presentó mejor respuesta comparada con el tratamiento individual del extracto. En la evaluación *ex vivo* de la actividad antioxidante, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, el control, ni el blanco.

**Conclusiones:** El extracto etanólico de *Nertera granadensis* no presentó efectos antiparkinsonianos significativos. Sin embargo, cuando se asocia con levodopa-carbidopa se observa una tendencia a mejorar el desempeño del animal.

**Palabras clave:** Enfermedad de Parkinson, *Nertera granadensis*, modelos animales.

## Abstract

### Evaluation of the possible antiparkinsonian effects of the ethanolic extract of *Nertera granadensis* in mice

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder of a motor nature, with a progressive evolution and a prolonged course; caused mainly by the decrease in dopamine in the brain, which is intimately involved in motor activity, although today there is a wide range of medications for the control and management of symptoms in PD, there is still no drug that slows the progression of the disease or that has neuroprotective characteristics. The therapy is focused and adapted to the treatment of symptoms, evolution time, phase of the disease and the disability that it entails. Currently, the treatment of choice for managing the motor symptoms associated with PD is L-Dopa, a precursor of dopamine, but as time goes by, the treatment loses efficacy, due to the evolution of neuronal deterioration, with which the dose must be adjusted and increased, and after the chronic use of L-Dopa important adverse effects can occur. With the aim of seeking therapeutic alternatives, important space has been given to ethnopharmaceuticals and their contributions as compounds or prototypes for the development of new alternatives that can help in the treatment of this type of disease.

**Goal:** To evaluate the possible antiparkinsonian effects of the ethanolic extract of *Nertera granadensis* in mice.

**Methodology:** The reserpine model was used as an inducer of parkinsonian symptoms in order to evaluate the possible antiparkinsonian effects of the *Nertera granadensis* extract, as well as the effects of the association of the extract with levodopa/carbidopa. In addition, the possible antioxidant activity of the extract was evaluated by means of the TBAR assay.

**Results:** In the reserpine model, the dose of 300 mg/kg of the ethanolic extract of *Nertera granadensis* showed a tendency to reverse hypokinesia. The association of this dose with levodopa/carbidopa presented a better response compared to the individual treatment of the extract. In the ex vivo evaluation of the antioxidant activity, no significant differences were found between the treatments, the control, or the blank.

**Conclusions:** The ethanolic extract of *Nertera granadensis* did not show significant antiparkinsonian effects. However, when associated with levodopa-carbidopa, a tendency to improve the performance of the animal is observed.

**Keywords:** Parkinson's disease, *Nertera granadensis*, animal models.

# Contenido

	<b>Pág.</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>VII</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	¡Error! Marcador no definido.
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas</b> .....	<b>15</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>17</b>
1. Marco teórico.....	19
1.1. Enfermedad de Parkinson.....	19
1.1.1. Antecedentes históricos.....	19
1.1.2. Etiopatología.....	21
1.1.3. Fisiopatología .....	25
1.1.4. Neuroquímica y mecanismos implicados en la EP.....	27
1.1.4.1. Síntesis de dopamina.....	28
1.1.4.2. Metabolismo de dopamina.....	28
1.1.4.3. Estrés Oxidativo.....	29
1.1.4.4. Apoptosis en células dopaminérgicas .....	30
1.1.5. Evolución Clínica de la enfermedad.....	31
1.1.6. Métodos de diagnóstico.....	32
1.1.7. Tratamiento.....	34
1.2. Familia Rubiaceae, origen y distribución.....	38
1.2.1. Características botánicas.....	39
1.2.2. Análisis fitoquímico de la familia Rubiaceae.....	40
1.2.3. Actividad biológica de la familia Rubiaceae.....	40
1.3. <i>Nertera granadensis</i> (Mutis ex L.f.) Druce.....	42
1.3.1. Características botánicas y clasificación taxonómica.....	42
1.3.2. Distribución en Colombia.....	44
1.3.3. Usos etnofarmacológicos.....	44

1.3.4 Actividad biológica de <i>Nertera granadensis</i> .....	45
1.3.5. Estudio fitoquímico de <i>Nertera granadensis</i> .....	45
1.3.5.1. Propiedades de los compuestos fitoquímicos de <i>Nertera granadensis</i> .....	45
1.4. Modelos animales experimentales para para evaluar actividad farmacológica antiparkinsoniana.....	49
1.4.1. 6-Hidroxidopamina (6-OHDA).....	50
1.4.2. Reserpina .....	50
1.4.3. Modelo MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina).....	52
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>3</b>
2.1 Objetivo general .....	53
2.2. Objetivos específicos .....	53
<b>3. Metodología</b>	
3.1. Animales.....	54
3.2. Extracto etanólico de <i>Nertera granadensis</i> .....	54
3.3. Modelo de antagonismo de reserpina .....	55
3.3.1. Campo abierto.....	56
3.3.2. Prueba de pole test.....	56
3.4. Modelo levodopa-carbidopa .....	57
3.5. Evaluación de la actividad antioxidante.....	58
3.6. Diseño experimental .....	59
3.7. Análisis de datos.....	60
<b>4. Aspectos éticos .....</b>	<b>61</b>
<b>5. Resultados y discusión.....</b>	<b>63</b>
5.1. Evaluación de los efecto antiparkinsonianos en el modelo de reserpina .....	64
5.1.1. Comportamiento motor evaluado en campo abierto.....	64
5.1.1. Comportamiento motor evaluado en pole test.....	65
5.2. Evaluación del efecto de la asociación entre levodopa/carbidopa y extracto de <i>Nertera granadensis</i> .....	67
5.2.1. Comportamiento motor de los animales en campo abierto.....	67

5.2.2. Comportamiento motor de los animales en Pole test.....	69
<b>5.3. Actividad antioxidante .....</b>	<b>72</b>
<b>6. Conclusiones y recomendaciones</b>	
6.1. Conclusiones.....	74
6.2. Recomendaciones .....	75
<b>A. Anexos .....</b>	<b>76-88</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>89</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Distribución de iridoides en los órdenes Lamiales, Cornales y Gentianales.....	47
<b>Figura 2.</b> Estructura del ácido ursólico. ....	49
<b>Figura 3.</b> Evaluación de los efectos del extracto de <i>Nertera granadensis</i> sobre la distancia recorrida 24 h .....	65
<b>Figura 4.</b> Efectos sobre el Pole test (giro) después de administrar los tratamientos a ratones con el modelo de reserpina. Evaluación a las 2 y 24 horas.....	67
<b>Figura 5.</b> Efectos sobre el Pole test (descenso) después de administrar los tratamientos a ratones con el modelo de reserpina. Evaluación a las 2 y 24 horas.....	68
<b>Figura 6.</b> Efectos sobre la distancia recorrida después de administrar los tratamientos más Levodopa-.....	69
<b>Figura 7.</b> Efectos sobre el Pole test (giro), después de administrar los tratamientos a ratones con el modelo de reserpina y tratados con L-Dopa-carbidopa. Evaluación a las 2 y 24 horas.....	71
<b>Figura 8.</b> Efectos sobre el Pole test (descenso), después de administrar los tratamientos a ratones con el modelo de reserpina y tratados con L-Dopa-carbidopa. Evaluación a las 2 y 24 horas.....	72
<b>Figura 9.</b> TBARs (Absorbancia a 532nm); cerebros animales de lo diferentes tratamientos evaluados en el modelo de reserpina y L-Dopa-Carbidopa.....	74
<b>Figura 10.</b> Efectos sobre la distancia recorrida después de administrar extracto de <i>Nertera granadensis</i> (300mg/kg) a nivel basal en ratones.....	89

## Lista de tablas e imágenes

Pág.

**Tabla 1.** Características de *Nertera granadensis* .....42

**Tabla 2.** Descripción del test neurológico.....80

**Imagen 1.** Evaluación de animales en pole test.....81

**Imagen 2.** Ratón normal observado en campo abierto.....83

**Imagen 3.** Ratón reserpinizado observado en campo abierto.....85

**Imagen 4.** Ratones tratados con L-Dopa -carbidopa .....88

## Lista de abreviaturas

<b>AAN</b>	Academia Americana de Neurología
<b>CAD</b>	Desoxirribonucleasa
<b>iCOMT</b>	Inhibidores de la Catecol – O – metiltransferasa
<b>iMAO-B</b>	Inhibidores de la monoaminoxidasa B
<b>ISAPD</b>	Escala intermedia para la valoración de la EP
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>MDS</b>	Sociedad de trastornos del movimiento
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento nervioso
<b>RCS</b>	Especies reactivas de cobre
<b>RIS</b>	Especies reactivas de hierro
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>TBARs</b>	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
<b>UKPDSBB</b>	Banco de cerebros del Reino Unido
<b>EP</b>	Enfermedad de Parkinson
<b>EPINEURO</b>	Estudio Neuroepidemiológico Nacional Colombiano

<b>MAO</b>	Monoaminoxidasa
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>MPTP</b>	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahidropiridina
<b>MPPP</b>	1-methyl-4-phenyl-4-propionoxipiperidina
<b>GB</b>	Ganglios basales
<b>NST</b>	Núcleo subtalámico
<b>Gpe</b>	Glóbulo pálido externo
<b>Gpi</b>	Glóbulo pálido interno
<b>GABA</b>	Ácido gamma-aminobutírico
<b>SNpc</b>	Sustancia negra pars compacta
<b>DAQ´s</b>	Quinonas de dopamina
<b>BH</b>	Tetrahidrobiopteridinas
<b>COMT</b>	Catecol-O-metiltransferasa
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>ON</b>	Óxido nítrico

## Introducción

Las enfermedades neurodegenerativas han adquirido gran protagonismo en prevalencia a raíz del envejecimiento de la población desencadenando un problema político- social y generando altos costes en los sistemas de salud. Estas enfermedades son definidas como patologías que desencadenan disfunción progresiva del sistema nervioso central con un mecanismo común de agregación y acumulación de proteínas, vulnerabilidad selectiva neuronal, estrés oxidativo y muerte cerebral (Ministerio de sanidad, 2016).

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda entidad neurodegenerativa con mayor prevalencia luego de la enfermedad de Alzheimer; cursa un proceso progresivo, lento y complejo; de manifestación en pacientes en edad adulta, por lo general mayores de 60 años y con mayor incidencia en hombres (Delamarre *et al*, 2017). Se caracteriza por su sintomatología extrapiramidal central, la cual incluye temblor en reposo, rigidez, bradicinesia, inestabilidad postural, acinesia y alteración en la marcha (Iwin *et al*, 2018; Martinez *et al*, 2016; Ariza *et al*,2016).

Actualmente, no se dispone de algún tratamiento que permita prevenir, retardar o detener la enfermedad, estos son básicamente para el manejo sintomático sin embargo, el conocimiento creciente de la cascada de eventos que desencadena la enfermedad permite analizar y diseñar nuevas estrategias terapéuticas que inhiban o frenen los procesos de apoptosis, estrés oxidativo, inflamación, modulación de

neurotransmisores excitotóxicos y dentro de estas líneas de investigación enfocadas a estos propósitos se encuentra la etnobotánica, la cual desarrolla múltiples investigaciones de plantas con carácter medicinal que podrían ser alternativas terapéuticas en la enfermedad de Parkinson (Mohamed *et al*, 2014)

Este estudio buscó contribuir en la investigación de posibles alternativas farmacológicas para la enfermedad de Parkinson, mediante la evaluación de los efectos antiparkinsonianos del extracto de *Nertera granadensis*, el cual en estudios preliminares desarrollados en el Departamento de Farmacia (grupo GIFFUN), presentó propiedades neuroprotectoras.

# 1. Marco teórico

## 1.1. Enfermedad de Parkinson

### 1.1.1. Antecedentes históricos

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo de carácter motor, de evolución progresiva y de curso prolongado; el temblor rítmico e involuntario es el síntoma más característico de la enfermedad, la cual se manifiesta particularmente en la población adulta mayor (Salamanca *et al*, 2004). Según datos históricos se registra la sintomatología del Parkinson desde la antigüedad, estos registros inician desde los años 2000 a 1500 aC, en estos textos (vedas) donde se describen personas temblorosas, con alteraciones en la concentración y el desarrollo del pensamiento. En la historia de la medicina china en los años 800 aC en el Nei-King se reporta personas con debilidad en la boca, salivación permanente, temblor en las manos y agitación de la cabeza, para el siglo I aC; Hipócrates (años 460-370 a.C), informó de hombres con temblores que se producen durante el movimiento consciente (Chaves-León *et al*, 2013).

Los primeros estudios y publicaciones oficiales del Parkinson se generaron en el año de 1817 por el cirujano Británico James Parkinson, quien atribuía la causa de la enfermedad a una alteración en la medula espinal, la cual podría extenderse hasta el bulbo raquídeo, destaca el hecho que no se presentaba “modificación del intelecto ni de los sentidos”. Parkinson integró en un único trastorno las diferentes

manifestaciones motoras de la enfermedad, las cuales hasta ese entonces se consideraban causales de diferentes entidades, las conclusiones de sus estudios se presentaron en la monografía “An essay on the shacking palsy”. En este escrito, Parkinson ofrece disculpas ya que la enfermedad descrita no ha sido objeto de estudios experimentales y no posee resultados anatómicos para mostrar. Posterior a él, en año 1880 Jean – Martin Charcot definió esta patología como la parálisis agitante, e incorporó la escopolamina como tratamiento para el temblor. Después de esto Félix Vica d’Azyr identificó la sustancia nigra del mesencéfalo y más de un siglo después Paul Blocq y Georges Marinesco establecieron la importancia de la sustancia negra y su papel en la EP, tras hallar un absceso en dicha estructura en un paciente tuberculoso quien padecía de temblor en el hemicuerpo contralateral. En 1895 Edouard Brissaud sugiere que la EP presenta además una etiología de carácter vascular. El patólogo alemán Friederich Lewy en 1913, describe los cuerpos que llevan su nombre (cuerpos de Lewy) y los postula como marcadores de la enfermedad (Arredondo-Blanco *et al*, 2018; Chaves-León *et al*, 2013).

A causa de la pandemia de influenza española que se desplegó entre 1918 y 1920, cinco millones de personas desarrollaron síntomas parkinsonianos tiempo después de haber padecido la influenza. Von Economo Constantin Trétiakoff en 1919, valida la hipótesis propuesta por Brissaud quien plantea pérdida de neuronas en el área del mesencéfalo tanto en el Parkinson idiopático como en el post encefálico. Hacia el año 1940 el tratamiento para la EP fue basado en los trabajos de Constantin Trétiakoff que eran de naturaleza quirúrgica, tratamiento el cual fue posteriormente modificado por Cooper, Fenelon y Guiot hacia el año de 1955. Un año después Arvid Carlsson afirmó que la sintomatología parkinsoniana se debía a la disminución en la concentración de dopamina; en sus estudios describe la forma en que la dopamina se distribuye en las distintas regiones del cerebro, sobre todo en los ganglios basales y su relación con el movimiento. Para el año 2000 se le otorga al Profesor Carlsson el premio Nobel de Fisiología. Con base a estos estudios, Hornikyewicz y Birkmayer en 1960, realizaron ensayos con Dopamina al

---

inyectarla a pacientes con Parkinson con resultados muy favorables. En 1967 George Constantin Cotzias, crea el primer método terapéutico efectivo para la EP al desarrollar levodopa (L-Dopa) en presentación oral en el Laboratorio Nacional Brookhaven de Nueva York, arrojando resultados muy efectivos, y hacia 1980 renace la idea del tratamiento quirúrgico al observarse que solo tratamiento con Levodopa no era suficiente para tratar la enfermedad, además de que este presentaba posteriores efectos secundarios que comprometían la calidad de vida de los pacientes; destacándose entre estas técnicas el abordaje de los ganglios basales mediante el implante de tejidos, estimulación profunda de estas estructuras además del núcleo subtalámico y la aplicación de la radiocirugía (Chaves-León *et al*, 2013; Ostrosky - Solis *et al*, 2000; Arredondo - Blanco *et al*, 2018).

### **1.1.2 Etiopatología**

Múltiples factores exógenos y endógenos se han relacionado como desencadenadores de la EP idiopática; dentro de los más relevantes están:

#### **a. Ambientales**

A comienzos de la década de los 80, un grupo de jóvenes se inyectaron vía intravenosa de MPTP, el cual es un subproducto de MPPP, semejante a la meperidina y con efectos muy similares a la heroína; estos sujetos en corto tiempo desarrollaron una serie de alteraciones de carácter motriz similares a las presentadas en la EP, hecho que sugirió la relación entre la exposición a sustancias tóxicas ambientales y su causalidad en la EP idiopática. En países de desarrollo industrial, se ha demostrado en la población con actividades agrícolas, una relación dosis - efecto entre la exposición a pesticidas como el paraquat y la rotenona (8.1%) con el inicio tardío de la EP; de igual manera esta asociación se vio reflejada en

personas con actividad en la industria metalúrgica con exposición a plomo y cobre (3.9%) (Hurtado *et al*, 2016).

## **b. Genéticos**

En estudios de prevalencia de pacientes con EP, la gran mayoría no presentan antecedentes familiares; ya que la presentación de la enfermedad es de carácter esporádico siendo el envejecimiento el primer factor de riesgo; sin embargo, se estima que un 15% de estos pacientes tienen un familiar en primer grado que ha presentado o presenta la enfermedad (Guerrero-Díaz *et al*, 2007). Algunas formas de EP de incidencia genética se identificaron en un principio y se relacionaron como factor primario desencadenante en pacientes jóvenes (<40 años), los cuales se asociaron con una herencia autosómica recesiva (Martínez-Fernández *et al*, 2016). A raíz de estos estudios, se han identificado 11 genes y 3 locus tanto de carácter dominante y recesivo relacionado con el inicio temprano de la enfermedad (Castro-Toro *et al*, 2014). Estos hallazgos permitieron comprender de mejor manera los procesos moleculares subyacentes a la EP, funciones intracelulares de transmisión sináptica, el transporte en vesículas, vías lisosómicas, endosómicas así como la función mitocondrial (Delamarre *et al*, 2017).

El primer gen identificado y asociado a la EP fue el SNCA – gen que codifica para  $\alpha$ -sinucleína, ubicado en el brazo largo del cromosoma 4, de transcripción autosómica dominante, presenta seis formas de mutaciones (A53T, E46P, A30P, H50Q, G51D y A53E) de las cuales algunas son las responsables de la formación de oligómeros y fibrillas (cuerpos de Lewy), por otro lado la presentación de una copia extra de la  $\alpha$ -sinucleína (triplicación del locus) también desencadena la EP (Delamarre *et al*, 2017; Vidrio-Morgado *et al*, 2007). Los genes; Quinasa 2 de repetición rica en leucina (LRRK2) representa el 4% de la EP hereditaria, y VPS35

---

el cual representa el 1% del Parkinson hereditario, y sus mutaciones G2019S y R1441G / C / H , y VPS35 respectivamente; son los más frecuentes, y están asociadas a la EP de inicio tardío, su actividad está asociada al transporte por vesículas, y el tráfico de catepsina D, que está implicado en la degradación de la alfa-sinucleína, la autofagia y función mitocondrial desencadenando pérdida de la función (Delamarre *et al*, 2017).

Las mutaciones en el gen que codifica a la parkina (PARK2), son de herencia autosómicas recesivas, llevan a la pérdida de la regulación en la degradación de sustratos al carecer de la acción de ligasa de las proteínas ubiquitinadas (PARK5, UCH-L1), por la disfunción del sistema ubiquitina-proteasoma, lo que genera una alteración en la morfogénesis celular así como en la respuesta inmunológica y de inflamación (Pineda-Trujillo *et al*, 2009), por otro lado, la parkitina mutada al interactuar con la sinfilina, proteína asociada a la  $\alpha$ -sinucleína contribuye a la formación de inclusiones citoplasmáticas similares a los cuerpos de Lewy (Vidrio-Morgado *et al*, 2007).

El gen Daisuke-Junko-1 (DJ1) (PARK6- PINK1) está relacionado como un factor protector de las neuronas dopaminérgicas al estrés oxidativo al regular la translocación PINK1-Parkin a las mitocondrias, como un sistema de control de calidad mitocondrial, con lo cual cuando se presenta la mutación, la forma mitocondrial sufre alteraciones y se presenta un aumento en los niveles de estrés oxidativo por el incremento de ROS (Pickrell *et al*, 2014; Vidrio-Morgado *et al*, 2007).

Otras mutaciones se han identificado como desencadenantes de la EP y algunos están catalogados en el genotipo clínico de desarrollo juvenil, siendo estas de baja incidencia con menos del 1% prevalencia. Mutaciones en el gen CHCHD2, el cual se encuentra en el cromosoma 7 están implicado de igual manera en la alteración

del complejo respiratorio mitocondrial, y ha sido descrito en familias japonesas; el gen PLA2G6 se asocia a EP sensible a la levodopa, contribuyendo a la neurodegeneración mediada por este fármaco. El gen ATP13A2 ha identificado como el promotor de la EP juvenil (Kufor Rakeb), los genes DNAJC6 y FBXO7 se describe en la respuesta dopa-juvenil con signos piramidales como paraplejia espástica. Mediante estos mecanismos, se genera el deterioro de las neuronas de la sustancia negra pars compacta, y durante este proceso hay participación muy significativa del estrés oxidativo (Delamarre *et al*, 2017; Vidrio-Morgado *et al*, 2007).

### **c. Factores microbiológicos**

Recientemente se ha identificado la relación entre toxinas producidas por parásitos y su posible incidencia en la EP e incluso en otras enfermedades neurodegenerativas, como es el caso de las cianobacterias, ya que al ser ingeridas la neurotoxina BMAA (Beta\_metilamino-L-alanina) es la causa sospechosa de desarrollo de esclerosis lateral amiotrófica junto con el complejo Parkinson-Demencia (Galetovic *et al*, 2017), de igual manera la toxina N-metilamino-l-alanina se ha asociado a retinopatías pigmentarias en pacientes con EP (Castro-Toro *et al*, 2014). Por otra parte, se ha demostrado que la infección por *Toxoplasma gondii* en SNC afecta enormemente al cerebro, al activar el sistema inmune y liberándose citoquinas inflamatorias (IFN $\gamma$ ) y produciéndose metabolitos tóxicos como el óxido nítrico llevando a la degeneración de las neuronas productoras de dopamina (Mhami-Oskouei *et al*, 2016).

### 1.1.3. Fisiopatología

El trastorno neurodegenerativo (abiotrofia) en la EP es de etiología idiopática, causado principalmente por la disminución de dopamina a nivel del cerebro la cual está íntimamente involucrada en la actividad motora y en la memoria; entre otras funciones, los bajos niveles de dopamina se presentan a causa del deterioro y muerte de las neuronas dopaminérgicas, en el área ventral en la sustancia negra pars compacta del mesencéfalo, por lo cual se desencadenan problemas motores. A raíz de ello no se ha podido reconocer claramente una etapa temprana de la enfermedad debido a la latencia entre el primer daño de células dopaminérgicas y el inicio de los síntomas clínicos los cuales por lo general no se desarrollan hasta una pérdida de neuronas dopaminérgicas de entre el 70 y 80% (Emamzadeh *et al*, 2018; Estrada *et al*, 2010).

El principio fisiológico de la EP se da a causa de la disfunción del sistema de ganglios basales (GB) debido a la disminución de la dopamina. Los GB son núcleos subcorticales conformados por el núcleo estriado (caudado y putámen), el núcleo subtalámico (NST), el glóbulo pálido externo (Gpe) e interno (Gpi) junto con el núcleo ventro-lateral del tálamo. Las interconexiones anatómicas y funcionales entre estos núcleos están mediadas por una intrincada red córtico – sub cortical de proyecciones que va desde el complejo glóbulo pálido interno/ Sustancia negra pars reticulata (Gpi/SNpr) hacia el tronco cerebral (out put), esta red forma los circuitos motor (porción dorso-lateral de los GB, sobre el cortex motor primario y el área motora suplementaria), límbico (porción ventromedial de los núcleos) y asociativo o cognitivo (cortex prefrontal) (Martinez-Fernandez *et al*, 2016).

El cuerpo estriado es la principal región de entrada de neuronas aferentes de diversas regiones de la corteza cerebral como son la motora, premotora, el cíngulo, las prefrontales y los núcleos intralaminares del tálamo. Las regiones principales de salida de neuronas eferentes son el Gpi y la SNpr que se proyectan a las regiones corticales y al tronco cerebral y se modulan por la actividad del tálamo. Estas zonas de entrada y salida se conectan a través de vías directas (receptores D1, inhibe el Gpi y la SNr) e indirectas (receptores D2, inhibe el Gpe y el NST) provenientes de las neuronas espinosas de la matriz del estriado. Las neuronas espinosas de la zona media del núcleo estriado controlan las proyecciones dopaminérgicas desde la sustancia negra pars compacta (SNpc). El principal neurotransmisor presente en los circuitos de los GB es el ácido gamma-aminobutírico (GABA), mientras que el del NST es el glutamato, y de la SNpc es la dopamina. En la EP, el STN ejerce una influencia excitadora en el GPi y SNpr, estos envían una señal inhibitoria al núcleo lateral ventral del tálamo, posteriormente, la depresión de dopamina por parte de las neuronas nigroestriales (SNpc) no permite la activación de la vía directa en la cual la información de la corteza pasa por el cuerpo estriado, el GPe, NST y se dirige hacia los GB para comunicarse con el tálamo, con lo cual se presenta una prevalencia de la vía indirecta sobre la directa genera un aumento en la actividad neuronal en los núcleos de salida de los GB conduciendo a una inhibición excesiva de los sistemas motores tálamo – cortical del tronco (Magrinelli *et al*, 2016).

Una característica en la patología de la EP es la presencia de cuerpos de Lewy, éstos pueden aparecer en fases tempranas de la enfermedad; estos presentan diferentes características en su conformación de acuerdo a la topografía anatómica en la cual se encuentren. Los cuerpos de Lewy presentes en el tronco encefálico son inclusiones intracitoplasmáticas con núcleo eosinofílico filamentoso denso granular y un halo circundante de filamentos orientados radialmente más claros. Estudios publicados en 2012, han identificado compuestos de tau formando las marañas neurofibrilarias en el núcleo de los cuerpos de Lewy, este fenómeno se

presenta por una por alteración en los genes familiares MAPT y SCNA para tau y  $\alpha$ -sinucleína respectivamente, con lo cual se observan formas hiperfosforiladas de manera patológica de estas (Gómez-Chavaraín *et al*, 2012; Benoit-Waxman *et al*, 2011).

Algunos factores genéticos se consideran igualmente como agentes causantes de la formación de los cuerpos de Lewy, de estas las más relevantes en los procesos implicados en la formación de los cuerpos de Lewy son las mutaciones sobre las proteínas parkina y ubiquitina c terminal hidrolasa (UCHL1) debido a que estos originan acumulación de dopamina en el citoplasma neuronal, al favorecer la formación de poros en las vesículas sinápticas permitiendo la salida de dopamina de la vesícula hacia el citosol, adicionalmente se reduce la eliminación de formas tóxicas de  $\alpha$ -sinucleína, afectando el adecuado funcionamiento de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigro estriatal y llevando a la muerte de las neuronas afectadas (Gómez-Chavaraín *et al*, 2012).

#### **1.1.4. Neuroquímica y mecanismos implicados en la EP**

Aunque la etiología molecular exacta en las enfermedades neurodegenerativas aún se desconoce, se han propuesto algunas hipótesis que puedan dar explicación a este fenómeno. Muchos de los hallazgos patológicos comunes apuntan a compartir desórdenes degenerativos asociados a procesos como el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la reacción inflamatoria principalmente, sin embargo se ha identificado que la dopamina (DA) y sus metabolitos oxidados generan daño en las neuronas dopaminérgicas, las quinonas de dopamina (DAQ's), como se les conoce a estos metabolitos, se producen en gran cantidad en el estrés oxidativo crónico que se presenta en la EP desencadenando neurodegeneración dopaminérgica progresiva (López-D *et al*, 2008).

### **1.1.4.1. Síntesis de dopamina**

La dopamina es uno de los neurotransmisores catecolaminérgicos más importantes del sistema nervioso central (SNC), regula la conducta motora, la emotividad, la afectividad y la comunicación neuroendocrina, esta se sintetiza en gran proporción en el SNC, y de manera limitada en la medula suprarrenal. La síntesis de catecolaminas se lleva a cabo en dos pasos enzimáticos, la tirosina hidroxilasa (TH), que cataliza la conversión de L-tirosina a L-dopa (L-3,4-dihidroxifenilalamina), para ello requiere de oxígeno ( $O_2$ ) y moléculas de hierro ( $Fe^{2+}$ ) así como del cofactor de tetrahidrobiopteridinas (BH). Luego la L-dopa es convertida en dopamina (3,4-dihidroxifenil-etamina) por acción de la L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC), ambos pasos se llevan a cabo en el citosol de la terminal dopaminérgica (López-D *et al*, 2008; Hastings, 2009).

Una vez sintetizada la DA es incorporada a las vesículas sinápticas por los transportadores de monoaminas vesiculares del tipo 2 (VMAT2) a través de la bomba ATP-protón dependiente, este genera adicionalmente un gradiente ácido produciendo la forma activa  $DA^+$ . La entrega de la DA en los espacios sinápticos es mediada por canales de calcio sensibles a voltaje; los cuales permiten la fusión de la membrana de las vesículas con la membrana neuronal (López-D *et al*, 2008).

### **1.1.4.2. Metabolismo de dopamina**

El metabolismo de la DA es de tipo oxidativo, la mono amino oxidasa (MAO), la cual se encuentra en el interior de la terminal nerviosa, es su principal vía de catabolismo, en este proceso se producen peróxidos de hidrógeno y el metabolito ácido di-hidroxi-fenil-acético (DOPAC), el cual es posteriormente es liberado de la

---

terminal dopaminérgica para ser convertido en ácido homovanílico (HVA) por acción de la catecol-O-metiltransferasa (COMT). La dopamina no capturada por la terminal dopaminérgica es metabolizada en HVA por la acción secuencial de las enzimas COMT y MAO (Bahena-Trujillo *et al*, 2000; Segura- Aguilar *et al*, 2014; López-D *et al*, 2008).

### 1.1.4.3. Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo se presenta cuando hay un aumento en la producción de radicales libres y minimización de los sistemas antioxidantes endógenos como son enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (Cat), y glutatión peroxidasa (GPx), así como los atrapadores de RL y antioxidantes como el glutatión reducido (GSH), el ascorbato o vitamina C y el  $\beta$ -caroteno, precursor de la vitamina (Martínez-Lazcano *et al*, 2010). Este desbalance del redox (balance oxido-reducción) genera un daño celular severo que puede llevar a la muerte de la célula. En la EP, la presencia de la de la disfunción mitocondrial por alteración de la actividad del complejo I también conocido como NADH deshidro-genasa (ubiquinona-oxidoreductasa) y el estrés oxidativo se evidencia en la vía nigroestriatal generando un subsecuente aumento de la vulnerabilidad celular y disminución de DA. Sin embargo; la DA es una fuente de radicales libres durante la catalización de ésta por la MAO, bajo condiciones de estrés oxidativo, la estructura química del DA tiene la propiedad de transformarse en una toxina endógena conocida como quinona de dopamina (DAQ), que contribuirá aún más a la disfunción mitocondrial y al daño oxidativo acelerado (López-D *et al*, 2008; Hastings, 2009; Flint-Henchcliffe *et al*, 2008).

Cuando el almacenamiento de la DA en las vesículas es alterado por las protofibrillas de  $\alpha$ - sinucleína, los niveles de DA se aumentan en el citosol y se

empieza a desarrollar un proceso en el cual se forman metabolitos reactivos de DA por dos vías distintas:

Un primer camino es por la MAO localizada en la superficie exterior de las mitocondrias que metaboliza la DA a DOPAC formando  $H_2O_2$  en el proceso. El segundo camino implica la oxidación del anillo catecol de la DA para formar ROS (especies reactivas de oxígeno) y la orto quinona de DA (DA-o-Q) deficiente en electrones. La autooxidación de la DA puede ser facilitada por la presencia de iones de metales de transición (Fe, Cu), o puede oxidarse enzimáticamente actuando como un cosustrato en la reacción catalizada (Angora-Pérez *et al*, 2007).

Las DA-o-Q deficientes en electrones, así como las ROS desencadenadas en el proceso de oxidación de la DA oxidan componentes celulares como lípidos y proteínas, la deficiencia de electrones que caracteriza a las quinonas también pueden reaccionar con nucleótidos celulares y llevar a la citotoxicidad, esto desencadena una entrada no controlada de sodio y agua lo que genera una alteración en las concentraciones de electrolitos, se aumenta la liberación de óxido nítrico (ON) y calcio mitocondrial, hecho que genera la estimulación en la producción de interleucinas inflamatorias, citocinas y ciclo-oxigenasa 2 causando gliosis e incremento del estrés oxidativo y posterior muerte celular (Angora-Pérez *et al*, 2007; López-D *et al*, 2008; Hastings, 2009; Pérez *et al*, 2000).

#### **1.1.4.4. Apoptosis en células dopaminérgicas**

La alteración en el complejo I mitocondrial es el proceso precursor a la apoptosis dependiente de la mitocondria, a través del daño oxidativo y la activación de la proteína pro-apoptótica Bax a través de los mecanismos oxidativos y la impermeabilización de la membrana externa de la mitocondria (MOMP), lo que

provoca la liberación del citocromo c y la activación de la cascada de las caspasa a causa de la formación de poros por la Bax, la cual se activa por el factor de transcripción p53 quien induce su transcripción y luego esta sufre una translocación mitocondrial, lo cual en última instancia desencadena la muerte celular (Perier *et al*, 2007).

Las caspasas son una familia de cisteínas proteasas que inactivan las proteínas de supervivencia celular y activan las proteínas pro apoptóticas en un complejo amplificador. Se han categorizado dos tipos de caspasas; las primeras están involucradas en la fase de inicio de la muerte celular apoptótica llamadas caspasas iniciadoras, de las cuales las más significativas son la caspasa -8 y la caspasa 9, las segundas son las caspasas ejecutoras o “verdugo”, las cuales son las 3, 6 y 7, las cuales son las responsables del rompimiento de numerosos sustratos, lo que finalmente conduce a la muerte celular. Las caspasas iniciadoras son activadas por el citocromo C liberada en el citoplasma, quien en conjunto con la Apaf -1 (factor de activación de la proteasa apoptótica-1), ATP y procaspasa 9 forman el apoptosoma, quien activa la caspasa 9, la cual se encarga de la activación de la desoxirribonucleasa (CAD) induciendo la fragmentación de DNA que conduce a la muerte celular por apoptosis al separarlo del inhibidor ICAD (Perier *et al*, 2012).

### **1.1.5. Evolución Clínica de la enfermedad**

Los signos típicos en la EP son el temblor de reposo el cual es de carácter oscilante, de gran amplitud y se manifiesta cuando los músculos están relajados, se detecta en las primeras etapas de la enfermedad en un 70% de los pacientes. Con la progresión de la enfermedad aparece el deterioro de las llamadas manifestaciones axiales, las cuales incluyen rigidez o inflexibilidad de los músculos limitando los movimientos llegando en algunas ocasiones a ser incómoda y hasta dolorosa para

el paciente, se presenta como movimientos en rueda dentada en las extremidades superiores, bradicinesia de brazos durante la marcha, de igual manera se puede apreciar contracción en la escritura o micrografía a causa de la dificultad con las acciones motoras de las manos. La retropulsión o inestabilidad postural y la pérdida del equilibrio a causa de la disipada acción de los reflejos para mantener la postura erguida se observa en la tendencia del paciente a inclinarse hacia atrás al levantarse de la silla, pararse o girar. La congelación de la marcha ocurre cuando el paciente comienza a caminar, este describe sentir los pies pegados al suelo por lo que vacilan antes de avanzar, sin embargo, luego del primer paso generalmente las personas continúan con una marcha normal, aunque la retropulsión es la principal causa de las lesiones por caídas, también se presenta este riesgo en la fase de congelación (Magrinelli *et al*, 2016; Martínez-Fernandez *et al*, 2016).

Las manifestaciones de etapa avanzada en la EP se presentan por la pérdida de la inervación dopaminérgica. La clasificación de estas manifestaciones en la EP permite identificar subtipos, lo cual determina predominio tremórico con ausencia relativa de otros síntomas, y el predominio no tremórico que incluirá el fenotipo rígido ascínético y aquellos con inestabilidad y trastorno de la marcha conocido como PIGD: “postural instability and gait disorder”. Esta diferenciación tendría implicaciones pronósticas ya que el curso de la enfermedad difiere entre los subtipos, siendo los de predominio tremórico de evolución más lenta, menor incapacidad y menor riesgo de deterioro cognitivo que aquellos no tremóricos (Martínez-Fernandez *et al*, 2016; Garnica-Fernández, 2009).

### **1.1.6. Métodos de diagnóstico**

El diagnóstico en la EP se realiza por sospecha clínica, un diagnóstico definitivo requiere de la confirmación de hallazgos neuropatológicos, en los cuales se pueda observar la degradación neuronal en el sistema nervioso central y la presencia de

---

cuerpos de Lewy, desafortunadamente este tipo de diagnóstico solo se puede realizar tras el fallecimiento del paciente, sin embargo, los criterios clínicos de referencia son los proporcionados por el banco de cerebros del Reino Unido (UKPDSBB), los cuales permiten identificar con una precisión del 75 al 95% la EP (Martínez-Fernández *et al*, 2016; Estrada *et al*, 2010).

A raíz de ello, se desarrolló una serie de parámetros por parte de la Academia Americana de Neurología (AAN), conocidos como los parámetros de Gelb. Estos parámetros dan una precisión en diagnóstico de la EP en un 83.9%, una sensibilidad del 81.3% y una especificidad del 83,5%. Ambos criterios, UKPDSBB y AAN se enfocan sólo en las características motoras que responden más o menos a los tratamientos con levodopa, incluidos los trastornos del sueño, del estado de ánimo, el fallo autonómico, problemas sensoriales y deterioro cognitivo; aunque este último ha sido cuestionado y de hecho se ha considerado un factor excluyente ya que puede ser un diagnóstico alternativo de demencia con cuerpos de Lewy (Marsili *et al*, 2018). Otros instrumentos de valoración y evaluación para diagnóstico de la EP son: la escala de Hoehn y Yahr, se utiliza como índice de progresión clínica de la enfermedad, presenta una buena correlación en contraste con la escala de UPDRS, se ha implementado de igual manera para evaluar la eficacia de los tratamientos instaurados a pacientes. La escala intermedia para la valoración de la EP (ISAPD), la cual logra una medida uniforme válida para evaluación de EP. La sociedad de trastornos del movimiento (MDS) ha sido más ampliamente utilizada ya que cubre el espectro clínico en la EP, ésta incluye elementos nuevos de sintomatología no motora para la evaluación del paciente, y modificó la manera de calificar varios síntomas y signos del paciente que incluyen además pruebas diagnósticas específicas (Resonancia magnética, tomografía computarizada por emisión de positrones, tomografía computarizada por emisión de fotón único), estas incluyeron la asociación de la definición ON- OFF a la parte III de la escala de UPDRS para dar mayor uniformidad entre los clínicos evaluadores (Castro-Toro *et al*, 2014; Marsili *et al*, 2018). En la evaluación neurológica se han incluido factores de exclusión determinados por la medicación previa del paciente, debido a que

ciertos fármacos por su acción bloqueante dopaminérgica pueden inducir un parkinsonismo farmacológico, como es el caso de los neurolépticos con excepción de la clozapina y la quetiapina, así como algunos antieméticos como la metoclopramida, antiflatulantes como la cleboprida y antivertiginosos tal como sulpirida tieltiperazina. Estos fármacos por lo general presentan alteraciones motoras de tipo simétrica, las cuales difieren de las manifestaciones motoras rígido – acinéticas propias de la EP (Martínez-Fernández *et al*, 2016). Otros factores de exclusión incluyen historial de accidente cerebro vascular a repetición, encefalitis o crisis oculógiras no tratadas, tumor cerebral, hidrocefálea confirmadas en neuroimágenes, exposición a neurotoxinas, signos cerebelosos, demencia o trastornos del lenguaje o de memoria entre otros (Estrada *et al*, 2010).

### **1.1.7. Tratamiento**

El tratamiento de elección es la levodopa, un precursor de la dopamina con el cual consigue retrasar la progresión de los síntomas, pero su eficacia inicial disminuye con el tiempo. Esta se absorbe en el tracto gastrointestinal utilizando los mecanismos de transporte activo de la mucosa intestinal, allí no sufre mayor degradación, pero en la circulación sistémica hay una alta degradación, por lo que se hace necesario prescribirse junto a inhibidores de la descaboxilasa como son la carbidopa o benserazida, permitiendo una mejor acción en el sistema nervioso central. Una vez llega a la circulación encefálica, entra a la neurona y es convertida mediante la hidroxifenilalanina descarboxilasa en dopamina, la liberación de la dopamina en las terminales sinápticas sigue un patrón tónico fásico, esta estimula los receptores dopaminérgicos D1 asociados a las complicaciones motoras (Juri-P *et al*, 2006; (López-D *et al*, 2008; Ibáñez-P. 2008).

---

Si bien la levodopa sigue siendo el tratamiento más efectivo en el manejo de sintomatología del Parkinson, los beneficios del tratamiento se acortan a medida que avanza la enfermedad a causa de la disminución de sistemas dopaminérgicos intactos, por lo cual se hace necesario el monitoreo constante, ajuste de las dosis y la minimización de efectos adversos con terapias combinadas. Dentro de los efectos adversos conocidos de la levodopa están: náuseas, vómitos, hipotensión postural, sedación, sueños vívidos, mareos, orina oscura, confusión, más de la mitad de los pacientes generan fluctuaciones motoras conocidas como fenómenos de desgaste o “wearing-off” causadas por variaciones de los niveles de dopamina al final de la dosis y al estrés oxidativo generado por la levodopa, sin embargo el retiro repentino de la levodopa también causa efectos adversos como el síndrome parkinsoniano o hiperpirexia, el cual desencadena acinesia, disminución de la conciencia, insuficiencia renal aguda, trastornos de la coagulación y fiebre (DeMaagd *et al*, 2015; Herrera-Tejedor, 2010).

Por otra parte, existen diferentes alternativas farmacológicas para el tratamiento de la EP, cuya prescripción depende de la sintomatología motora en el paciente, sin embargo, a pesar de los avances obtenidos para estos medicamentos, no se ha desarrollado un efecto altamente neuroprotector para estos. En los primeros estadios de la enfermedad, cuando no se presenta compromiso funcional se consideran como primera elección los inhibidores de la monoaminoxidasa B (iMAO-B), agonistas dopaminérgicos, inhibidores de la Catecol – O – metiltransferasa (iCOMT), anticolinérgicos y amantadina (Zahoor *et al*, 2018; Marín *et al*, 2018).

Los iMAO-B selegilina y rasagilina, presentan una alta selectividad y efecto irreversible de inhibición, en tanto que la safinamida aunque es igualmente selectiva a la MAO-B su efecto es reversible. Estos medicamentos evitan una alta degradación de la dopamina, reducen el estrés oxidativo y los metabolitos de la dopamina por lo cual se les atribuye propiedades neuroprotectoras; sin embargo, la mejoría de los síntomas es leve, razón por la cual se deben asociar con otros

fármacos como preparaciones a base de Levodopa y un inhibidor de la descarboxilasa para disminuir la dosis de levodopa. Los efectos secundarios observados con los iMAO-B están relacionados con molestias gastrointestinales, articulares, depresión, fatiga, boca seca, insomnio, mareos, confusión, pesadillas, alucinaciones, síntomas gripales, indigestión y dolor de cabeza (Riederer *et al*, 2011; Dezsi *et al*, 2017; Hurtado *et al*, 2016).

Los agonistas dopaminérgicos estimulan de manera directa los receptores de dopamina endógena, especialmente de los receptores D2, con lo cual se disminuyen las alteraciones motoras y discinesias a comparación de la levodopa, por lo que se les considera ahorradores de levodopa ya que prorrogan la necesidad de administrar la levodopa, sin embargo a medida que avanza la enfermedad, la eficacia de los agonistas dopaminérgicos disminuye, razón por la cual solo se administran como monoterapia en pacientes jóvenes, o en pacientes mayores que no presenten deterioro cognitivo. Los efectos adversos conocidos para estos fármacos son: somnolencia, hipotensión ortostática, edema, trastornos compulsivos y alucinaciones (Hurtado *et al*, 2016). Los agonistas de la dopamina se dividen en derivados del ergot y agonistas no ergolínicos, los agonistas con estructura ergótica alfa-dihidroergocriptina (DHEC), bromocriptina, lisurida, cabergolina y pergolida, son de primera generación, presentan buena efectividad contra la discinesia, y permiten posponer el inicio de tratamiento con levodopa. Los efectos secundarios de estos agonistas de la dopamina son náuseas, vómitos, mareos e hipersomnia. En la actualidad los derivados de la ergotamina no se prefieren como tratamiento de primera línea debido al riesgo de problemas cardíacos como la valvulopatía cardíaca fibrótica (Konta *et al*, 2008).

Los agonistas no ergóticos ropirinol, pramipexol, rotigotina y piribedilo, se administran en las etapas iniciales de la EP con el fin de posponer el uso de levodopa o para reducir la dosis de ésta en caso de ser terapia complementaria, sus efectos secundarios son menos severos y frecuentes que con los agonistas

---

ergóticos (Konta *et al*, 2008). Se cree que los agonistas dopaminérgicos podrían tener efectos neuroprotectores puesto que poseen propiedades antioxidantes, ya que se ha comprobado que captan radicales libres, inhiben la apoptosis, actúan sobre la membrana mitocondrial (pramipexol), disminuyen la liberación de dopamina lo que evita la formación de radicales libres derivados del metabolismo de la DA. Los agonistas de la dopamina pueden llegar a desencadenar un síndrome de carencia dopaminérgica en caso de cese repentino de administración, por lo cual la eliminación en el tratamiento de éstos debe ser de tipo gradual (Cánovas *et al*, 2014).

La tolcapona y entacapona, son inhibidores de la catecol – O – metiltransferasa (COMT), evitan el metabolismo de la levodopa a 3-O-metildopa siendo la acción de la tolcapona más potente a nivel periférico y central, por lo cual incrementan la vida media plasmática de la Levodopa sin alterar el tiempo de pico plasmático o la concentración máxima. Su administración se presenta en el tratamiento de fluctuaciones motoras asociadas al consumo de levodopa evitando generar un aumento en la dosis o de la frecuencia de administración de levodopa, disminuyen los periodos “on” y los “off”, sin embargo, la administración de los iCOMT junto con la levodopa no retrasa o disminuye el avance de la EP ni la frecuencia de las discinesias propias del aumento de dosis de la levodopa. Los efectos secundarios observados en la administración de los iCOMT son diarrea, coloración de la orina, dolor abdominal de intensidad leve a moderada, en algunos casos elevación de enzimas hepáticas y síndrome neuroléptico maligno tras la retirada del tolcapone, razón por la cual tolcapone fue retirado del mercado quedando indicado solo para pacientes con fluctuaciones motoras que no tengan otra alternativa medicamentosa de alivio sintomático (Marín *et al*, 2018; Buriticá *et al*, 2004).

Los anticolinérgicos trihexifenidilo, la bengtropina y el biperideno, están indicados para pacientes que presentan temblor de reposo sin mejoría con tratamiento a levodopa o agonistas dopaminérgicos, al igual que para pacientes jóvenes con temblor incapacitante y poca bradicinesia, rigidez y sin compromiso cognitivo. Su

administración debe ser gradual, comenzando con dosis bajas e incrementándolas poco a poco ya que una administración con dosis alta de manera inmediata desencadena efectos adversos como xerostomía, visión borrosa, midriasis, fotofobia, confusión y alucinaciones, principalmente en pacientes de edad muy avanzada (Marín *et al*, 2018; Lertxundi *et al*, 2015).

La amantadina se desarrolló en un principio como un medicamento antiviral para tratamiento de la influenza, y fue por casualidad que se le descubrieron las propiedades de alivio leve en los síntomas motores del Parkinson; se ha sugerido que aumenta las concentraciones de dopamina y presenta acción anticolinérgica, sin embargo, el mecanismo de acción de la amantadina no está completamente aclarado. En años anteriores esta se prescribía como tratamiento corto y como herramienta de diagnóstico de la EP; actualmente, se asocia al tratamiento crónico de levodopa para el control de las fluctuaciones motoras y discinecias. Dentro de los efectos secundarios y adversos reportados en el uso de la amantadina se encuentran: insomnio y cansancio durante el día, livedo reticularis (manchas rojas o moradas en la piel por lo general presentes en las piernas), ansiedad, náuseas, retención urinaria, inflamación de los pies y alucinaciones (Marjama *et al*, 2004; Marín *et al*, 2018).

## **1.2. Familia Rubiaceae, origen y distribución**

Etimológicamente el nombre de la familia Rubiaceae proviene del latín “ruber” alusivo al rojo, referente al colorante rojo que se extrae de la especie asiática *Rubia tinctorum*. La familia Rubiáceas del orden de las Gentianales, es una familia que reúne aproximadamente 650 géneros y unas 1300 especies distribuidas por todo el mundo, siendo la cuarta familia de plantas más grande. Su distribución es cosmopolita y predominantemente pantropical, alrededor de la mitad y un tercio de

los géneros son neotropicales ( *Psychotria* 600 especies, *Palicourea*, 230; *Rudgea*, 220; *Faramea*, 200; *Rondeletia*, 200; *Guettarda*, 140; *Manettia*, 130; *Coussorea*, 120; *Sopermacoce* incluyendo a *Borreria*, 180; *Randia*, 90; *Chomelia*, 75; *Galium* incluyendo *Relbunium*, 60; *Ixora*, 50; *Notopleura*, 73; *Sabiceae*, 55; *Alibertia*, incluyendo *Borojoa* 180; *Simira*, 45; *Gonzalagunia*, 40; y *Mitracarpus*, 40). 75 géneros y 729 especies de Rubiáceas están presente en los andes tropicales (*Palicourea*, 164 especies; *Psychotria*, 129; *Manettia*, 71; *Galium*, 30; *Rudgea*, *Faramea* y *Hoffmannia*, 21 cada uno; *Ladenbergia*, 18; *Arachnothryx*, 16; *Borreria* y *Arcytophyllum*, 14 cada uno; *Gonzalagunia*, 13 y *Cinchona*, 12). En América tropical hay aproximadamente 317 géneros y más de 5.000 especies encontrándose especialmente sobre los 1000 msnm, son especialmente diversas en la amazonia, bosques de niebla de los andes, bosques del atlántico del Brazil, el origen de las Rubiaceae andinas parece ser a través de la adaptación de ancestros provenientes de las tierras bajas a condiciones de montaña (Teran-Aguilar, 2006).

### **1.2.1. Características botánicas**

Son angiospermas, árboles y arbustos, hierbas, enredaderas, lianas o sufrútices, plantas erectas postradas o trepadoras, a veces epifíticas mircefólicas, herbáceas o leñosas, sus tallos pueden estar protegidos con espinas rectas o curvas. Estípulas generalmente interpeciolares o intrapeciolares, estas son persistentes o deciduas, enteras, laceradas a divididas en dos o más lóbulos, libres o unidas en vaina o gorro, la vaina puede presentarse a veces con proceso aristado o aculeado, mayormente de tamaño reducido comparado con la hoja. Las hojas usualmente son opuestas o verticiladas en raras ocasiones alternas, simples, enteras y en ocasiones se encuentran hojas subonduladas al margen o pinnadas. Sus flores son bisexuales y unisexuales, actinomorfas y rara vez zigomorfas ligeramente,

agrupadas en panículas terminales o axiales, espigas, cabezuelas, cimas o solitarias, de tamaño diminuto o grande y vistosas, con frecuencia heterostílias libres o adnatas en la base. Su cáliz presenta el tubo unido al ovario ínfero formando el hipantio o en ocasiones libre del ovario, el limbo del cáliz dentado o labiado, los dientes usualmente de 4 a 5, en ocasiones ausentes, con frecuencia persistentes en el fruto. Corola gamopétala, actinómorfa rara vez subzigomorfa, campanulada, infundibuliforme o rotácea, con lóbulos de 4 a 6 usualmente, en ocasiones corniculados, valvados, imbricados, alternos a los lóbulos corolinos, insertos en el tubo de la corola entre el ápice y la base o en la garganta, o insertos en la base casi libres, externos o inclusos. Las anteras libres, loculares, dorsibasífilas, versátiles, por hendiduras dehiscentes laterales y pocas veces por poros apicales. Ovario ínfero pocas veces súpero o semisúpero usualmente bilobulado, óvulos en par llegando hasta 5 pares y en ocasiones único. Estilo simple o bilobulado, rara vez bipartido hasta la base, ramas filiformes, lineales y totalmente estigmáticas. Fruto drupáceo, de una baya o una cápsula con dehiscencia septicida, loculicida o circuncisa, en ocasiones indehiscente. Sus semillas son muchas de tamaño pequeño o grande con frecuencia aladas, foveoladas, de testa suave, tuberculada o celular, con endospermio grande, córneo, carnoso, ruminado, entero muy rara vez ausente (Borhidl *et al*, 2002).

### **1.2.2. Análisis fitoquímico de la familia Rubiaceae**

Esta familia ha sido muy poco estudiada en su composición química y actividad farmacológica, se han identificado en su fitoquímica compuestos aromáticos como fenoles y flavonoides, también se ha identificado terpenos y alcaloides indólicos, glicósidos y triterpénicos, ésteres, saponinas (Castro-Díaz, 2006; Martinsa *et al*, 2014), ciclótidos (González-Cadavid *et al*, 2012), taninos, cumarinas y glucósidos cardiotónicos (Taborda-Martínez, 2009).

### 1.2.3. Actividad biológica de la familia Rubiaceae

Se estima que la familia Rubiaceae posee acciones neurotróficas al encontrarse entre sus compuestos químicos saponinas triterpénicas, las cuales protegen las neuronas colinérgicas del cerebro anterior basal contra la neurodegeneración y atrofia relacionada con la edad, esta acción se basa en la inducción de secreción del Factor de crecimiento nervioso (NGF) en células maduras, lo que NGF regula la síntesis de la norepinefrina (Pérez-Estudillo *et al*, 2018; Hyun-Kim *et al*, 2011), entre otros mecanismos de las saponinas con función neuroprotectora se destacan: acción antioxidante, modulación de neuroprotectores, mecanismos anti-apoptóticos, antiinflamatorios, atenuación del influjo de calcio, inhibición de la fosforilación de tau y regeneración de redes neuronales (Garcia-de Vello Moreno, 2015) Se ha demostrado que la acción citotóxica de esta familia se encuentra generada por los metabolitos secundarios esteroides y terpenos encontrados en los tallos y hojas de algunas especies de esta familia (Castro-Diaz, 2006).

Los terpenos poseen actividad antioxidante ya que pueden reaccionar con los radicales libres dando lugar a radicales más estables y con menor reactividad (González-Burgos, 2010). Los flavonoides presentan potencial neuroprotector actuando sobre dos mecanismos principales: la neuroinflamación y el estrés oxidativo, estos mantiene la capacidad integral y funcional de la neuronas, disminuyen la producción de ROS, bloquean la respuesta inflamatoria por medio de la inhibición de la microglía, los astrocitos y moléculas pro-inflamatorias como la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS), el factor de necrosis tumoral- alfa (TNF- $\alpha$ ) y la  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) (Sandoval-Avila *et al*, 2016; Álvarez-Fernández *et al*, 2010).

### **1.3. *Nertera granadensis* (Mutis ex L.f.) Druce**

Al género *Nertera* pertenecen 26 especies de plantas, su nombre deriva de la palabra griega nerteros que significa hacia abajo, es una planta perenne originaria de Nueva Zelanda cultivada como planta ornamental. Su follaje es denso y se caracteriza por ser de hojas muy pequeñas formando montículos de 5 a 8 cm de altura, crece a manera de colchones en áreas abiertas, sus tallos son densos, finos y compactos de los cuales nacen las hojas color verde profundo, de forma ovalada a redondeadas. En verano florece, siendo estas florecillas de color amarillo, de unos 5 mm de diámetro y duran unas pocas semanas, sus bayas son brillantes de forma esférica y color naranja. Se desarrolla bien en suelos húmedos y bien drenados en pH tanto ácidos, como neutros y alcalinos, a temperatura de 15°C se desarrolla bien, requiere luz aunque no estar expuesta al sol directo, su reproducción se da por semillas, esquejes o por división de la planta (Marticoea et al, 2010; Corpochivor, 2012).

#### **1.3.1. Características botánicas y clasificación taxonómica**

Tabla 1. Características de *Nertera granadensis*

<p><b>Género de colección:</b> 037</p>	
<p><b>Nombre científico</b></p>	<p><i>Nertera granadensis</i> (L.F.) Druce</p>
<p><b>Nombres local</b></p>	<p>Coralito, coral de agua, tomatillo, uvita de agua, yerba de sapo.</p>
<p><b>Familia</b></p>	<p>Rubiaceae</p>
<p><b>Origen</b></p>	<p>Nativa</p>
<p><b>Tipo de Crecimiento</b></p>	<p>Hierba</p>
<p><b>Hábito</b></p>	<p>Terrestre</p>

<b>Planta de Humedal</b>	No
<b>Dispersión</b>	Fauna
<b>Propagación Principal</b>	Semilla
<b>Propagación Secundaria</b>	Vegetativa
<b>Estado</b>	Intermedia
<b>Tallo</b>	Tallo flexible, con raíces en los nudos.
<b>Hojas</b>	Hojas pequeñas y glabras, de 0.5 a 1 cm de longitud, de lámina elíptica; estípula diminuta, triangular, persistente.
<b>Fruto</b>	Carnoso. Frutos solitarios y terminales, con el cáliz persistente. Frutos globosos, de 2-6 mm de diámetro, jugosos, de color verde en estado inmaduro y rojo al madurar, con una pequeña presión en la parte apical y con dos semillas. Las semillas tienen un lado aplanado y el otro convexo con estrías en la superficie y de color café.

Fuente: <https://lfs-plantas.sites.olt.ubc.ca/plantas/nertera-granadensis/>

### 1.3.2. Distribución en Colombia

Presenta una distribución amplia a lo largo el territorio nacional, encontrándose en gran proporción en los departamentos de Cauca, Arauca, Caldas, Putumayo, Santander, Meta, Nariño, Cundinamarca, Huila, Risaralda, Quindío, Antioquia, Boyacá, Magdalena, Cesar y Chocó (Humboldt, 2018)

### 1.3.3. Usos etnofarmacológicos

Se ha reportado su uso junto con agua de quiche para tratar afecciones cardiacas, de igual manera se le han conferido propiedades para tratar problemas renales, del corazón y la epilepsia (Humboldt, Instituto, 2014).

### **1.3.4. Actividad biológica de *Nertera granadensis***

En estudios preliminares desarrollados en el Departamento de Farmacia (grupo GIFFUN), *Nertera granadensis* presentó propiedades neuroprotectoras en el modelo de rotenona sobre células SH.SY5Y.

### **1.3.5. Estudio fitoquímico de *Nertera granadensis***

Como se ha mencionado la especie *Nertera granadensis* hace parte de la familia Rubiaceae, familia que se caracteriza por biosintetizar varias clases de alcaloides incluyendo los alcaloides monoterpenindólicos cuya parte terpénica corresponde a una estructura tipo iridoide, así mismo se han obtenidos iridoideos libres en especies de ésta familia. Para *Nertera granadensis* se reporta la presencia de iridoideos y del triterpeno ácido ursólico (Barboza *et al*, 2009; Ludwig *et al*, 1978).

#### **1.3.5.1. Propiedades de los compuestos fitoquímicos de *Nertera granadensis***

Los iridoideos en la familia Rubiaceae se pueden encontrar solos o haciendo parte de la estructura de alcaloides monoterpenindólicos. Los iridoideos son monoterpenos que se caracterizan por poseer un esqueleto ciclopenta [c] piránico, denominado comúnmente como iridiano (cis-2-oxabicyclo [4,3,0]-nonano), se han incluido en este grupo los secoiridoideos, los cuales proceden de la ruptura del

enlace 7,8 del núcleo ciclopentánico. El compuesto secologanósido en la formación de alcaloides indol-monoterpénicos juega un papel importante, la condensación de este compuesto con la triptamina y la 3,4 -dihidroxifeniletamina da lugar a la estrictosidina y al desacetilpecósido respectivamente, precursoras de los alcaloides indólicos (Bruneton, 2001).

Estos compuestos han sido estudiados en su estado puro han sido evaluados, y se les ha detectado propiedades neuroprotectoras, anticancerígenas, antiinflamatorias, sedantes, antioxidantes, antimicrobianas, hipoglicemiantes, hipolipidémicas, coleréticas, antiespasmódicas, inmunomoduladoras, antipiréticas, hepatoprotectoras y cardioprotectoras (Rios, 2015).

Se ha identificado que presentan acción sobre el sistema antioxidante de defensa y sobre los receptores glutamatérgicos, de igual manera poseen propiedades inhibitoras de sustancias proinflamatorias (especies reactivas de oxígeno, especies reactivas de nitrógenos, factor de necrosis, peróxidos, prostaglandinas e interleucinas), así como de las enzimas de síntesis de estas sustancias (óxido nítrico sintetasa, lipooxigenasa 5, 12, 15; hialuronidasas, ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2) (Rios, 2015).

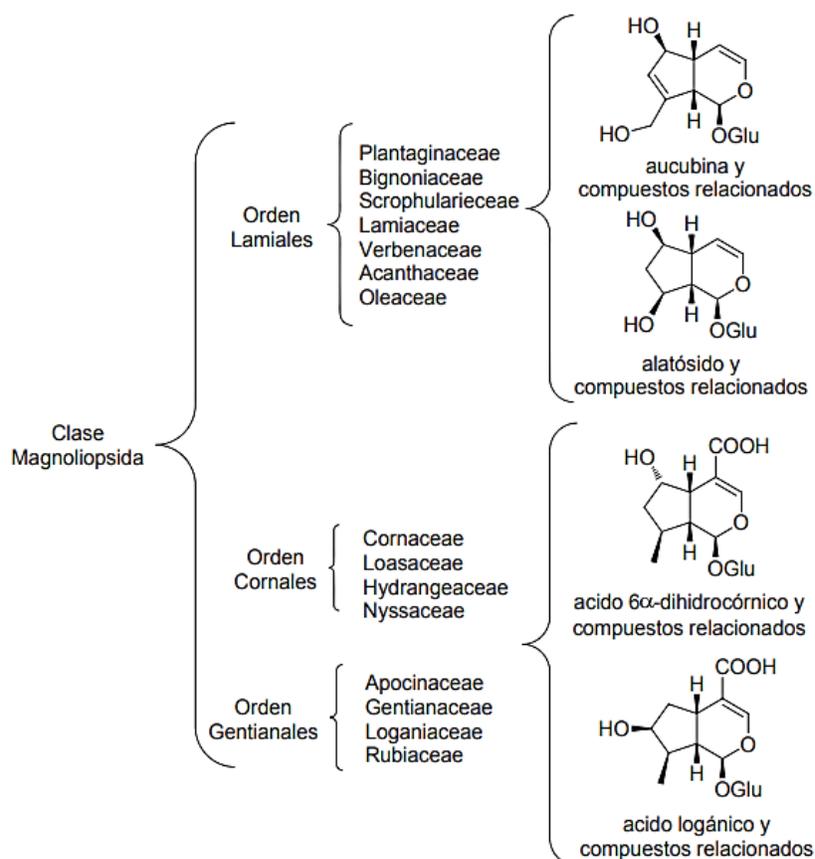


Figura 1. Distribución de iridoides en los órdenes Lamiales, Cornales y Gentianales

Fuente: (Rios, 2015)

### Acido ursólico

El ácido ursólico (AU), denominado de igual manera por algunos autores como ursón, prunol, micromerol y malol [ácido (3β)-3-hidroxi-urs12-en-28-oico] es una sapogenina pentacíclica triterpénica que puede aparecer en forma de ácido libre o de aglicona (Martínez *et al*, 2007), estos se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas del ácido mevalónico, activa, en la vía del metileritritol fosfato (MEP), el cual junto con el isopentenil difosfato (IPP) son los precursores de los terpenos, los cuales por acción de las prenil transferasas dan origen al

geranil difosfato, el cual junto con IPP, originan el farnesil difosfato (FPP), el cual es el precursor de los triterpenos (Ávalos *et al*, 2009). Al ácido ursólico se le ha demostrado actividad anti inflamatoria, analgésica, antineoplásica, antibacteriana, antidiabética y neuroprotectora (Escalona *et al*, 2019).

Se ha demostrado que el AU disminuye la producción de citrinas proinflamatorias, incluyendo entre otros el TNF- $\alpha$ , la ruta del factor nuclear kB (NF- $\kappa\beta$ ) y la interleucina (IL) -6 y / o IL-17, la ciclooxigenasa-2 (COX-2), inhibe la óxido nítrico sintasa (NOS) y el peróxido de hidrógeno (Feng *et al*, 2019).

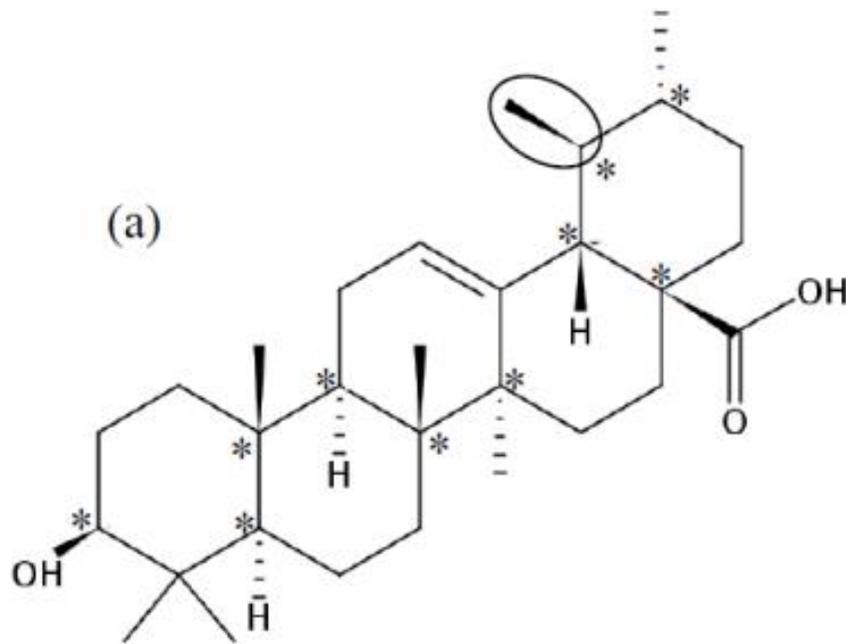


Figura 2. Estructura del ácido ursólico

Fuente: (Ludeña-Huaman, 2018)

En cuanto a la toxicidad de estos compuestos, se ha determinado que es muy baja, siendo por lo tanto seguros para la experimentación (Ferrer *et al*, 2007; Feng *et al*, 2019).

## **1.4. Modelos animales experimentales para para evaluar actividad farmacológica antiparkinsoniana**

Los modelos animales son de gran utilidad para el estudio del funcionamiento de los ganglios basales y la actividad antiparkinsoniana de determinadas moléculas o compuestos, permiten identificar cada mecanismo implicado en la muerte de neuronas dopaminérgicas y la eficacia de posibles tratamientos neuroprotectores. El estudio de las alteraciones motoras y sus tratamientos o alternativas terapéuticas para la EP tradicionalmente se basan en el uso de neurotoxinas las cuales afectan de manera selectiva la sustancia negra en ratones, ratas, gatos y primates (Cuenca-Alcañiz *et al*, 2016). La validez de estos modelos animales se basa en 3 criterios: validez predictiva la cual define la capacidad del modelo usado para predecir algún evento o condición clínica, la validez aparente que demuestra la similitud entre el modelo y la condición clínica, este modelo muestra simultáneamente la etiología, bioquímica, sintomatología y tratamientos de la condición clínica bajo el modelo y la validez de constructo determina la similitud entre el comportamiento animal psico o neurobiológico determinando los mecanismos subyacentes a la condición clínica (Skalisz *et al*, 2002). Existen modelos basados en plaguicidas, modelos genéticos y modelos farmacológicos como el de reserpina. A continuación, se presentan algunos de los modelos que se usan frecuentemente:

### **1.4.1. 6-Hidroxidopamina (6-OHDA)**

Es de las neurotoxinas de mayor uso para el desarrollo de modelos de inducción de la EP en animales, debido a su dificultad para atravesar la barrera hematoencefálica, esta debe inyectarse directamente en el cerebro en la porción anteroposterior del mesencéfalo, la 6-OHDA induce la muerte celular selectiva de las neuronas catecolaminérgicas de la sustancia negra pars compacta. La muerte celular de las neuronas dopaminérgicas es dosis dependiente y esta mediada por la formación de peróxido y radicales libres de hidroxilo, lo que inhibe la cadena respiratoria mitocondrial, lo cual genera el descenso de los niveles de dopamina, encefalina y sustancia P, en tanto que los niveles de neurotensina se elevan. La lesión generada por la 6-OHDA suele ser más extensa y de evolución más rápida de lo presentado en la EP, por ello este modelo es una forma rápida y eficaz de pérdida neuronal dopaminérgica de un estadio inicial de la enfermedad con deterioro de un 60 a 70% de las neuronas permitiendo realizar estudios de efectos neuroprotectores de diversas sustancias. La ventaja de este modelo es que al ser inyectado el 6-OHDA en un hemisferio cerebral, el otro hemisferio sirve de control, sin embargo, su desventaja es que puede llegar a afectar otras zonas (Philippens, 2008; Luquin, 2000).

### **1.4.2. Reserpina**

Este es otro modelo clásico de estudio de la EP, la reserpina permite la depresión de los niveles de dopamina de manera transitoria sin provocar neurodegeneración en las células dopaminérgicas de la vía nigroestriatal, con lo cual se observan síntomas motores similares a los presentados en la EP como es el temblor, acinesia, rigidez, alteraciones posturales y de la marcha (Castañeda *et al*, 2015).

Su mecanismo de acción se da mediante el bloqueo de la función de los transportadores vesiculares de monoaminas (VMATs) para el almacenamiento de la dopamina en las vesículas presinápticas, disminuyendo así los depósitos de dopamina y su posterior liberación (Ritter *et al*, 2012). En las vesículas sináptica se encuentran los transportadores vesiculares de monoaminas VMATs tipo 2, identificados en las neuronas dopaminérgicas de SNC tanto en humanos como en roedores, siendo estos los directamente responsables de introducir la dopamina en el interior de las vesículas para posteriormente ser liberada en el espacio sináptico. Adicionalmente, se les atribuye un papel neuroprotector al participar en la recaptación de la dopamina hacia el interior de la célula presináptica. La disminución de la actividad de la VMATs 2 disminuye esta recaptación y se incrementa la concentración de dopamina en la neurona presináptica aumentando de esta manera la posible neurodegeneración celular por oxidación de la dopamina en el citoplasma (Zheng *et al*, 2006).

Se ha observado que existe un aumento importante de la acinesia generalizada a causa de la disminución de la dopamina estriatal de un 95%, y en la SNpc hay disminución de los niveles de dopamina en un 85%. De igual manera se ha evidenciado un aumento de los aminoácidos excitatorios en los ganglios basales, así como un aumento del 50% de los niveles de glutamato posterior a la administración de reserpina en el núcleo subtalámico y en los ganglios basales (Castañeda *et al*, 2015).

Este modelo permite evaluar la efectividad de diversos tratamientos, así como para la evaluación de los efectos terapéuticos de levodopa y otros agonistas dopaminérgicos. Sin embargo, en este modelo no se desarrolla la degradación neuronal clásica de la EP pudiéndose ver afectados otros neurotransmisores, por lo cual no es ampliamente utilizada para test de neuroprotección de fármacos (Tadaiesky *et al*, 2006; Philippens, 2008; Pando-Orellana *et al*, 2016).

### **1.4.3. Modelo MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina)**

Es un modelo que presenta gran similitud en la degeneración neuronal con la EP, el MPTP tiene gran capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, una vez llega al cerebro es captada por las células gliales, y por acción de la MAO-B se transforma en el metabolito activo 1-metil-4- fenilpiridinio (MPP+) metabolito que es altamente afín a las neuronas dopaminérgicas por acción del trasportador de dopamina (DAT), allí se almacena en las vesículas por parte del VMAT o en las mitocondrias donde inhibe el complejo 1 mitocondrial provocando la disminución del ATP, aumento de radicales libres e induciendo posteriormente a la muerte de las neuronas dopaminérgicas. Los efectos y dosificación en roedores varían dependiendo de la edad de estos, así como de la vía metabólica y el número y frecuencia de administración, por lo cual se ha observado que el daño mitocondrial se incrementa con la edad del ratón al igual que los depósitos de MPTP lo que puede conducir al aumento de la sensibilidad a la toxicidad. Por otro lado se ha demostrado que algunas cepas de roedores son más susceptibles a los efectos del MPTP a causa de una variabilidad genética (Philippens, 2008; Pando-Orellana *et al*, 2016; Rumiko *et al*, 2004).

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general

Evaluar los posibles efectos anti parkinsonianos del extracto etanólico de *Nertera granadensis* en ratones.

### 2.2. Objetivos específicos

- ✓ Determinar los posibles efectos antiparkinsonianos del extracto etanólico de *Nertera granadensis* en un modelo de Parkinson de reserpina en ratones.
- ✓ Determinar el posible efecto potenciador de levodopa y del extracto etanólico de *Nertera granadensis* en ratones reserpinizados
- ✓ Determinar la posible actividad antioxidante del extracto etanólico de *Nertera granadensis*

### **3. Metodología**

#### **3.1. Animales**

Para los ensayos *in vivo* se utilizaron ratones albinos machos colonia CD1 (*Mus musculus domesticus*) criados en el bioterio del Departamento de Farmacia; estos animales son de uso común para estudios de control de fármacos (Vargas-Miranda *et al*, 2018), se escogieron los animales en edades entre las seis y siete semanas, con peso entre los 28 y 37 g. la distribución de los animales se realizó de manera aleatoria por cajas en grupos de 5 individuos del mismo sexo (machos) y con pesos similares la cual representaba el ensayo mínimo. Como protocolo sanitario se realizó cambio de camas dos veces por semana, al igual que lavado de bebederos. Los animales se aclimataron por un espacio de tiempo de 72 horas anteriores al desarrollo de los modelos, se mantuvieron a temperatura de 22°C  $\pm$ 1°C, en ciclos sucesivos de 12 horas de luz y oscuridad, se les administró alimento (LabDiet®) y agua a libre demanda, los ensayos se realizaron a la misma hora del día con el fin de minimizar posibles variables a causa del ciclo circadiano.

#### **3.2. Extracto etanólico de *Nertera granadensis***

El extracto etanólico lo proveyó el grupo Grupo de investigación en Fitoquímica y Farmacognosia de la Universidad Nacional de Colombia (GIFFUN).

La especie vegetal *Nertera granadensis* fue recolectada en la vía Bogotá- Choachí Km 15, Páramo Cruz verde, en junio de 2016, se colectaron las partes aéreas de la planta y posteriormente se separaron los frutos frescos. Un ejemplar fue depositado en el Herbario Nacional Colombiano para su identificación.

Los frutos fueron secados en estufa de aire circulante a 45°C durante 48 horas, el material seco se trituró y fue extraído por el método de maceración con etanol al 96%. De 40 g de fruto seco se obtuvo 2,6 g de extracto seco.

Dentro de la caracterización fitoquímica inicial se encontró que contiene metabolitos del grupo de los esteroides y triterpenos.

### **3.3. Modelo de antagonismo de reserpina**

Se desarrolló el protocolo descrito por Olaya (Olaya *et al*, 2019), en el cual se administró a los ratones la reserpina por vía intraperitoneal a dosis de 3mg/kg, 30 min. después se administraron, por vía oral los tratamientos así: como patrón de referencia selegilina a dosis de 10 mg/kg, el extracto etanólico de *Nertera granadensis* en dosis de 150, 300 y 600 mg/kg y el grupo control recibió agua como vehículo (0,1 mL por cada 10 g de peso). Con el fin conocer las respuestas comportamentales en cada uno de los tratamientos se realizó una evaluación basal reportada en el anexo 3. De igual manera se eligió la mejor dosis de extracto para administrar en los ensayos finales.

### **3.3.1. Campo abierto**

La evaluación motora de los animales en campo abierto se desarrolló durante un tiempo de observación de 5 minutos donde se evaluó distancia recorrida (número de cuadrados cruzados). Estas observaciones se realizaron a las 2 y 24 horas posteriores a la reserpización. El campo abierto fue aseado con una solución de agua y alcohol (10%) entre cada animal a observar con el fin de eliminar posibles sesgos debidos a olores dejados por sujetos anteriores.

De forma preliminar, se valoró el tremor, la hipocinesia y la rigidez inducida por reserpina en los ratones, lo cual permitió verificar la inducción correcta de los signos parkinsonianos en los animales (ver anexo 1). Esta evaluación nos permite determinar el número de animales que presentaron completa respuesta de efectos parkinsonianos a la reserpina, de igual manera se permite identificar aquellos que no presentaron los efectos esperados, permitiendo diferir si este evento se presenta por mala administración de la reserpina (aplicación enteral en vez de ser peritoneal), dosis administrada, respuesta específica de la cepa de murinos, edad y peso de estos.

### **3.3.2. Pole test:**

En este ensayo se evaluó la bradicinesia del animal, en un poste de aproximadamente 50 cm de altura y 1 cm de diámetro cubierto con gasa y con una pequeña porción de corcho en la punta, los animales fueron ubicados cabeza arriba justo por debajo de la punta de corcho. Se evaluó el tiempo que requirió el animal para girar en ángulo de 180° sobre el poste, así como el tiempo empleado en bajar por el poste y llegar al suelo. En esta prueba permite identificar la incapacidad del ratón para corregir una postura (catalepsia) y la hipocinesia (Campos-Romo, 2008; Balkaya *et al*, 2010).

Se realizó un entrenamiento previo 48 horas antes de la evaluación con 5 repeticiones y con intervalos de tiempo entre estas de 20 minutos para evitar el agotamiento de los animales. En los primeros 2 entrenamientos se colocaron los animales cabeza hacia abajo en el poste, permitiendo su descenso, luego se colocaron cabeza arriba en el poste para que entrenaran el giro y posterior descenso, que fueron los parámetros evaluados.

La evaluación de tiempo de ejecución del test se contabilizó desde el momento en que se ubicó el animal en el poste hasta el instante que desciende completamente por éste, como parámetro de falla de la prueba se determinó el hecho que el animal descendiera hasta la mitad del trayecto del poste, esta observación de falla no se incluyó en los datos registrados, se tomó el promedio de las 3 evaluaciones como el dato final (Matsuura *et al*, 1997).

Previo al desarrollo del pole test, se realizó la prueba neurológica (ver anexo 2), con el fin de determinar el estado normal de los animales.

### **3.4. Modelo levodopa-carbidopa**

Este modelo permitió evaluar el efecto de la asociación de L-dopa/carbidopa (dosis levodopa 100 mg/kg – carbidopa dosis 10 mg/kg i.p) con el extracto etanólico de *Nertera granadensis* en los animales pretratados con reserpina (dosis 3mg/kg vía i.p., 30 min antes de la administración oral con los tratamientos) los cuales fueron distribuidos aleatoriamente en grupo control (vehículo + levodopa-carbidopa), grupo patrón (selegilina 10 mg/kg + levodopa-carbidopa) y dos grupos que recibieron la dosis del extracto que presentó mejor respuesta en el modelo de reserpina (300 mg/kg vía p.o. + levodopa-carbidopa y 300 mg/kg vía p.o. + agua). Se tomó la dosis de levodopa/carbidopa (100/10 mg/kg) reportada por Olaya (Olaya *et al*, 2019) y se verificó que esta dosis no presentara efecto significativo de reversión de hipocinesia. Se realizó la evaluación motora en campo abierto y pole test a las 2 y 24 horas después de la reserpinización.

### 3.5. Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó *ex vivo*, mediante el ensayo conocido como TBARs (Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico), en dicho ensayo se emplearon los reactivos biológicos del modelo levodopa-carbidopa (n=8), los cuales al finalizar las observaciones se sacrificaron por dislocación cervical, posteriormente se extrajeron los cerebros y se refrigeraron en tubos eppendorf. Luego se procedió a homogenizar los cerebros, para lo cual se dejaron previamente a temperatura ambiente, al peso de cada cerebro se añadió cloruro de sodio en relación 1:4 ml, y se procedió a su trituración previo troceado en polytron a 2.500 rpm x 10 seg cn 3 repeticiones por muestra a homogenizar, luego los macerados se llevaron a centrifugación a 10000 rpm a 4°C por 10 min, el sobrenadante se retiró con precaución y se depositó en tubos eppendorf y se dejaron en refrigeración.

De la solución comercial (5,87 M). de hidrólisis ácida del reactivo 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TMP) se obtuvo MDA, de ella se preparó una solución stock-A´ 200 mM mezclando 34 µL de la solución comercial y 966 µL de HCl 0,1N. posteriormente se sometió reacción térmica a 37°C en estufa durante 60 minutos. Culminado este tiempo, se llevó esta solución stock a 100 µL por medio de disoluciones seriadas de HCl 0,1 N (990 µL-900 µL) con lo cual se obtuvo MDA 20 µM como solución de trabajo, posteriormente se tomaron 500 µL de ésta solución y llevó a MDA 10 µM mediante disolución (500 µL MDA- 500 µL HCl 0,1 N = MDA 10 µM), posteriormente se obtuvieron 6 puntos de referencia como método para calibrar la curva igualmente por el método de disolución y completando con HCl a 1 mL en viales eppendorf de 1.5mL (MDA 0,315; 0,625; 1,25; 2,5; 5 y 10 µM). El ácido tiobarbitúrico 0,67% p/v, que se obtuvo diluyendo 6,7 mg de TBA por cada mL de buffer fosfato (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1%, v/v).

Para la evaluación de las muestras, se realizó la mezcla de 250 µL de cada muestra con 250 µL del compuesto reactivo (TBA 0,67%), incluyendo las diluciones

previamente preparadas para la calibración de la curva, luego las muestras reactivas se dispusieron en tubos de vidrio y en baño de maría con niveles de agua sobre el nivel de las muestras, estas se llevaron a 90°C durante 30 minutos, luego de los cuales se sacaron y dejaron enfriar para detener la reacción. De cada muestra ya reactiva se obtuvieron 150 µL y se depositaron en microplaca de 96 pocillos, de cada muestra se dejaron 3 réplicas y se determinó su absorbancia a 532 nm y los niveles de MDA obtenidos se expresaron como µmoles de MDA por gramo de tejido.

### **3.6. Diseño experimental**

Se consideraron tres principios fundamentales para un adecuado diseño experimental: repeticiones o réplicas, aleatorización y organización por bloques (Cerón *et al*, 2013). Se manejó un diseño experimental en bloques completamente aleatorizado, el factor de bloqueo fue por caja, en cada una de ellas se incluyeron todos los tratamientos. La aleatorización se realizó dentro de cada bloque y de forma independiente, generando tantos números aleatorios como individuos existen por caja. Se realizó manualmente, sacando al azar balotas o papeles donde se tienen los tratamientos dentro de cada bloque. El tamaño muestral para cada tratamiento fue calculado mediante el software G\*power (Error Tipo I ( $\alpha$ ) 5%; probabilidad de rechazar la hipótesis nula ( $H_0$ ) cuando  $H_0$  es verdadera; error tipo II ( $\beta$ ) 20%; probabilidad de rechazar  $H_0$  cuando la hipótesis ( $H_1$ ) es verdadera, es decir se encontrará un 80% de probabilidad de encontrar un efecto significativo si realmente existe. La una magnitud del efecto fue 0,601, calculado teniendo en cuenta la variabilidad obtenida en estudios anteriores). Después de realizar el cálculo se obtuvo un  $n=8$  por tratamiento.

### **3.7. Análisis de datos**

Los datos primarios fueron organizados, procesados y depurados (Criterio de Chauvenet.) en Microsoft Excel, así como la representación gráfica e interpolación de datos en las diferentes curvas de calibración leídas en espectrofotómetro.

El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) donde los datos se expresaron como media  $\pm$  E.M.S, para identificar los tratamientos que indiquen diferencias significativas se aplicaron las pruebas de diferencias múltiples de Tukey, en los casos donde no se evidenció homogeneidad de varianzas y/o distribución normal de los datos se implementó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los datos se procesaron con el programa GraphPad Prism (V 5.0); las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si presentan una  $p < 0,05$ .

## **4. Aspectos éticos**

El presente estudio fue evaluado y aprobado por el comité de ética de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional de Colombia (Acta No. 09-2019 de fecha 2 de septiembre de 2019).

Las prácticas en experimentación animal se realizaron bajo los lineamientos de la Ley 84 de 1989 “Estatuto Nacional de Protección de los Animales” cuyo Capítulo VI, sobre el uso de animales en experimentos e investigación, la cual determina la importancia de brindar a los animales de laboratorio las condiciones de vida higiénicas, de bienestar y salud necesarias para evitar cualquier tipo de sufrimiento innecesario en los animales, la Resolución 8430 de 1993, donde se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud (Congreso de la República, 2012), y conforme con la Resolución No. 2935 de Octubre 23 de 2001 del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural – ICA, se establecerán los procedimientos de bioseguridad en investigación y control de calidad de reactivos biológicos (ICA, 2001). De igual forma se siguieron las normas establecidas por el Bioterio de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

Esta investigación disminuyó el malestar que se pudo provocar a los animales por medio de un apropiado diseño metodológico, en el cual se empleó un número adecuado de animales. En la evaluación farmacológica se contó con criterios de punto final humanitario. Sin embargo, durante la experimentación ningún animal

presentó deterioro y/o sufrimiento que llevara a aplicar dichos criterios. Adicionalmente, la investigadora contó con entrenamiento y habilidad para el cuidado y manejo de los animales.

El material vegetal se incluyó dentro de la solicitud de Contrato de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados en el marco de lo establecido en el artículo 6° de la Ley 1955 de 2019 para el proyecto titulado “Biodiversidad colombiana: múltiples oportunidades de desarrollo”.

El manejo de residuos sólidos generados durante la fase de experimentación en el laboratorio se realizó de acuerdo con el Manual de Gestión Integral de Residuos (PGIRH) guiado por el Instituto Nacional de Salud-INS en cumplimiento de la Resolución 1164 de 2002 (López-Casas *et al*, 2010).

## **5. Resultados y discusión**

### **5.1. Evaluación de los efectos antiparkinsonianos en el modelo de reserpina**

#### **5.1.1. Comportamiento motor evaluado en campo abierto**

Los fármacos inductores de Parkinson desencadenan los signos clásicos de la enfermedad como el temblor, bradicinesia, rigidez y alteración de los reflejos posturales de manera aguda, como es el caso de la reserpina, este tipo de parkinsonismo suele ser simétrico y fundamentalmente rígido acinético, con temblores y alteración en los reflejos posturales (Velázquez *et al*, 2009). Los estudios de reversión de acinesia y catalepsia como indicadores de rigidez presentan una validez predictiva de la posible eficacia a trastornos sintomáticos motores de nuevos agentes. Este tipo de ensayos realizados con reserpina, como inductor de síntomas parkinsonianos, refleja los déficits de dopamina a nivel estriatal hasta por más de 24 horas, tiempo en el cual se pueden evaluar reversiones de acinesia tras la administración aguda de fármacos para tal fin (Deber *et al*, 2011).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos al evaluar la actividad motora en la prueba de campo abierto, se observó que, a las 2 y a las 24 horas, ninguna de las dosis evaluadas de extracto presentó diferencia significativa comparada con el control. Sin embargo, a las 2 horas, la dosis de 300 mg/kg fue la única que evidenció una tendencia a revertir el efecto de la reserpina y no presentó diferencia estadísticamente significativa al compararla con selegilina (ver figura 3), a las 24 horas la dosis de extracto de 600 mg/kg presenta una tendencia sin ser significativa y la dispersión es amplia. Por tanto, 300 mg/kg fue la dosis escogida para evaluar el efecto de la asociación del extracto con levodopa/carbidopa. Adicionalmente, selegilina si fue significativamente diferente comparada con el control.

La respuesta presentada por el extracto etanólico puede estar relacionada con una disminución en la actividad motora que presentaron los animales administrados únicamente con el extracto (ver anexo 3, Figura 10).

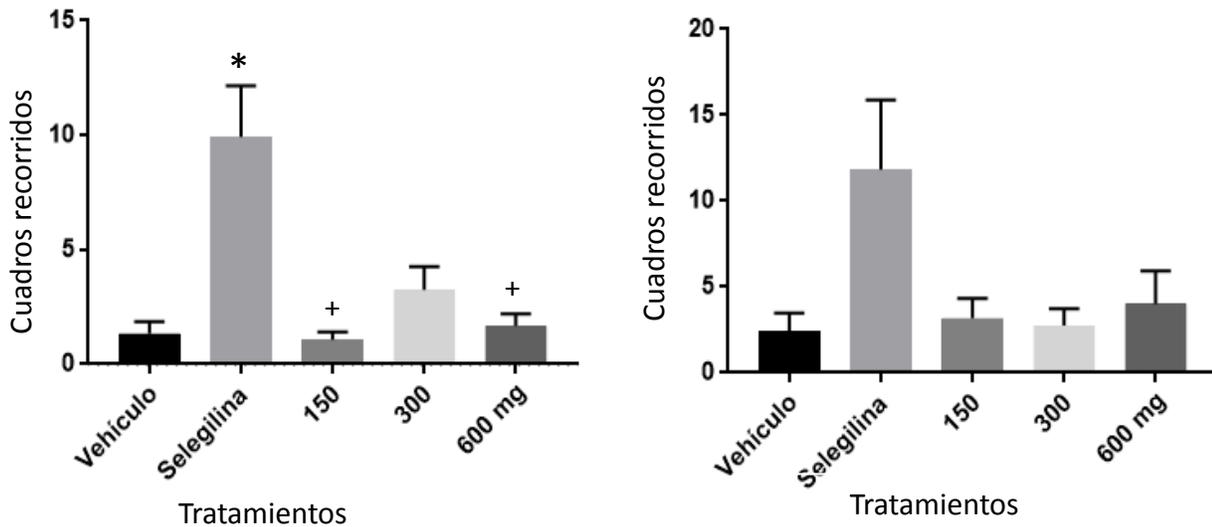


Figura 3. Efectos sobre la distancia recorrida después de administrar extracto de *Nertera granadensis* (150, 300 y 600 mg/kg), control (vehículo) o patrón de referencia (selegilina 10 mg/kg) a ratones con el modelo de reserpina. Evaluación a las 2 y 24 horas (A y B, respectivamente). Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de cada grupo de animales,  $p < 0,05$  ANOVA unidireccional. (\* diferencia significativa comparada con el control, + diferencia significativa comparada con selegilina).

### 5.1.2. Comportamiento motor evaluado en pole test

Se usa comúnmente en el estudio de modelos de enfermedad de Parkinson y en la evaluación de efectos secundarios extrapiramidales asociados a neurolépticos. Para dar análisis diferencial entre los componentes de esta prueba, se analizaron por separado el tiempo de giro de 180° y el tiempo que trascurrió desde que el animal quedó completamente boca abajo hasta que las cuatro extremidades tocaron la base del aparato de prueba (Matsuura. *et al*, 1997).

En las observaciones a las 2 y 24 horas, en todos los grupos de tratamientos se presentó una latencia muy marcada para realizar el giro y descenso de la barra, llegando al máximo de tiempo para cada intento (120 seg). Sin embargo, el grupo selegilina generó una mejor respuesta a la ejecución de la tarea en comparación con el grupo vehículo en la observación de las 2 horas, lo cual fue significativo estadísticamente (figura 4). Esta respuesta puede estar dada por su metabolito L-anfetamina, ya que el metabolismo de la selegilina es rápido y la regeneración de la MAO-B en este momento es muy lenta. El grupo de 150 mg/kg fue el que presentó el desempeño más bajo de la tarea dando además significancia en comparación con el grupo de selegilina. En la evaluación a las 24 horas, el grupo 300mg/kg presentó una mejor respuesta en los tiempos de giro aunque no fue significativa, por otro lado, en cuanto al descenso esta dosis, tanto a las 2 como a las 24 horas, mostró una tendencia a disminuir el tiempo de bajada, incluso mejor que selegilina, sin ser significativa comparada con el control (ver figura 5). Con los resultados obtenidos en esta prueba se corrobora los datos obtenidos en campo abierto, donde la dosis que presenta mejor respuesta es 300mg/kg.

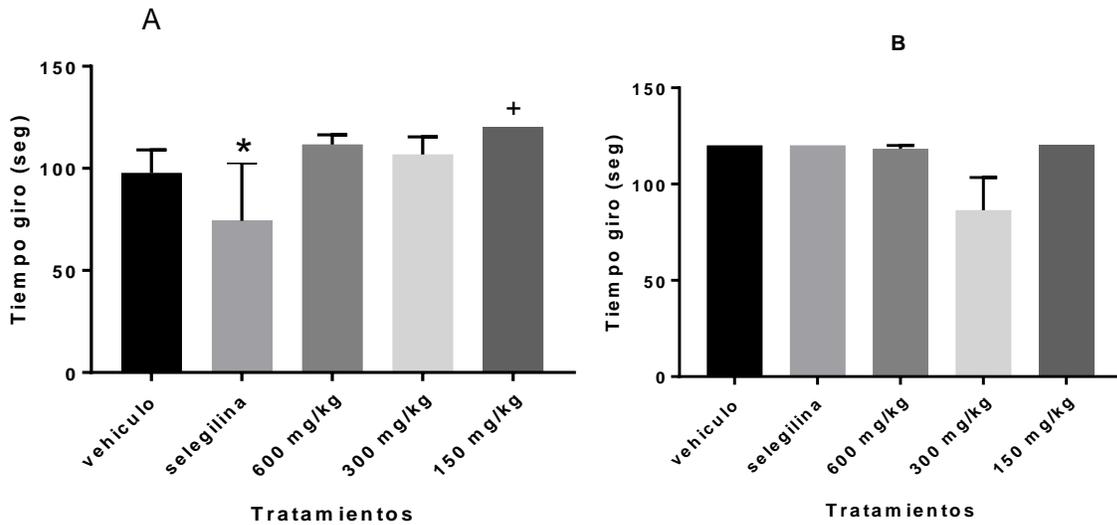


Figura 4. Efectos sobre la prueba de Pole test (giro) después de administrar extracto de *Nertera granadensis* (150, 300 y 600 mg/kg), control (vehículo) o patrón de referencia (selegilina 10 mg/kg) a ratones con el modelo de reserpina. Evaluación a las 2 y 24 horas (A y B, respectivamente). Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de cada grupo de animales,  $p < 0,05$  ANOVA unidireccional. (\* diferencia significativa comparada con el control, + diferencia significativa comparada con selegilina).

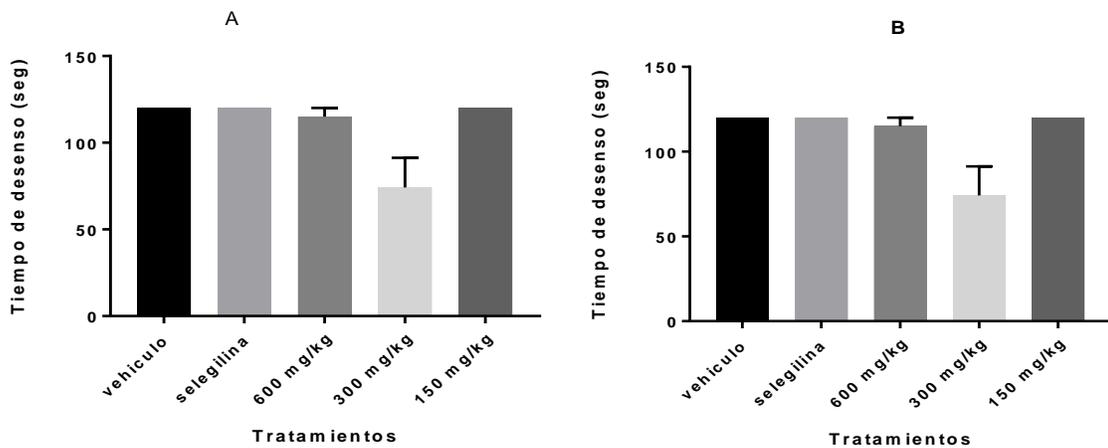


Figura 5. Efectos sobre la prueba de Pole test (descenso) después de administrar extracto de *Nertera granadensis* (150, 300 y 600 mg/kg), control (vehículo) o patrón de referencia (selegilina 10 mg/kg) a ratones con el modelo de reserpina. Evaluación a las 2 y 24 horas (A y B, respectivamente). Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de cada grupo de animales,  $p < 0,05$  ANOVA unidireccional.

## **5.2. Evaluación del efecto de la asociación entre levodopa/carbidopa y extracto de *Nertera granadensis***

### **5.2.1. Comportamiento motor de los animales en campo abierto**

La asociación de selegilina con levodopa es empleada dentro de los tratamientos de la enfermedad de Parkinson, de igual forma algunos estudios con fitoterapéuticos han reportado interacciones neuroestimuladoras al ser asociados con levodopa (Jost *et al*, 2014), teniendo en cuenta lo anterior se evaluó el efecto de la asociación del extracto con levodopa- carbidopa.

Se comprobó que la dosis de levodopa/carbidopa (100/10 mg/kg), reportada en la literatura (Olaya *et al*, 2019) no presentó efecto significativo sobre la reversión de hipocinesia, por tanto, dicha dosis se empleó en estas pruebas y se obtuvieron los siguientes resultados.

En la evaluación a las 2 horas, ninguna de las dosis del extracto presentó diferencia significativa frente al control, a diferencia de selegilina. Los animales administrados únicamente con extracto (sin levodopa-carbidopa) presentaron diferencia significativa comparados con selegilina (ver figura 6). A las 24 horas solamente selegilina presentó diferencia significativa comparada con el control. Los animales que fueron administrados con la asociación de extracto de *Nertera granadensis* (300mg/kg) más levodopa-carbidopa presentaron una mejor respuesta que los animales administrados únicamente con extracto. Además, esta asociación mostró una tendencia a revertir los efectos de la reserpina, sin que ésta fuera significativa.

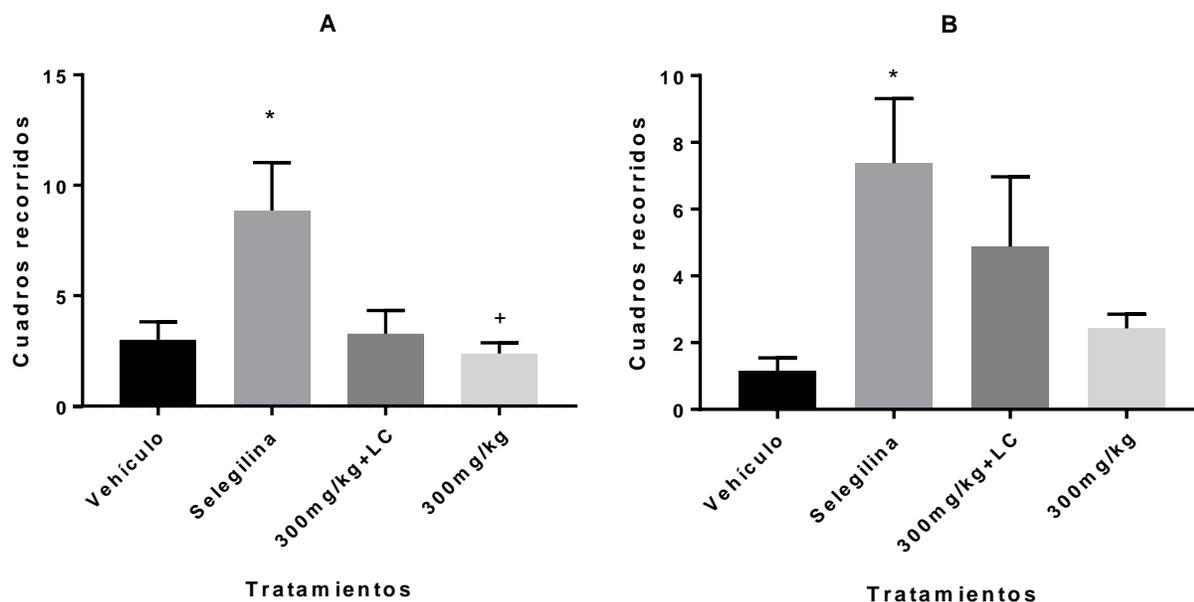


Figura 6. Efectos sobre la distancia recorrida después de administrar los tratamientos de Levodopa-carbidopa (100/10 mg/kg) más control (vehículo), más patrón de referencia (selegilina 10 mg/kg), más extracto de *Nertera granadensis* (300mg/kg), y otro grupo de tratamiento con 300mg/kg de extracto, a ratones en el modelo de reserpina. Evaluación a las 2 y 24 horas (A y B, respectivamente). Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de cada grupo de animales,  $p < 0,05$  ANOVA unidireccional. (\* diferencia significativa comparada con el control, + diferencia significativa comparada con selegilina).

### **5.2.2. Comportamiento motor de los animales en Pole test**

Al observar el comportamiento de los animales a las 2 horas, en cuanto al tiempo de realizar el giro en la barra, se observa significancia muy marcada entre el grupo de selegilina en comparación con el vehículo al presentar tiempos de giro menores que el vehículo y los tratamientos (ver figura 7), lo cual hace notar una marcada reversión de la bradicinesia en comparación con los otros tratamientos, esto se podría atribuir al efecto de potenciación de selegilina más L-DOPA-carbidopa ya que, la primera, inhibe la degradación y recaptación presináptica de la dopamina (Follmer, 2013). El grupo control en las observaciones de las 2 y 24 horas posteriores a la reserpinización, no presentaron buena respuesta ni en giro ni en descenso lo que concuerda con lo reportado por Willar *et,al* 2015, quien registró que el agotamiento agudo de dopamina en los animales les genera incapacidad de realizar la tarea. Los dos grupos administrados con extracto, tanto a las 2 como a las 24 horas, presentaron una disminución en el tiempo de giro comparado con el control, aunque no fue significativa.

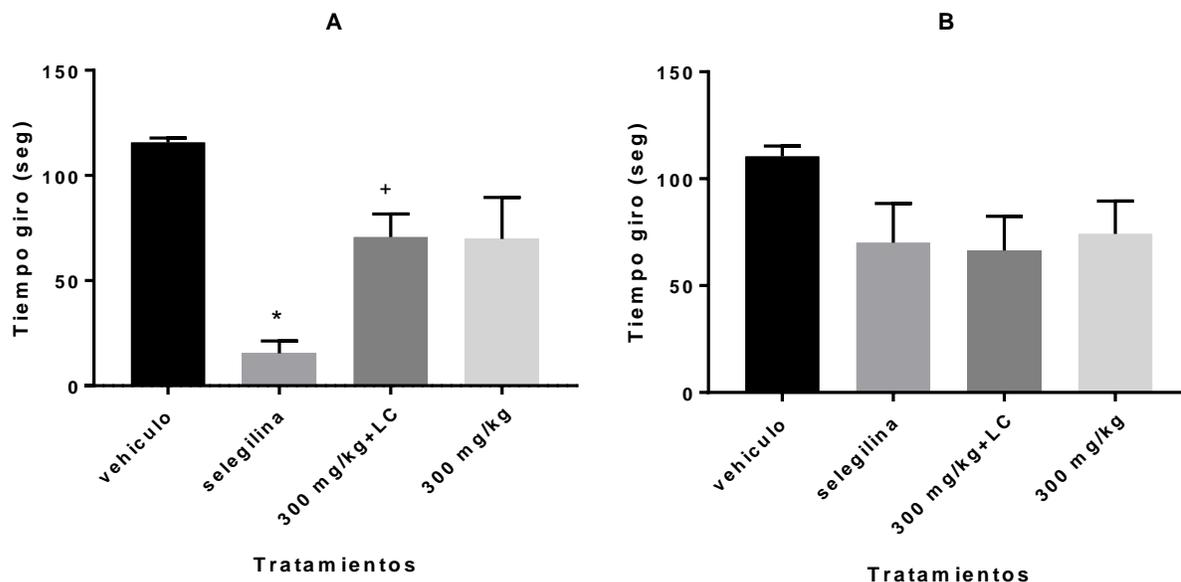


Figura 7. Efectos sobre el Pole test (giro). Tratamientos vehículo, selegilina, extracto de *Nertera granadensis* (300 mg/kg) a ratones con el modelo de reserpina y tratados con L-DOPA-carbidopa. Evaluación a las 2 y 24 horas (A y B, respectivamente). Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de cada grupo de animales,  $p < 0,05$  ANOVA unidireccional. (\* diferencia significativa comparada con el control, + diferencia significativa comparada con selegilina).

En cuanto al tiempo de descenso (ver figura 8), a las 2 horas tanto el grupo que recibió extracto más levodopa-carbidopa como el grupo de selegilina más levodopa-carbidopa presentaron diferencias significativas comparados con el control ya que este grupo no realizó el descenso. En cuanto a la dosis de 300 mg/kg del extracto más levodopa-carbidopa, se apreció una tendencia a revertir la bradicinesia, aunque no siendo tan marcada como la respuesta vista con selegilina más levodopa-carbidopa.

Por otra parte, a las 24 horas ningún tratamiento presentó diferencia significativa comparado con el control, pero tanto selegilina como los grupos tratados con el extracto presentaron disminución del tiempo de descenso.

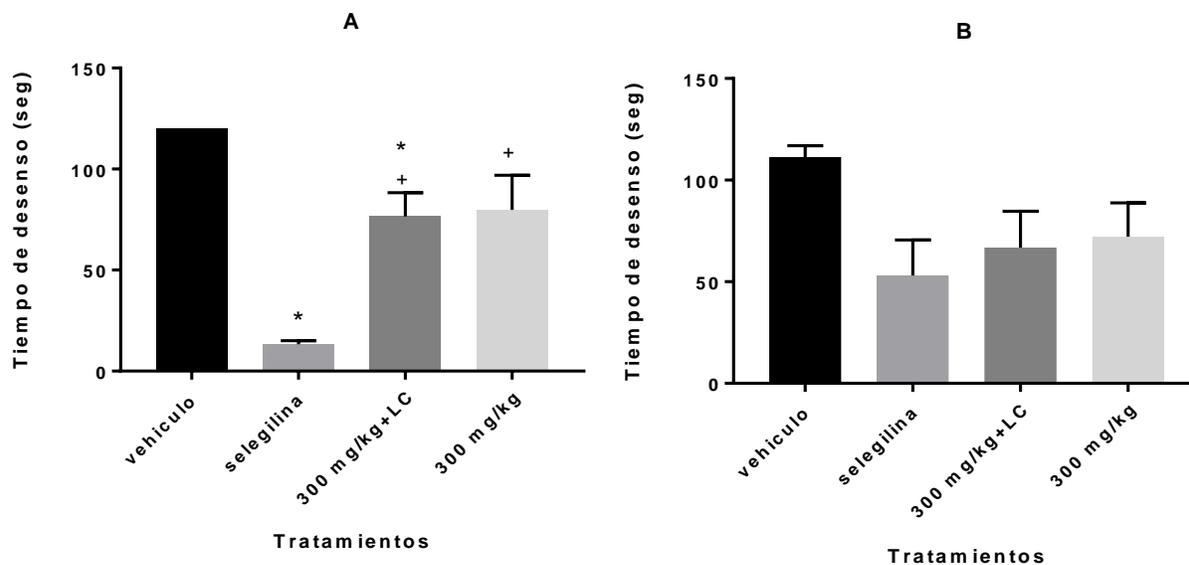


Figura 8. Efectos sobre el Pole test (descenso). Tratamientos vehículo, selegilina, extracto de *Nertera granadensis* (300 mg/kg) a ratones con el modelo de reserpina y tratados con L-DOPA-carbidopa. Evaluación a las 2 y 24 horas (A y B, respectivamente). Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de cada grupo de animales,  $p < 0,05$  ANOVA unidireccional. (\* diferencia significativa comparada con el control, + diferencia significativa comparada con selegilina).

### 5.3. Actividad antioxidante

El modelo de administración aguda (unidosis) de reserpina en ratones induce a una disminución rápida de la dopamina desencadenando la sintomatología motora propia de enfermedad en los animales, por lo cual se esperaría adicionalmente que al bloquear la reserpina la captación vesicular de la dopamina se generasen subproductos neurotóxicos por la degradación metabólica enzimática de la dopamina, sin embargo, en el análisis de múltiples comparaciones, la concentración de MDA por prueba de TBARs en las diferentes muestras de tejido cerebral para cada grupo de tratamiento no presentó diferencia significativa entre estos, ni siquiera para el grupo blanco (animales sin tratamiento), en relación con el grupo control (vehículo) (ver figura 9); esto podría explicarse según lo reportado por Fernández 2012; quien encontró que tras la administración aguda de reserpina se aumenta la peroxidación de lípidos en el estriado, sin embargo los agentes antioxidantes fisiológicos son capaces de revertir los efectos de los ROS, hallazgo a tener en cuenta si consideramos que los cerebros se extrajeron inmediatamente después a la observación comportamental de los tratamientos a las 24 horas. Por otro lado, para poder observar concentraciones significativas de TBARs, según el mismo autor se requeriría de la administración de dosis con bajas concentraciones de reserpina de manera regular y periódica, las cuales inducirían progresivamente alteraciones en la función motora y aumento del estrés oxidativo estriatal (Fernandez *et al*, 2012).

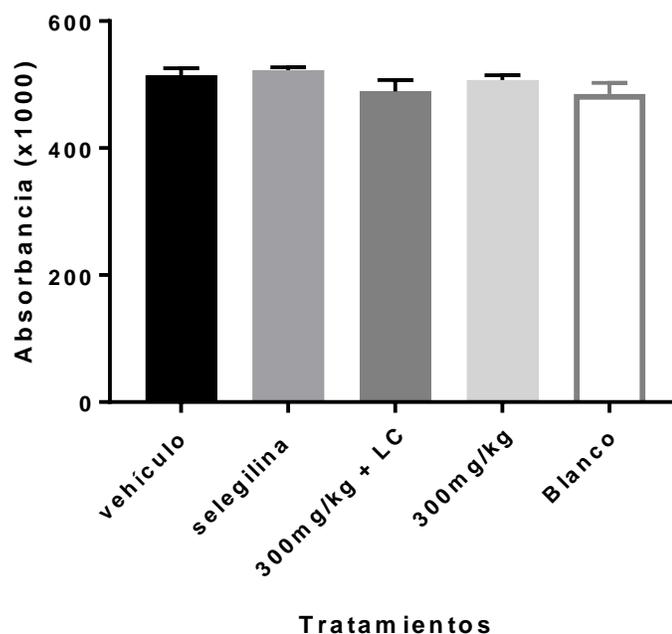


Figura 9. Actividad antioxidante. TBARs (Absorbancia a 532nm); Tratamientos (vehículo; selegilina; extracto etanólico de *Nertera granadensis* (300mg/kg + LC; 300mg/kg + Agua) y blanco (sin tratamiento) en animales reserpinizados y posterior administración de L-DOPA-carbidopa i.p, Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de cada grupo de 8 animales,  $p < 0,05$  ANOVA de una sola vía.

## 6. Conclusiones y recomendaciones

### 6.1 Conclusiones

- El extracto etanólico de *Nertera granadensis*, no presentó una actividad significativa antiparkinsoniana. Sin embargo, la dosis de 300mg/kg fue la que presentó mejor respuesta con tendencia a revertir la bradicinesia en el modelo de inducción de Parkinson por reserpina en el Pole test.
- La asociación del extracto de *Nertera granadensis* (300mg/kg) con L-DOPA-carbidopa mostro una mayor tendencia a revertir los efectos de la reserpina en la prueba de campo abierto.
- No se pudo comprobar actividad antioxidante del extracto etanólico de *Nertera granadensis*, dado que el modelo de Parkinson inducido por reserpina en administración aguda no generó estrés oxidativo evidente al momento de desarrollar la prueba de TBARs.
- En Pole test y campo abierto, pruebas empleadas para evaluar la actividad motora de los animales, mostraron la dosis de 300 mg/kg como el

tratamiento con mejor respuesta en la reversión de los síntomas parkinsonianos.

## 6.2 Recomendaciones

- Se recomienda evaluar el extracto de *Nertera granadensis* en modelos *in vivo* tales como 6-hidroxidopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP), los cuales presentan neurodegeneración dopaminérgica. Lo anterior teniendo en cuenta los efectos neuroprotectores que ha presentado este extracto en ensayos preliminares.
- Se recomienda evaluar la actividad antioxidante en un modelo que genere estrés oxidativo marcado como por ejemplo el de haloperidol.

## **Anexos**

### **Anexo 1. Evaluación del tremor, hipocinesia y rigidez inducida por reserpina en los animales**

Esta se realizó por simple observación y se calificó de la siguiente manera:

#### **Tremor:**

Se sujetó el animal en posición supina y se observaron las extremidades, y se asignó puntuación de la siguiente forma:

- 2 = se observa fácilmente tremor en las extremidades
- 1 = se observan movimientos intermitentes o de modesta amplitud
- 0 = no se observa tremor alguno, no hay diferencia con animales normales

#### **Rigidez:**

Evaluó la resistencia del animal al desplazamiento en el plano horizontal, la puntuación fue:

- 2 = a cualquier maniobra muestra rigidez al movimiento
- 1 = a cualquier maniobra revela incremento del tono muscular moderado}
- 0 = no hay clara evidencia de incremento de tono muscular, no hay diferencia con los animales normales

## **Hipocinesia:**

Se evaluó la disminución de respuesta en los movimientos voluntarios tras la estimulación suave del animal para desencadenar el movimiento voluntario espontáneo, la puntuación fue:

- 2 = el animal no mueve cabeza ni extremidades
- 1 = se observan algunos movimientos de cabeza y extremidades (baja locomoción)
- 0 = el animal responde a la manipulación y se desplaza por el tablero.

## **Flexión postural:**

Se sujetó al animal de manera que quedara suspendido, se observó la posición de las extremidades, la puntuación fue:

- 2 = se observa severa flexión de los miembros
- 1 = hay flexión de las extremidades, pero no es marcada
- 0 = los miembros están en posición normal, no hay diferencia con animales normales

(Colpaert, 1987)

Todos los animales que fueron sometidos a una inducción correcta de signos Parkinsonianos presentaron la siguiente puntuación:

---

ITEM	0	1	2
<b>Tremor</b>			X
<b>Rigidez</b>			X
<b>Hipocinesia</b>			X
<b>Flexión postural</b>			X

Por lo cual, los individuos presentaron efecto intenso en cuanto a parámetros de movimiento (acinesia, catalepsia e hipocinesia), así como a nivel postural donde el los individuos presentaron lomo arqueado, cierre de dedos en efecto intenso, rigidez en flexión, confirmando que se alcanzó el nivel deseado de depleción dopaminérgica lo que asegura la sintomatología parkinsoniana en los biomodelos tratados con la reserpina (Fernandes, y otros, 2012) .

## Anexo 2. Test neurológico para el Pole test

Esta observación permitió identificar en cada grupo el porcentaje de movilidad de cada individuo en la prueba, la calificación se dio de la siguiente manera:

- 0= no realiza la acción
- 1= realiza la acción

Con lo cual 1 es la calificación más alta y registró a todos los animales normales y aptos para la prueba.

Tabla 2. Descripción del test neurológico

Pruebas	Descripción
Reflejo de caída	Reflejo que corrige la orientación del cuerpo cuando se toma fuera de su posición vertical normal.
Reflejo de flexion-tension	Es un reflejo de las extremidades el cual cuando estas son estiradas tienden a recogerse.
Reflejo de corrección	Cuando el animal es dispuesto boca arriba en una superficie plana el tiende a corregir posición.
Reacción de apoyo (Tactismo y vibrisas)	Suspensión de la rata a partir de la cola y se acerca a una superficie plana. Por lo cual ella busca equilibrarse.
Localización visual	Se suspende la rata horizontalmente de tal manera que las patas anteriores alcancen la superficie.

Fuente: (Quintero-Falla, 2014).

Con el ánimo de refinar la selección de los animales en la evaluación de desempeño motor y de coordinación en el pole test, se observó si tanto miembros anteriores, posteriores y la cola habían sido usadas para la ejecución de la prueba, dándose una calificación a cada animal para determinar aquellos de mejor

desempeño neuromotor y aptos para posterior evaluación de los tratamientos; estos valores son:

- 1 = La prueba es perfecta cuando el animal usa sus cuatro extremidades y la cola.
- 2 = Usa las 4 extremidades, pero la cola no.
- 3 = Usa 3 extremidades y la cola.
- 4 = Usa 2 extremidades y la cola no.
- 5 = Usa una sola extremidad y la cola no (Quintero-Falla, 2014).

Donde 1 es la mejor puntuación e indica un animal con respuesta neuromotora y coordinación normal.



Imagen 1. Evaluación de animales en pole test

### **Anexo 3. Actividad de los tratamientos como parte de la estandarización del diseño experimental**

La evaluación de la actividad de los diferentes tratamientos sobre la actividad motora, es necesaria para identificar sus respuestas en los animales a nivel basal con el fin de logra la familiarización con sus respuestas y así posteriormente poder identificar los cambios de éstas en los animales pretratados con reserpina con el propósito de obtener resultados valiosos, confiables reproducibles y comparables en las evaluaciones definitivas de los tratamientos en los diversos modelos aplicados (Nuñez-Figueredo *et al*, 2009).

#### **Comportamiento motor del animal normal en el campo abierto**

Se realizaron observaciones de los animales sin ningún tratamiento en campo abierto por un periodo de tiempo de 5 min, se apreció el comportamiento del animal en su deambulación (movimiento activo dentro del campo), levantamientos (de miembros anteriores), acicalamientos, defecaciones, micciones, intentos de escalar las paredes, intento de roer las paredes o las esquinas de las paredes o el piso, periodos de latencia y quietud, así como el número de cuadros recorridos.

Muy pocos individuos realizaron salto en el campo abierto, al igual que roer las esquinas o el piso del campo, ninguno de los individuos presentó periodos de latencia o quietud durante el tiempo de observación, el acicalarse se observó en general en dos ocasiones por individuo, sus levantamientos promediaron en 38,1;

el promedio de cuadros recorridos  $145 \pm 1$ , las micciones y defecaciones se estimaron no mayores a 1 observación por animal. Se observó un patrón de exploración bastante amplio en el animal normal, así como su capacidad locomotora, en cuanto al factor emocional evaluada en las defecaciones y micciones se observó que estas aportaban a un ambiente conocido, ya que luego de realizar rondas de exploración, regresaban en ocasiones a olaftearlas, la actividad exploratoria en los animales se desarrolló en un 90% en los perímetros del campo y realizando la mayoría de levantamientos en las esquinas del campo lo cual es indicativo de presentar ansiedad frente a un entorno desconocido y nuevo. Sin embargo, al ser relativamente pocas las ocasiones en que se evidenciaron acicalamientos, reflejaría que el animal no presenta grados de estrés altos en el tiempo de observación; estos hallazgos son concordantes a los registrados por Simeonova y Rua & Yao en sus estudios de comportamiento en *Mus musculus* (Simeonovska-Nikolova *et al*, 2000; Rua *et al*, 2020).



Imagen 2. Ratón normal observado en campo abierto.

## Comportamiento motor del animal reserpinizado en campo abierto

En los animales de experimentación administrados con reserpina se observaron alteraciones motoras tales como hipolocomoción o hipocinesia, hipotermia, rigidez muscular, masticación vacía, ptosis palpebral, temblor corporal, las cuales se atribuyen al déficit dopaminérgico inducido por la reserpina de un ~85% en la SNpc y depleción dopaminérgica de >95% en el cuerpo estriado 120 min post administración, de igual manera la concentración de dopamina en el SNpc retorna en un ~30 % a las 24 horas tras la administración, así mismo la reserpina desencadena cambios en otros núcleos de los ganglios basales, como es el caso del núcleo subtalámico (STN) el cual presenta un incremento de sus funciones hasta en un 50%, lo cual se ha observado en la EP; por otro lado reduce un aumento de los niveles de glutamato extracelular en las regiones de salida en el núcleo entopeduncular en el caso de los humanos que sería el homólogo al globo pálido interno (GPi) en los roedores (Deber *et al*, 2011), además produce un déficit funcional de la tirosina hidroxilasa, transportador de dopamina (DAT) y MAO (Hedgecock *et al*, 2018; Mol de Freitas *et al*, 2014).

Tras la administración intra peritoneal de la reserpina en nuestros animales de estudio, los síntomas parkinsonianos empezaron a ser visibles a partir de los 40 a 60 primeros minutos post reserpinización, siendo el primer síntoma manifestante la hipocinesia junto con el erizado del pelaje del animal, seguido se observó la presencia de rigidez en los miembros posteriores y por último el temblor corporal, estos últimos manifestándose entre los 60 a 80 min post reserpinización, lo cual concuerda con lo reportado por Colpaert (1987). El temblor, rigidez y flexión de los miembros y cierre de dedos de la mano fueron más evidentes sobre las dos y media horas post reserpinización y se observaron con intensidad a las 24 horas post reserpinización. El temblor postural se apreció en los individuos en la cabeza y

tronco principalmente, los movimientos de masticación vacía fueron más evidentes sobre las 24 horas, así como la catalepsia como indicativo de rigidez; ésta está atribuida no solo a la disminución de la neurotransmisión dopaminérgica sino también a un bloqueo selectivo de receptores estriatales D2 (Dutra-C *et al*, 2002).



Imagen 3. Ratón reserpinizado observado en campo abierto.

### **Comportamiento motor del animal tratado con selegilina en el campo abierto**

La selegilina administrada por vía oral presenta absorción rápida, con biodisponibilidad del 70% y presenta capacidad de pasar barrera hematoencefálica (BHE), su concentración plasmática máxima se obtiene entre 30 min y 2 horas; su metabolismo es hepático y de éste se forman tres metabolitos activos: L-metanfetamina, L-anfetamina y : N-desmetildeprenil los cuales presentan eliminación a nivel renal entre 16 a 69 horas post administración; presenta menores

interacciones medicamentosas y menor margen de desencadenar hipertensión a comparación de otros IMAO debido a su selectividad de ésta (Bahena-Trujillo, 2000). Al ser administrada a los animales reserpinizados éstos mostraron una significativa mejoría en cuanto al desempeño motor en comportamiento espontáneo en el campo abierto (cuadros recorridos) a las 2 y 24 horas en comparación con el grupo control (vehículo); éstas observaciones están en concordancia a su mecanismo de acción, en el cual bloquea la actividad de la MAO en el cerebro previniendo o minimizando el proceso de oxidación de AD dando una fusión de neuroprotección evitando el estrés oxidativo; adicionalmente sus metabolitos activos como el caso de la L-anfetamina aumentan la transmisión dopaminérgica por estimulación de liberación de dopamina.

### **Comportamiento motor de los animales tratados con levodopa-carbidopa**

A nivel basal la levodopa – carbidopa en los animales se observaron movimientos distónicos, aumento en la frecuencia respiratoria, episodios bradicinéticos, cambios comportamentales como episodios psicóticos (perdida de contacto con la realidad, delirios, vocalizaciones sin estímulo doloroso), ataxia, blefaroespasmos, aunque no se observaron convulsiones los animales presentaron comportamiento como de aura o fase pre ictial (mirada fija), aumento de la irrigación ocular (ojo más rojo), cola de straub, piloerección, disminución del reflejo de enderezamiento, la fuerza de aprehensión se mantuvo al igual que la coordinación y el emplazamiento. Manifestaciones comportamentales concordantes con las reportadas por Schmack y Cols, así como Rodríguez y cols, en estudios de concentraciones intrínsecas mayores de dopamina e intoxicación con levodopa – carbidopa (Schmarck *et al*, 2021; Rodríguez Villareal *et al*, 1984). No se apreciaron episodios de diarrea ni de poliuria.

Estos cambios se evidenciaron a los 2:30 min post administración de Levodopa-carbidopa vía IP, y a los 7 min post administración levodopa-carbidopa vía PO, la sintomatología anteriormente descrita está presente en las observaciones a causa del aumento de dopamina a nivel de SNC, sobre estimulando la vía estriatal, ya que al estimular los receptores D1 (localizados en la membrana de las terminales sinápticas y de la región somato dendrítica de las NEMs de proyección estriado nigral de la vía directa) y los D2 (localizados en la membrana de las terminales sinápticas y de la región somato dendrítica de las NEMs de proyección estriadopalidal de la vía indirecta), al activarse los receptores D1 desencadena efectos excitatorios como inhibitorios, por otro lado; al activar estos últimos con agonistas dopaminérgicos pude llegar a inhibir la liberación de GABA; lo que desencadena aumento de plasticidad cerebral, pérdida de inhibición intra cortical, alteración de la integración sensorio motora, aumento marcado de la actividad vía directa con posterior disminución en la actividad de la vía indirecta; disminución en la actividad de GPe y GPi así como de la actividad del núcleo subtalámico pero con una alta actividad de corteza prefrontal durante el movimiento (Ospina-García *et al*, 2017).

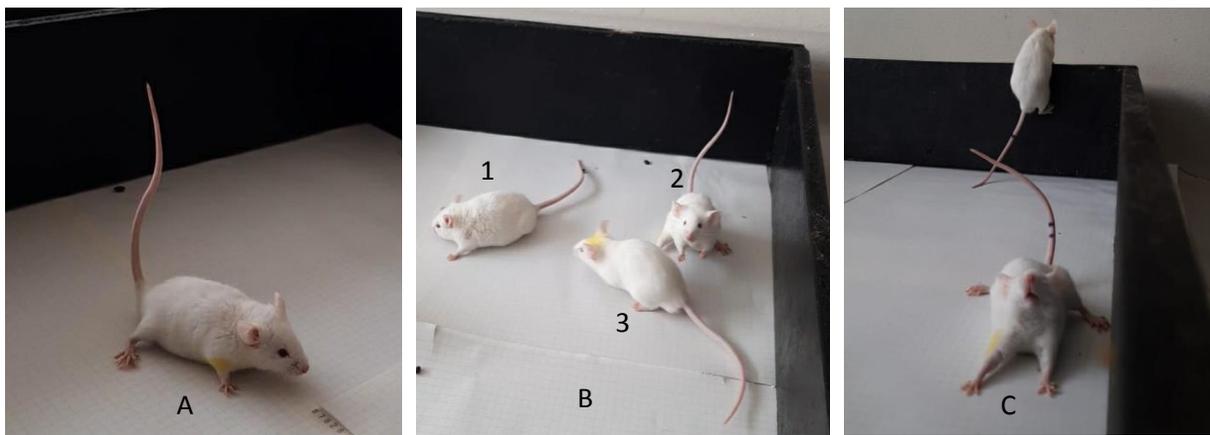


Imagen 4. Ratones tratados con L-Dopa-carbidopa. A. Cola de straub. B. 1. Ratón solo reserpinizado, nótese el pelo erizado. 2. Ratón con pose defensiva sin razón. 3. Ratón normal. C. Ratón con alucinaciones y vocalizaciones.

### **Comportamiento motor de los animales tratados con extracto de *Nertera granadensis* con la mejor dosis en campo abierto**

Al administrar a los animales extracto étanólico de *Nertera granadensis* a dosis de 300mg/kg como único tratamiento, se observó a las 2 horas una muy notable reducción de la distancia recorrida en el campo abierto en comparación de los animales normales, lo cual podría indicar que dentro de los componentes de extracto podría haber presencia de compuestos químicos no identificados con actividad sedante, ansiolítico o relajante muscular, por lo cual no se descarta la posibilidad ya que en esta familia (Rubeaceae) de plantas se han reportado extractos con estos efectos (W-Bariweni *et al*, 2017).

Sin embargo, el efecto de estas sustancias no se mantiene en el tiempo lo cual se evidencia a las 24 horas posteriores a la administración del extracto, donde se observan distancias recorridas muy similares a las observadas en el grupo control.

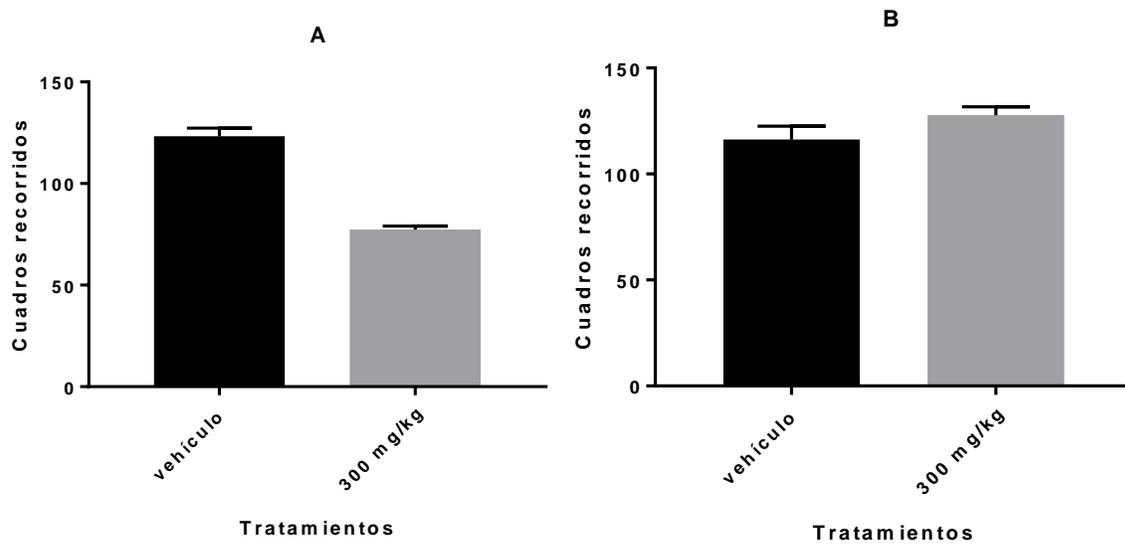


Figura 10. Efectos sobre la distancia recorrida después de administrar extracto de *Nertera granadensis* (300mg/kg), control (vehículo) a nivel basal en ratones. Evaluación a las 2 y 24 horas (A y B, respectivamente). Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de cada grupo de animales,  $p < 0,05$  ANOVA unidireccional.

## Bibliografía

- A, S., Bist, R., & Bubber, P. (2013). Thiamine deficiency induces oxidative stress in brain mitochondria of *Mus musculus*. *Journal of Physiology and Biochemistry.*, 69(3), 539–546. doi:10.1007/s13105-013-0242-y
- Álvarez-Fernández, G., Bustos-Jaimes, I., Castañeda-Patlán, C., Guevara-Fonseca, J., Romero-Álvarez, I., & Vázquez-Meza, H. (2010). Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. *Mensaje Bioquímico*, 34, 143-154. Obtenido de <http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>
- Angoa-Pérez, M., Rivas-Arancibia, & Selva. (2007). Estrés oxidativo y neurodegeneración: ¿causa o consecuencia? *Archivos de neurociencia*, 12(1), 45-54. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/arcneu/ane-2007/ane071f.pdf>
- Ariza-Serrano, L. M., Guerrero-Vega, J., Ortíz, P., & Moreno-López, C. L. (2016). Caracterización de pacientes con enfermedad de Parkinson en un centro de referencia en la ciudad de Bogotá, Colombia. *Acta neurológica Colombiana*, 32(3), 203-208.
- Arredondo-Blanco, K., Zerón-Martínez, R., & Rodríguez-Violante, M. (2018). Breve recorrido histórico de la enfermedad de Parkinson a 200 años de su descripción. *Gaceta médica de México*, 719-726.
- Ávalos, G., Pérez, A., & Urria, C. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*, 2(3), 119-145. Obtenido de [https://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo\\_secundario\\_de\\_plantas.pdf](https://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf)
- Bahena-Trujillo, R., Flores, G., & Arias-Montaña, J. A. (2000). Catecolaminas, síntesis, metabolismo, receptores adrenérgicos y dopaminérgicos. *Rev. Biomed*, 11, 39-60. Obtenido de <https://www.revistabiomedica.mx/index.php/revbiomed/article/view/218>
- Balkaya, M., & Endres, M. (2010). Behaviorak testing in Mouse models of Stoke. En *Neuromethods* (Vol. 47, págs. 179-197). doi:10.1007/978-1-60761-750-1\_13
- Baltacıoglu, E., Alev-Akalın, F., Alver, A., Deger, O., & Karabulut, E. (2008). Protein carbonyl levels in serum and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *Archives of oral biology*, 53, 716-722. doi:doi:10.1016/j.archoralbio.2008.02.002

- Barboza, G., Cantero, J., Núñez, C., Pacciaroni, A., & Ariza-ESpina, L. (2009). Plantas medicinales: Revisión y "screening" fitoquímico y etnofarmacológico de la flora nativa Argentina. *Scielo.org.ar*, 34(1-2), 7-365. Obtenido de <http://www.scielo.org.ar/pdf/kurtz/v34n1-2/v34n1-2a02.pdf>
- Benoit- Waxman, E., & Giasso, A. (2011). Induction of intracellular tau aggregation is promoted by  $\alpha$ -synuclein seeds, and provides novel insights into the hyperphosphorylation of tau. *J Neurosci*, 31(21), 7604–7618. doi:10.1523/JNEUROSCI.0297-11.2011
- Borhidl, A., & Pérez, D. (2002). Introducción a la taxonomía de la familia rubiaceae en la flora de México. *Acta Botanica Hungarica*, 44(3-4), 237-280. Obtenido de <http://repositorio.fcencias.unam.mx:8080/jspui/bitstream/11154/141531/1/Familia%20Rubiaceae%20NellyD.pdf>
- Bruneton, J. (2001). En *Farmacognósia. Fitoquímica. Plantas medicinales* (2 ed., pág. 1080). Acribia. Obtenido de [https://tejararossi.files.wordpress.com/2017/01/farmacognosia\\_bruneton.pdf](https://tejararossi.files.wordpress.com/2017/01/farmacognosia_bruneton.pdf)
- Buriticá, O., & Diaz-Granados, J. A. (2004). Capítulo 9. Inhibidores de la COMT. *Asociación Colombiana de Neurología. Digitaly signed by ACN*, 95-99. Obtenido de <http://www.acnweb.org/guia/g4cap9.pdf>
- Campos-Romo, A. (2008). Evaluación de alteraciones motoras en modelos animales de enfermedad de Parkinson. *Revista de Neurología. Departamento de fisiología. Facultad de medicina. Universidad Autónoma de México*, 46, 167-174. doi:<https://doi.org/10.33588/rn.4603.2007334>
- Cánovas-Alonso, A., Piudo-Luquin, R., Ruíz-Espiga, G. P., Burguera, J., Campos-Arillo, V., Castro, A., . . . Martínez-Castillo, J. (2014). Dopaminergic agonists in Parkinson's disease. *Elsevier España*, 29(4), 230-241. doi:10.1016/j.nrl.2011.04.012
- Castañeda-Achutiguí, F., Tejeda-Martínez, A., Escalante-Castañeda, A., Suces-Bernes, H. A., Monterrubio-Ledezma, E., & García-Lemus, R. (2015). Classical models of Parkinson's induction. *Revista electrónica de neurología*, 6(13), 1-21. Obtenido de [https://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2015/13/Casta%C3%B1eda/Casta%C3%B1eda6\(13\)020915.pdf](https://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2015/13/Casta%C3%B1eda/Casta%C3%B1eda6(13)020915.pdf)
- Castro-Díaz, S. L. (2006). *Ecaliación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de Isertia laevis empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos*. Bogotá, Colombia : Pontificia Universidad Javeriana.
- Castro-Toro, A., & Buriticá, O. F. (2014). Parkinson's disease: diagnostic criteria, risk factor and progression, and assessment scales clinical stage. *Actas neurológicas de Colombia*, 30(4), 300-306.
- Chaves-León, E., Ontiveros-Urbe, M. P., & Carillo-Ruiz, J. D. (2013). La enfermedad de Parkinson: neurología para psiquiatras. *Salud mental*, 36(4), 315-324.

- Colpaert, F. (1987). Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hipokinesia induced by reserpine in rat. *Neuropharmacology, Pergamon Journals.*, 26(9), 1431-1440.  
doi:10.1016/0028-3908(87)90110-9
- Congreso de la República. (2012). Obtenido de [http://www.proteccionanimalbogota.gov.co/sites/default/files/marco-legal/ley\\_84\\_de\\_1989.pdf](http://www.proteccionanimalbogota.gov.co/sites/default/files/marco-legal/ley_84_de_1989.pdf)
- Corpochivor. (2012). Productos forestales no maderables de Corpochivor. 1-278. Obtenido de <http://forestal.corpochivor.gov.co/wp-content/uploads/2016/08/Especies-forestales-no-maderables-de-Corpochivor.pdf>
- Cuenca-Alcañiz, J., & González-Sánchez, M. J. (2016). *MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDAD DE PARKINSON* - (1-17 ed.). Madrid - España: UNIVERSIDAD COMPLUTENSE.
- Deber, S., & Jenner, P. (2011). Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol.*, 4(164), 1357-1391.  
doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01426.x
- Delamarre, A., & Meissner, W. (2017). Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease. *La presse medicale*, 1-7. doi:10.1016/j.lpm.2017.01.001
- DeMaagd, G., & Philip, A. (2015). Part 2: Introduction to the Pharmacotherapy of Parkinson's Disease, With a Focus on the Use of Dopaminergic Agents. *Journal for formulary management. Peer-reviewed*, 40(9), 590-600. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4571848/>
- Dezsi, L., & Vecsei, L. (2017). Monoamine Oxidase B Inhibitors in Parkinson's Disease. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 17, 425-439.  
doi:10.2174/1871527316666170124165222
- Dominguez-Mendoza, E. A. (2012). Síntesis de indolilimidazolinas y espirooxindoles como posibles antidepressivos. *Cinvestat*, 1-65. Obtenido de <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/1141/SSIT0010868.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Dorado-Martinez, C., Rugerio-Vargas, C., & Rivas-Arancibia, S. (2003). Etrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med UNAM*, 46(6), 229 - 235. Obtenido de <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no46-6/RFM46606.pdf>
- Dutra-C, R. A., & Tufik, S. V. (2002). Behavioral effects of MK-801 on reserpine-treated mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*(26), 487-495.  
doi:10.1016/s0278-5846(01)00295-0
- Emamzadeh, F., & Surguchov, A. (2018). Parkinson's disease: biomarkers, treatment and risk factors. *frontiers in Neuroscience*, 12(612), 1-14. doi:10.3389 / fnins.2018.00612

- Escalona, D., Valderrama, M., Orsini, G., Anita, I., Ciangherotti, C., Bermudez, J., & Salazar, M. (2019). Analgesic activity of epi-ursolic acid isolated from *Cestrum buxifolium* Kunth leaves Comparison with ursolic acid. *Revista de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela*, 82, 142-151. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/337984618\\_Actividad\\_analgesica\\_del\\_acido\\_epiursolico\\_aislado\\_de\\_las\\_hojas\\_de\\_Cestrum\\_buxifolium\\_Kunth\\_Comparacion\\_con\\_el\\_acido\\_ursolico\\_Analgesic\\_activity\\_of\\_epi-ursolic\\_acid\\_isolated\\_from\\_Cestrum\\_buxifolium\\_K](https://www.researchgate.net/publication/337984618_Actividad_analgesica_del_acido_epiursolico_aislado_de_las_hojas_de_Cestrum_buxifolium_Kunth_Comparacion_con_el_acido_ursolico_Analgesic_activity_of_epi-ursolic_acid_isolated_from_Cestrum_buxifolium_K)
- Estrada - Bellmann, I., & Martínez- Rodríguez, H. R. (2010). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Parkinson. (F. d. UANL, Ed.) *Avances*, 8(25), 16-25.
- FDA, U. F. (2017). *FDA approves drug to treat Parkinson's disease*. Washington D.C: U.S Food & Drug administrative. Obtenido de <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-drug-treat-parkinsons-disease>
- Feng, X., & Su, X. (2019). Anticancer effect of ursolic acid via mitochondria-dependent pathways. *Oncol Lett.*, 17(6), 4761-4767. doi:10.3892/ol.2019.10171
- Fernandes, V., Santos, J., Leão, A., Medeiros, A., Melo, T., Izídio, G., . . . Silva, R. (2012). Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*(231), 154-163. doi: 10.1016/j.bbr.2012.03.008.
- Ferrer-Hernández, A. E., Hernández-Escalona, M., Pérez-Martínez, C. S., Basterrechea-Rey, M., Fuentes-Fiallo, V. R., & Torres-Ferrer, M. (2007). Aislamiento de ácido ursólico de las hojas de *Cestrum laurifolium* L'Herit. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 38(1), 243-247. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=1816/181621661008>
- Flint-Henchcliffe, C., & Beal, M. (2008). Mitochondrial biology and oxidative stress. *Nature clinical practice NEUROLOGY*, 4(11), 600-609. doi:10.1038/ncpneuro0924
- Galetovic, A., E- Araya, J., & Gómez-Silva, B. (2017). Composición bioquímica y toxicidad de colonias comestibles de la cianobacteria andina *Nostoc* sp. Llayta Biochemical composition and toxicity of edible colonies of the cyanobacterium *Nostoc* sp. Llayta. *Revista chilena de nutrición*, 44(4), 360-370. doi:http://dx.doi.org/10.4067/s0717-75182017000400360.
- García-de Vello Moreno, M. d. (2015). *Productos naturales como candidatos a fármacos en enfermedades neurodegenerativas*. Madrid - España: Universidad Complutense de Madrid- Facultad de farmacia. Obtenido de <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MARIA%20DEL%20PILAR%20GARCIA%20DEL%20VELLO%20MORENO.pdf>
- Garnica-Fernández. Almudena., R.-E. P.-D.-C.-F.-S.-F. (2009). Guía de buena práctica en geriatría. Enfermedad de Parkinson. Sociedad Española de Geriatria y Gerontología.

- Glajch, K., Fleming, S., Surmeier, & DJ y Osten, P. (2012). Sensorimotor assessment of the unilateral 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Behavioral brain reseach*, 230(2), 309-016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.12.007>
- Gómez-Chavaraín, M., Roldan-Roldan, G., Morales-ESpinosa, R., Pérez-Soto, G., & Torner-Aguilar, C. (2012). Mecanismos fisiopatológicos involucrados en la enfermedad de Parkinson. *Arch Neurocién Mex*, 17(1), 25-33.
- González-Burgos. E., P. O.-S. (2010). Neuroprotección mediada por diterpenos aislados de *Sideritis* spp. frente al estrés oxidativo en astrocitos. *ARS Pharmaceutica*, 617-627. Obtenido de <http://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/26623/Ars%20Pharm%202010%3b51%28Suppl3%29617-627.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- González-Cadavid, L. M., Mosquera-Martínez, O. M., & Niño-Osorio, J. (2012). Ciclotidos de la especie *Guettarda crispiflora* (Rubiaceae). *Scientia et Technica*, 51, 1-8. Obtenido de [https://pdfs.semanticscholar.org/aa1a/6b5b29ff7d9ff66c2f53d56a5b425aac92eb.pdf?\\_ga=2.86145880.1775993432.1562679039-1795838338.1547568414](https://pdfs.semanticscholar.org/aa1a/6b5b29ff7d9ff66c2f53d56a5b425aac92eb.pdf?_ga=2.86145880.1775993432.1562679039-1795838338.1547568414)
- Guerrero-Díaz, M. T., Macías-Montero, M. C., Prado, E., Florentino-Muñoz, P., Hernández-Jiménes, M. V., & Duarte-García, L. J. (s.f.). *Enfermedad de Parkinson. Capítulo 49*.
- Guerrero-Díaz, M. T., Macías-Montero, M. C., Prado-Esteban, F., Muñoz-Pascual, A., Hernández-Jiménes, M. V., & Duarte-García, L. J. (2007). Enfermedad de parkinson. Capítulo 49. En T. d. residentes. Madrid - España: Sociedad Española de Geriatria y Gerontología.
- Hamm, R., Pike, B., O'Dell, D., Lyeth, B., & Jenkins, L. (1994). The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 11(2), 187-196. doi:10.1089/neu.1994.11.187
- Hastings, T. (2009). The role of dopamine oxidation in mitochondrial dysfunction: implications for Parkinson's disease. 41, 469-472. doi:10.1007/s10863-009-9257-z
- Hedgecock, T., Phillips, A., Ludrick, B., Golden, T., & Wu, N. (2018). Molecular Mechanisms and Applications of a Reserpine-Induced Rodent Model. 1-8. doi:10.21276/SSR-IIJLS.2019.5.1.8
- Herrera-Tejedor, J. (2010). Fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. *Boletín farmacoterapéutico de Castilla - La Mancha*, 11(5), 1-8. Obtenido de <https://studylib.es/doc/5533944/f%C3%A1rmacos-para-el-tratamiento-de-la-enfermedad-de-parkinson>
- Hijova-E, N. (2005). Changes in ascorbic acid and malondialdehyde in rats after exposure to mercury. *BratisLek Listy*, 106(8-9), 248-251. Obtenido de <http://bmj.fmed.uniba.sk/2005/10689-02.pdf>

- Humboldt, I. (2018). *Catalogo de la Biodiversidad* . Obtenido de <http://catalogo.biodiversidad.co/file/56de80e383c45700544e3c2c/details>
- Humboldt, Instituto. (2014). Plantas del páramo y sus usos para el buen vivir. Obtenido de <http://repository.humboldt.org.co/handle/20.500.11761/9277>
- Hurtado, F., Cárdenas, M. A., Cárdenas, F., & León, L. A. (2016). Enfermedad de Parkinson: Etiología, tratamientos y factores preventivos. *Universitas psychología*, 15(5), 1-26. doi:ISSN 1657-9267
- Hyun-Kim, K., Ah-Kim, M., Moon, E., Yeou-Kim, S., Zin-Choi, S., Won-Son, M., & Ro-Lee, K. (2011). Furostanol saponins from the rhizomes of *Dioscorea japonica* and their effects on NGF induction. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21, 2075–2078. doi:10.1016/j.bmcl.2011.02.003
- ICA, M. d. (2001). Obtenido de [http://www.vertic.org/media/National%20Legislation/Colombia/CO\\_Resolucion\\_2935\\_d\\_e\\_2001.pdf](http://www.vertic.org/media/National%20Legislation/Colombia/CO_Resolucion_2935_d_e_2001.pdf)
- Jamwal, S., Singh, S., & Singh., S. (2017). *Animal Models of Neurological Disorders. Chapter: Behavioral Tests for Rodent Models*. (Primera, Ed.) SPRINGER. doi:10.1007/978-981-10-5981-0\_21
- J-Boluda, C., & Terrero, J. D. (2013). Iridoides y secoiridoides (1): clasificación, biosíntesis, importancia ecológica, estrategias evolutivas y modificaciones semisintéticas. *Revista de fitoterapia*, 13(2), 153-161. Obtenido de [www.fitoterapia.net](http://www.fitoterapia.net)
- Jost, W., Friede, M., & J, S. (2014). Comparative efficacy of selegiline versus rasagiline in the treatment of early Parkinson's disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, 18(22). Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25491607/>
- Júri-C, C., & Chana-C, P. (2006). Levodopa en la enfermedad de Parkinson. ¿Qué hemos aprendido? *Revista médica de Chile*, 893-901.
- Konta, B., & Wilhelm, F. (2008). The treatment of Parkinson's disease with dopamine agonists. *GMS Health Technol Assess.*, 4, 1-11. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3011299/>
- Lertxundi, U., Isla, A., Angeles-Solis, M., Domingo-Echaburu, S., Hernandez, R., Peral-Aguirregoitia, J., & Medrano, J. (2015). Anticholinergic burden in Parkinson's disease inpatients. *Eur J Clin Pharmacol*, 71, 1271-1277. doi:10.1007/s00228-015-1919-7
- Londoño-Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. *Desarrollo y Transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia* , 129-162. Obtenido de <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/handle/10567/133>
- López-Casas, J. G., Olivera-Martínez, E., & Rey-Benito, G. J. (2010). *Manual de Gestión Integral de Residuos*. Bogotá: República de Colombia, Instituto nacional de salud. Obtenido de

<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/manual-gestion-integral-residuos.pdf>

- López-D, S., & Rivas-Arancibia, S. (2008). Estrés oxidativo, metabolitos oxidados de dopamina y enfermedad de Parkinson. *Medigraphic - Revista Facultad de medicina UNAM*, 51(3), 104-107.
- Ludeña-Huaman, M. A. (2018). Método preparativo para la obtención de ácido ursólico a partir de *Clinopodium revolutum*. *RevT ColombT Quim*, 47(1), 10-15. doi:B'+k  
<http://dx.doi.org/V3:VCFE/rev:colomb:quim:vFvV:ECyvC>:
- Ludwig, H., Naranjo, J., & Cortes, M. (1978). Ursolic acid and asperuloside from *Nertera granadensis*. *Rev. Latinoam. Quím.*, 9(21).
- Luquin, M. d. (16 de Agosto de 2000). *Modelos experimentales de enfermedad de Parkinson*. Obtenido de Neurologia.com:  
[https://dadun.unav.edu/bitstream/10171/36412/1/Revista\\_Neurolog%C3%ADa\\_2000\\_31%281%29\\_60-6.pdf](https://dadun.unav.edu/bitstream/10171/36412/1/Revista_Neurolog%C3%ADa_2000_31%281%29_60-6.pdf)
- Magrinelli, F., Picelli, A., Tocco, P., Federico, A., Roncari, L., Smania, N., . . . Tamburin, S. (2016). Pathophysiology of Motor Dysfunction in Parkinson disease as the Rationale for Drug treatment and rehabilitation. *Parkinson Dis*, 1-14. doi:10.1155 / 2016/9832839.
- Mahami-Oskouei, M., Hamidi, F., Talebi, M., Farhoudi, M., Taheraghdam, A., Kazemi, T., . . . Fallah, E. (2016). The correlation between *Toxoplasma gondii* infection and Parkinson's disease: a case-control study. *Journal of parasitic diseases*, 40(6), 872-876. doi:10.1007/s12639-014-0595-3
- Marín, D., Carmona, H., Ibarra, M., & Gámez, M. (2018). Enfermedad de Parkinson; fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Rev. Univ. Ind Santander Salud.*, 50(1), 79-92. doi:10.18273.
- Marjama-Lyons, J., & N-Lieberman, A. (2004). *Medicamentos para la enfermedad de Parkinson*. Miami- Florida: Fundacion nacional de Parkinson. Obtenido de  
<http://www3.parkinson.org/site/DocServer/Medicamentos.pdf?docID=202>
- Marsili, L., Rizzo, G., & Colosimo, C. (2018). Diagnostic Criteria for Parkinson's Disease: From James Parkinson to the Concept of Prodromal Disease. *Frontiers in Neurology. Movement disorders*, 9(156), 1-10. doi:<https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00156>
- Martcorena, A., Alarcón, D., Abello, L., & Atala, C. (2010). Plantas trepadoras, epífitas y parásitas nativas de Chile. Guía de Campo. *Corporación Chilena de la Madera*, 1-291.
- Martínez, C. S., Basterrechea Rey, M., Fuentes Fiallo, V. R., & Torres Ferrer, M. (2007). Aislamiento de ácido ursólico de las hojas de *Cestrum laurifolium* L'Herit. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 38(1), 243-247. Obtenido de  
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=1816/181621661008>

- Martínez-Fernández, R., Gasca-Salas, C., Sánchez-Ferro, A., & Obeso, J. Á. (2016). Actualización de la enfermedad de Parkinson. *Revista médica Clínica Condes*, 363 - 379. doi:27(3) 363-379
- Martínez-Lazcano, J. C., Boll-Woehrlen, M. C., Hernández-Melesio, M. d., Rubio-Osornio, M., Sánchez-Mendoza, A., Ríos, C., & Pérez-Severiano, F. (2010). Radicales libres y estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas. *34*, 43-59. Obtenido de (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
- Martínez-Sámano, J., Torres-Durán, P. V., & Juárez-Oropeza, M. (2011). EL GLUTATION Y SU ASOCIACIÓN CON LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS, LA ESQUIZOFRENIA, EL ENVEJECIMIENTO Y LA ISQUEMIA CEREBRAL. *30*(2), 56-67. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/490/49019903003.pdf>
- Martinsa, D., Fachin-Espinar, M. T., De Oliveira, T. A., S-Lima, K. C., Cavalcant, R. M., Teles, B. R., & Nunez, C. V. (2014). Tamizaje fitoquímico y evaluación de las actividades biológicas de *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 158-171. Obtenido de [http://jppres.com/jppres/pdf/vol2/jppres14.036\\_2.6.158.pdf](http://jppres.com/jppres/pdf/vol2/jppres14.036_2.6.158.pdf)
- Matsuura, K., Kabuto, H., Makino, H., & Ogawa, N. (1997). Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion. *Journal of Neuroscience Methods*, 45-48. doi:10.1016/s0165-02070(96)02211-x
- Ministerio de sanidad, s. s. (2016). *Estrategia en enfermedades neurodegenerativas del sistema nacional de salud*. Madrid - España: Ministerio de sanidad, servicios sociales e igualdad. Obtenido de [https://www.sefac.org/sites/default/files/sefac2010/private/documentos\\_sefac/documentos/Estrategia\\_Neurodegenerativas\\_2016CIT.pdf](https://www.sefac.org/sites/default/files/sefac2010/private/documentos_sefac/documentos/Estrategia_Neurodegenerativas_2016CIT.pdf)
- MINSALUD. (12 de Diciembre de 2018). *Estadísticas de envejecimiento en Colombia*. Obtenido de <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/PS/sala-situacion-envejecimiento-2018.pdf>
- Modelación Aplicada a las Ciencias Animales: Diseño experimental, con implementación del programa R-project. (2013). En M. F. Cerón-Muñoz, L. F. Galeano-Vasco, & L. F. Restrepo-Betancur. Biogénesis.
- Mohamed, A., Galil, H., Raj Kapoor, B., Ali-Daw, M., Zamzam-Elmahdi, B., Abdussalam, S., & Senthil-Kumar, R. (2014). Role of Medicinal Plants in Neurodegenerative Diseases with Special Emphasis to Alzheimer's Disease. *International Journal of Phytopharmacology*, 454-462. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/275709809\\_Role\\_of\\_Medicinal\\_Plants\\_in\\_Neurodegenerative\\_Diseases\\_with\\_Special\\_Emphasis\\_to\\_Alzheimer's\\_Disease\\_by\\_Mohamed\\_Abdel\\_Galil\\_Hassan\\_Rajkapoor\\_Balashubramanian\\_Ali\\_Daw\\_Masoud\\_Zamzam\\_Elmahdi\\_Burkan\\_Abdussa](https://www.researchgate.net/publication/275709809_Role_of_Medicinal_Plants_in_Neurodegenerative_Diseases_with_Special_Emphasis_to_Alzheimer's_Disease_by_Mohamed_Abdel_Galil_Hassan_Rajkapoor_Balashubramanian_Ali_Daw_Masoud_Zamzam_Elmahdi_Burkan_Abdussa)

- Mol de Freitas, C., Busanello, A., Finger-Schaffer, L., Peroza, L.-R., Nunes-Krum, B., Queiroz-Leal, C. C.-C., . . . Roselei. (2014). Behavioral and neurochemical effects induced by reserpine in mice. *Psychopharmacology*, 1-11. doi:10.1007/s00213-015-4118-4
- Mondragón-Rezola, E., Arratibel-Echaren, I., Ruíz-Matínez, J., & Martí-Mazzó, J. F. (2010). Trastornos del sueño en la enfermedad del Parkinson: insomnio y fragmentación del sueño, hipersomnia diurna, alteración del ritmo circadiano y síndrome de apnea del sueño. *Revista de neurología. Servicio de Neurología, Hospital Donostia*, s21-s26.
- Nathan-Cobley, J., Fiorello, M.-L., & Miles-Bailey, D. (2018). 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biology*, 15, 490-503. doi:<https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.01.008>
- Núñez-Figueroa, Y., Tillán-Capó, J., Bueno-Pavón, V., Carrillo-Domínguez, C., Jiménez-Alemán, N. M., & Valdés-Martínez, O. (2009). Estandarización de un modelo de isquemia por oclusión de la arteria cerebral media en ratas. *Latin American Journal of Pharmacy*, 28(1), 47-54. Obtenido de <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/7724>
- Olaya, M., Vergel, N., López, J., Viña, M., & Guerrero, M. (2019). Coumarin analogue 3-methyl-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one as a possible antiparkinsonian agent. *Biomédica*, 39(3), 1-30. Obtenido de <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/4299/4139>
- Ospina-García, N., Pérez-Lohman, C., Vargas-Jaramillo, J. D., Cervantes-Arriaga, A., & Rodríguez-Violante, M. (2017). Ganglios Basales y Conducta. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 18(6), 74-86. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmexneu/rmn-2017/rmn176g.pdf>
- Ostrosky-Solis, F. (2000). Características neuropsicológicas de la enfermedad de Parkinson. *Revista de Neurología. Facultad de psicología. UNAM - Mexico.*, 788 - 796.
- Pando-Orellana, L. A., Cabrera-Muñoz, M. d., Díaz de Cintra, S., Valencia-Mayoral, P., & Chiquete, E. (2016). Modelos clásicos de inducción de parkinsonismo y su comparación con la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 17(3), 90-99. Obtenido de [http://revmexneuroci.com/wp-content/uploads/2016/05/RevMexNeuroci\\_2016\\_173.pdf](http://revmexneuroci.com/wp-content/uploads/2016/05/RevMexNeuroci_2016_173.pdf)
- Parkinson, E. P. (2000). Historia de la Enfermedad de Parkinson. . *Eps-Salud.Com.Ar.* , 4.
- Parra, N., Fernández, J., & Martínez, Ó. (2014). Consecuencias de la enfermedad de Parkinson en la calidad de vida. *Revista Chilena de Neuropsicología*, 9(1-2). Obtenido de <http://www.redalyc.org/comocitar.oa?id=179333051008>
- Pedro, J. C.-C. (2006). Levodopa en la enfermedad de Parkinson. ¿Qué hemos aprendido? *Rev Méd Chile*, 134, 893-901.

- Perez, R. G., Waymire, J. C., Lin, E., Liu, J. J., Guo, F., & Zigmond, M. J. (2002). *The Journal of Neuroscience*, 22(8), 3090–3099. doi:0270-6474/02/223090-10\$15.00/0
- Pérez-Estudillo, C. A., Sánchez-Alonso, D., López-Meraza, M. L., Morgado-Valle, C., B.-P. L., Coria-Avila, G.-A., . . . Manzo-Denes, J. (2018). Aplicaciones terapéuticas para la lesión de médula espinal. *Neurología revista electrónica*, 9, 1-11. Obtenido de <https://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2018/21/Perez/HTML.html#>
- Perier, C., & Villa, M. (2012). Park DS. Programed cell death in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(2), 1-19. doi:10.1101 / cshperspect.a009332
- Perier, C., Bove, J., Wu, D.-C., Dehay, B., Choi, D.-K., Jackson-Lewis, V., . . . Vila, M. (2007). Two molecular pathways initiate mitochondria-dependent dopaminergic neurodegeneration in experimental Parkinson's disease. *PNAS*, 104(17), 8161–8166. doi:<https://doi.org/10.1073/PNAS.CM10313>
- Philippens, I. H. (2008). Non-human primate models for Parkinson's disease. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 5(2), 1-7. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2008.06.004>
- Pickrell, A. M., & Youle, R. J. (2014). The Roles of PINK1, Parkin and Mitochondrial Fidelity in Parkinson's Disease. *Neuron*, 85(2), 257-273. doi:10.1016/j.neuron.2014.12.007
- Pineda-Trujillo, Nicolas, Dulcey-Cepeda, A., Arias-Pérez, W., Moreno-Masmela, S., Saldarriaga-Henao, A., . . . Ruiz-Linares, A. (2009). Una mutación del gen PARK2 causa enfermedad de Parkinson juvenil en una extensa familia colombiana. *Latreia*, 22(2), 122-131. Obtenido de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-07932009000200003&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932009000200003&lng=en&tlng=es).
- Quintero-Falla, J. A. (2014). EVALUACIÓN DEL DETERIORO COGNITIVO EN UN MODELO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON EN RATA WISTAR. Ibagué, Colombia. Obtenido de <https://core.ac.uk/download/pdf/51068107.pdf>
- Riederer, P., & Gerd, L. (2011). MAO-inhibitors in Parkinson's Disease. *Exp Neurobiol.*, 20(1), 1-17. doi: 10.5607/en.2011.20.1.1
- Rios, M. Y. (2015). Química y farmacología de Iridoides. Capítulo 4. En G. Delgado, & A. Romo de Vivar (Edits.), *Temas selectos de Química de productos naturales* (1 ed., págs. 2-40). Mexico : Universidad Nacional Autonoma de México. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/305437256\\_Quimica\\_y\\_Farmacologia\\_de\\_Iridoides](https://www.researchgate.net/publication/305437256_Quimica_y_Farmacologia_de_Iridoides)
- Ritter, J. M., Flower, R. J., Henderson, G., Kong Loke, Y., MacEwan, D., & Rang, H. P. (2012). Rang y Dale Farmacología. ELSEVIER. Obtenido de <https://books.google.com.co/books?id=78nSDwAAQBAJ&pg=PA216&lpg=PA216&dq=como+destruye+la+reserpina+las+vesiculas&source=bl&ots=xzC5EhHix&sig=ACfU3U39eNI N9hlmAcbdKlsb0Zya5vPBxQ&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwj9z4-PprzoAhUrh-AKHVwbCE0Q6AEwBHoECAoQAQ#v=onepage&q>

- Rodriguez Villarreal, I., Ortega Ruano, R., Fernandez Bolaños, R., Amenabar, J., Gonzalez, J., Onaindia, J., & Solozabal, C. (1984). Intoxicación por levodopa-carbidopa tratada con hemoperfusión. *4(1)*, 1-83. Obtenido de [revistanefrologia.com/es-intoxicacion-por-levodopa-carbidopa-tratada-con-articulo-X0211699584036718](http://revistanefrologia.com/es-intoxicacion-por-levodopa-carbidopa-tratada-con-articulo-X0211699584036718)
- Rodríguez, N., Pérez, J., Iglesias, J., Gallego, R., & Veiga, B. (2015). Actualidad de las plantas medicinales en terapéutica. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, *4(1)*, 42-52.
- Ruan, J., & Yao, Y. (2020). Behavioral tests in rodent models of stroke, Brain Hemorrhages. *Brain Hemorrhages, Chinese Roots global impact*, *1(4)*, 171-184. doi:<https://doi.org/10.1016/j.hest.2020.09.001>.
- Rumiko, K., Yasuko, M., Hiroyuki, K., & Tsutomu, A. (2004). Biochemical, behavioral and immunohistochemical alterations in MPTP-treated mouse model of Parkinson's disease. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *78*, 143–153. Obtenido de [www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh](http://www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh)
- Salamanca - Gomez, F. (2004). Los genes y la enfermedad de parkinson . *Gaceta médica de Mexico*, 1-3.
- Sandoval-Avila, S., Diaz, N., Gómez-Pinedo, U., Canales-Aguirre, A., Gutierrez-Mercado, Y., Padilla-Camberos, E., . . . Díaz-Martínez, N. (2016). Efecto protector de fitoquímicos en cultivos de neuronas dopaminérgicas. *Neurología*, 114-124. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2016.04.018>
- Schmarck, K., Bosc, M., Ott, T., Sturgill, J., & Kepecs, A. (2021). Striatal dopamine mediates hallucination-like perception in mice. *372(6537)*. doi:<https://doi.org/10.1126/science.abf4740>
- Segura- Aguilar, J., Paris, I., Muñoz, P., Ferrari, E., Zecca, L., & Zucca, F. (2014). Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. *International Society for Neurochemistry, J. Neurochem*, *129*, 898–915. doi:doi: 10.1111/jnc.12686
- Shiotsuki, H., Yoshimi, K., Shimo, Y., Funuyama, M., Takamatsu, Y., Ikeda, K., . . . Hattori, N. (2010). A rotarod test for evauation of motor skill learning. *189(2)*, 180-197. doi:10.1016/j.jneumeth.2010.03.026
- Simeonovska-Nikolova, & Marinova., D. (2000). Strategies in open field behaviour of *Mus spicilegus* and *Mus musculus musculus*. *J. Zool(130)*, 115-120. Obtenido de <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.620.6651&rep=rep1&type=pdf>
- Singh, A., & Kulkarni, S. (2002). Netecapone and selegiline as effective adjuncts to L-Dopa in reserpine -induced catatonia in mice. *Methods find exp clin pharmacol*, *24(1)*. doi:10.1358/mf.2002.24.1.677124

- Skalisz, L. L., Bejjamini, V., Joca, S. L., Vital, M. A., Da-Cunha, C., & Andreatini, R. (2002). Evaluation of the face validity of reserpine administration as an animal model of depression– Parkinson’s disease association. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 26, 879– 883. doi:[https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(01\)00333-5](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(01)00333-5)
- Taborda-Martínez, M. E. (2009). Estudio fitoquímico preliminar y actividad antimalárica del extracto etanólico total de *coccocypselum hirsutum* (Rubiaceae). *Universidad de magdalena*, 118-123. Obtenido de file:///C:/Users/Vet/Downloads/Dialnet-EstudioFitoquimicoPreliminarYActividadAntimalarica-5568058.pdf
- Tadaiesky, M. T., Andreatini, R., & Vital, M. A. (2006). Different effects of 7-nitroindazole in reserpine-induced hypolocomotion in two strains of mice. *European Journal of Pharmacology*, 199-207. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.02.004
- Teran-Aguilar, J. J. (01 de mayo de 2006). DIVERSIDAD DE LA FAMILIA RUBIACEAE EN EL PARQUE. Cochabamba, Cochabamba, Bolivia. Obtenido de <http://www.monografias.com/trabajos-pdf/diversidad-familia-rubiaceae/diversidad-familia-rubiaceae.pdf>
- Tong, J., Rathitharan, G. M., H, F., Y, A., L.-C, B., & I, K. S. (2017). Brain monoamine oxidase B and A in human parkinsonian dopamine deficiency disorders. . *Brain, a journal of neurology*, 140(9), 2460-2474. doi:10.1093/brain/awx172
- Vargas-Miranda, B., Ambriz-García, D., Navarro-Maldonada, M. d., Trejo-Córdova, A., Rodríguez-Esquivel, G., & González-Vieira, M. d. (2018). Manejo de animales de Bioterio de la UAM-I.
- Velázquez-Pérez, J., & Marsal-Alonso, C. (2009). Trastornos del movimiento inducidos por fármacos. *Revista de Neurología*, 4. doi: <https://doi.org/10.33588/rn.48S01.2009039>
- Vidrio-Morgado, H., Alonso-Vilatela, M., & López-López, M. (2007). Factores genéticos involucrados en la susceptibilidad para desarrollar enfermedad de Parkinson. *Salud Mental*, 30(1), 16-24. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=58230103> .
- Willar, A., Bouchard, S., & Gitis, A. (2015). Differential Degradation of Motor Deficits During Graded Dopamine Depletion with 6-Hydroxydopamine in Mice. *Neuroscience*(301), 254-267. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.05.068
- Zahoor, I., Shafi, A., & Haq, E. (2018). *Parkinson’s Disease. Pathogenesis and Clinical Aspects*. (C.- G. J. B-Stoker. Thomas., Ed.) Brisbane, Australia: Codon Publications. doi:<http://dx/doi.org/10.15586/codonpublications.parkinsonsdisease.2018>
- Zambrano-Intriago, L. F., Buenaño-Allauca, M. P., Mancera-Rodríguez, N. J., & Jiménez-Romero, E. (2015). Ethnobotanical study of medicinal plants used by rural inhabitants of the parish San Carlos Quevedo in Ecuador. *Univ. Salud [online]*, 17(1), 97-111. Obtenido de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0124-71072015000100009&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-71072015000100009&lng=en).

Zheng, G., Dwoskin, L. P., & Crooks, P. A. (2006). Vesicular Monoamine Transporter 2: Role as a Novel Target for Drug Development. *The AAPS Journal*, 8(4), 682-693. Obtenido de [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2751365/pdf/12248\\_2008\\_Article\\_84682.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2751365/pdf/12248_2008_Article_84682.pdf)