



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE NEUROGLOBINA EN ÁREAS CEREBRALES UTILIZANDO UN MODELO MURINO PARA LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

DIANA CAROLINA RAMOS BERUMEN

ASESORES DE TESIS:

DRA. EN C. PATRICIA VIEYRA REYES

DR. FERNANDO MÉNDEZ SÁNCHEZ

ESTADO DE MÉXICO, DICIEMBRE DE 2018



**EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE NEUROGLOBINA EN
ÁREAS CEREBRALES UTILIZANDO UN MODELO MURINO PARA
LA ENFERMEDAD DE PARKINSON**

DEDICATORIA

Dedico este trabajo

A mis padres, por haberme dado todo en la vida y enseñarme que día a día hay que esforzarnos para cumplir los sueños y que estos se cumplen; sin todas sus enseñanzas no sería la persona que soy y jamás podré compensar todo el sacrificio que han hecho por mí. Gracias por su comprensión, amor, cariño, confianza, consejos; pero sobre todo por guiarme por el amplio y difícil camino de la vida.

A mis hermanos por estar siempre cuando los necesitaba, por apoyarme en todo momento, y estar en los más difíciles y convertirlos en momentos de felicidad, he aprendido tanto de ustedes, sin duda con su cariño y ánimo me ayudaron a terminar este trabajo.

A David Salgado Rinquey por todo el amor y apoyo que me brinda siempre para cumplir mis metas, por hacerme confiar en mí cuando más lo necesitaba, eres quien me ayuda a seguir en el camino y me impulsa a ser mejor cada día, te llevo en mi corazón hoy y siempre.

A mis amigos por haber hecho de la carrera un camino más agradable, por los buenos y malos momentos que vivimos juntos y el apoyo que me han brindado.

A mis profesores por haberme dado todo su conocimiento y ayuda para poder formarme como profesionalista.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Patricia Vieyra Reyes por invitarme a ser parte de su equipo de trabajo y darme todo su apoyo para la realización de este proyecto; no solo tuve un crecimiento profesional en el laboratorio, sino también personal

A la M. en C.Q. María Guadalupe Enríquez Mejía por haber sido la mejor compañera de trabajo y enseñarme todos los días cosas nuevas en el laboratorio

Al Dr. José Fernando Méndez Sánchez por haberme guiado durante el desarrollo de esta tesis y por todos los conocimientos que me aportó para tener mejores resultados en este trabajo

A la Dra. Carla García Morales por apoyarme en la revisión de este trabajo, todos sus consejos sin duda me sirvieron para ejecutarlo de mejor manera

A la UAEMéx por dejarme formar parte de esta casa de estudios

Índice

Abreviaturas	6
Resumen	7
1. Marco Teórico.....	8
1.1 Neuroglobina	8
1.2 Estructura y cinética de neuroglobina	8
1.3 Genética de neuroglobina	9
1.4 Funciones de la neuroglobina	10
1.5 Distribución Neuroanatómica de neuroglobina	14
1.6 Parkinson	15
1.7 Áreas neuroanatómicas afectadas	17
3. Planteamiento del problema.....	26
4. Justificación	27
5. Hipótesis.....	28
6. Objetivos	28
6.1 Objetivo General	28
6.2 Objetivo Específico	28
7. Metodología	29
7.1 Implicaciones éticas	29
7.2 Modelo murino	29
7.2.1 Modelo murino de la enfermedad de Parkinson.....	30
7.3 Obtención de muestras	30
7.4 Inmunohistoquímica para NGB	31
7.5 Cuantificación de NGB	34
8. Resultados	35
Comprobación de modelo murino de la Enfermedad de Parkinson	35
Distribución de NGB en áreas neuroanatómicas	35
Corteza prefrontal	36
Cuerpo estriado	37
Sustancia <i>nigra</i>	38
Cuantificación de NGB	39
9. Discusión.....	41

10. Conclusión	44
11. Perspectivas	44
12. Bibliografía	45
Anexo I.....	50

Abreviaturas

NGB:	Neuroglobina
CGB:	Citoglobina
HB:	Hemoglobina
MB:	Mioglobina
SNC:	Sistema Nervioso Central
EP:	Enfermedad de Parkinson
SN:	Sustancia Negra (latín: <i>Nigra</i>)
Cyt c:	Citocromo c
LDH:	Lactato Deshidrogenasa
DA:	Neuronas dopaminérgicas
VTA:	Área tegmental ventral
WMH:	Sustancia blanca
PPN:	Núcleo pedunculopontino
CnF:	Cuneiforme
STN:	Núcleo subtalámico
DTI:	Imágenes de tensor de difusión
αSyn:	α -sinucleína

Resumen

La Neuroglobina (NGB) es una proteína que tuvo un reciente descubrimiento, a la cual se le han atribuido funciones antiapoptóticas y antioxidantes. Aunado a esto, se ha visto que un exceso de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno y apoptosis son procesos relacionados en el desencadenamiento de enfermedades neurodegenerativas, sin embargo, se desconoce la presencia de esta proteína en estas patologías.

Específicamente en la enfermedad de Parkinson, no hay estudios que muestre un patrón de la presencia de esta proteína cuando está presente la enfermedad, siendo importante por ser el principal trastorno de movimiento, afectando a millones de personas a nivel mundial. Por tanto, en el presente trabajo se investigó la presencia de la Neuroglobina en un modelo murino de la enfermedad de Parkinson.

Los experimentos mostraron que hay una tendencia de mayor presencia de NGB cuando está presente la enfermedad de Parkinson en un modelo murino agudo. En este estudio se describe el primer patrón de presencia de NGB en la enfermedad de Parkinson.

1. Marco Teórico

1.1 Neuroglobina

La Neuroglobina (NGB) es una globina con capacidad de unión al oxígeno cuya presencia en tejidos nerviosos fue demostrada en el año 2000 por Burmester *et al* (1); quien la identificó a través de homologías de secuencias genómicas (1). Se encontró al mismo tiempo que la citoglobina (CGB) en humanos, y más tarde en otras especies animales, lo que sugiere una amplia distribución entre los vertebrados. El análisis filogenético indica que NGB puede tener un origen evolutivo común a las globinas de invertebrados (2).

Desde su descubrimiento, se ha demostrado que la NGB tiene una función esencial y conservada en los vertebrados con el consiguiente papel neuroprotector. NGB es un miembro de la superfamilia de las globinas y se expresa predominantemente en neuronas del sistema nervioso central y periférico (3).

1.2 Estructura y cinética de neuroglobina

La neuroglobina (NGB), es una hemoproteína con un peso molecular de 17 kDa (4) conformada por 150 a 160 residuos de aminoácidos (5). Es una globina monomérica estructuralmente similar a la mioglobina y a las cadenas α y β de la hemoglobina (Véase Figura 1); sin embargo, su átomo de hierro se encuentra hexacoordinado por lo que la unión del ligando al centro del metal requiere de la disociación del enlace distal His (E7) 64-Fe (6).

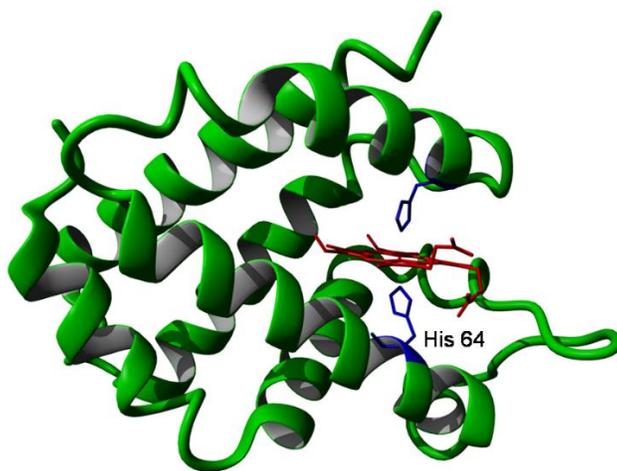


Figura 1. Estructura cristalina de la Neuroglobina humana mostrando el grupo hemo (rojo) y las cadenas laterales de histidina unidas al hierro (azul). Se indica la histidina 64 parcialmente disociada. Imagen retomada de Brittain (7).

Las caracterizaciones bioquímicas y biofísicas de NGB han sido estudiadas por varios autores (8) (9) (10) , desde su descubrimiento. NGB tiene algunas similitudes con hemoglobina (HB) y mioglobina (MB) que incluyen el efecto ácido y alcalino de Bohr en la afinidad por el oxígeno, medida por el valor de p_{50} , es decir, la presión parcial de oxígeno requerida para saturar el 50% de los sitios de unión de proteínas, es similar a la de MB (11).

NGB presenta una elevada estabilidad y su temperatura de fusión es de 100°C (12). Otra característica peculiar de NGB es la velocidad de autooxidación, ya que a temperatura ambiente y en presencia de oxígeno, a diferencia de las otras globinas, el equilibrio de NGB cambia al estado férrico (10).

1.3 Genética de neuroglobina

Actualmente hay un número limitado de secuencias completas en bases de datos para NGB de diferentes especies, entre ellas humano, ratones, peces y rata (13). NGB es una proteína particularmente conservada; en ratones y humanos difiere sólo en 6% de las posiciones de aminoácidos (13). La comparación de NGB humana

con MB o HB de vertebrados muestra menos de un 25% de identidad de secuencia (1). En promedio, las tasas de sustitución de aminoácidos son tres a cuatro veces inferiores a las de la hemoglobina y mioglobina de vertebrados (14) (8).

Además, se ha encontrado que la estructura de NGB coincide con la estructura normal tridimensional de las globinas, ya que mide entre 150 y 160 aminoácidos, y es muy raro encontrar alteraciones en la secuencia. Los grupos hemo y los extremos de unión a ligando, histidinas proximal y distal PheB10, PheCD1, TyrCD3, ValE11, LeuF4, ValFG1, ValFG3, y PheG5 se encuentran invariablemente (8). Setenta aminoácidos están estrictamente conservados entre las NGBs conocidas que corresponde al 46,4% de las posiciones. La NGB ha resistido los cambios producidos por evolución (15).

NGB tiene 5 exones y 4 intrones. Las regiones codificantes de los genes NGB de mamíferos y peces llevan tres intrones colocados en B12.2 (es decir, entre las posiciones 2 y 3 del codón del 12º aminoácido del alpha - hélice B), E11.0 y G7.0 (16). NGB comparte sólo el 25% de la secuencia de aminoácidos con las hemoglobinas y mioglobinas de los invertebrados pero se asemeja a algunas globinas específicas del sistema nervioso de los vertebrados, lo que sugiere que NGB deriva de una rama arcaica de las globinas de metazoarios (15).

1.4 Funciones de la neuroglobina

Mientras que NGB comparte una afinidad intrínseca por gases diatómicos de bajo peso molecular de manera similar a otras globinas, el nivel relativamente bajo de expresión de NGB en las neuronas cerebrales limita su potencial para funcionar como un depósito de oxígeno, especialmente durante períodos de isquemia aguda (17). Se han realizado estudios *in vitro* que han sugerido el papel neuroprotector de NGB debido a su capacidad de captar especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS). Sin embargo, otros estudios han propuesto que NGB es parte de una cadena de señalización que transmite el estado redox de la célula que protege contra el estrés oxidativo o que inhibe la apoptosis (17).

Varios estudios están intentando identificar cómo NGB actuaría como un detoxificador de los radicales libres producidos en reacciones redox, como Wakasugi *et al.* (18), Herold *et al.* (19), Burmester *et al.* (3). Se sabe que la NGB puede reaccionar con especies reactivas de oxígeno (ROS) como peróxido de hidrógeno, superóxido; y especies reactivas de nitrógeno (RNS), principalmente con peróxido de nitrito de manera similar a la HB (5). Sin embargo, debido a su hexacoordinación, el hierro en NGB está protegido contra cambios electrónicos y consecuentemente, a diferencia de HB, NGB no entra en el estado de ferryl (Fe^{4+}) (5). De acuerdo a esto, el mecanismo por el cual se ha observado el papel antioxidante que desempeña NGB, es por una disminución de la formación de radicales libres en su presencia (5).

NGB es una molécula con propiedades antioxidantes, ya que tiene muy poca afinidad por el oxígeno y las especies oxigenadas son inestables, por lo tanto, no proporciona una fuente estable de oxígeno (20). De hecho, se reconoce que uno de los papeles de NGB es básicamente su afinidad por Óxido Nítrico (NO)(20, 21) y esta acción puede estar relacionada con la unión de este ligando gaseoso (21). Además, se ha demostrado que NGB actúa como un eliminador de ROS y RNS en diferentes modelos animales (4, 22), aunque su actividad antioxidante es menor que la de N-acetilcisteína, glutatión y vitamina C (23). En células, la hipoxia no sólo denota un bajo nivel de oxígeno sino también presencia de ROS y RNS. El papel protector de NGB durante la hipoxia / isquemia puede por lo tanto relacionarse con la neutralización de tales especies oxidantes reactivas que son la causa principal del daño celular (23).

El conocido óxido nítrico (NO) es un mensajero celular cerebral producido por la isoforma neuronal de óxido nítrico sintasa (23). Después de un periodo de hipoxia, el nivel de NO aumenta de rango nanomolar a micromolar, debido a la afluencia de Ca^{2+} (20). Otras especies reactivas oxidantes incluyendo superóxido también se vuelven más abundantes durante la hipoxia (20). Un importante destino del NO producido durante la hipoxia es su reacción con el superóxido, formando peroxinitrito ($ONOO^-$), cuyo papel en el daño celular ha sido reconocido, causando

daño en ADN y proteínas (22). Se ha demostrado que en la forma $Fe^{2+} + 7NO$, NGB reacciona más rápidamente con peroxinitrito que la HB (24). Esta propiedad puede proteger a las neuronas y contribuir a su supervivencia después de episodios de hipoxia. Además, a diferencia de HB y MB, la reacción de metaneuroglobina (Fe^{3+}) con peroxinitrito o peróxido de hidrógeno no parece generar especies citotóxicas de ferryl (Fe^{4+}), otra característica que puede contribuir a la supervivencia celular (21). NGB tiene también interacciones con muchas proteínas relacionadas con los antioxidantes como Cyt c (Transportador electrónico mitocondrial), entre otros(24).

Los mamíferos acuáticos como ballenas y focas (25) resisten condiciones de hipoxia severa sin daño y son modelos únicos para investigar mecanismos neuroprotectores. La comparación de la secuencia de la proteína NGB entre los mamíferos terrestres y acuáticos reveló diferencias menores en su secuencia, sólo dos o tres aminoácidos, lo que no confiere diferencias funcionales entre ambos grupos (25). Sin embargo, los niveles de expresión de ARNm de NGB fueron 4-15 veces más altos en el cerebro de focas y ballenas que en los de mamíferos terrestres, lo que sugiere que niveles más altos de NGB en mamíferos acuáticos pueden ser un mecanismo neuroprotector contra la hipoxia cerebral y la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno)(25). De manera similar, en un estudio de comportamiento en ratones transgénicos que sobre expresan NGB bajo normoxia e hipoxia, se demostró que NGB promueve la supervivencia *in vivo* y puede desempeñar un papel importante para contrarrestar los efectos adversos de un accidente cerebrovascular isquémico-hipóxico(26).

Al principio, se sugirió que NGB tenía un papel similar al de MB, en neuronas. En este caso actuaría como un reservorio de oxígeno liberándolo y manteniendo la concentración de oxígeno en la cadena de transferencia de electrones en situaciones estresantes como la hipoxia (11). Dado que el valor de p_{50} (presión parcial a la que están oxigenados el 50% de los sitios) medido para NGB es similar al de MB, esta hipótesis parecía plausible, sin embargo, la baja concentración de la proteína en el cerebro ($\sim 1 \mu M$) junto con la alta tasa de autoxidación descartó esta idea (14). Estudios sobre la autoxidación de NGB han demostrado que la afinidad

del oxígeno es mucho menor que la encontrada para MB (11). Los estudios en humanos han correlacionado los polimorfismos genéticos del NGB con la susceptibilidad a la neurodegeneración. Uno de estos estudios demostró que la disminución de la expresión de NGB en los ancianos se asocia con un mayor riesgo de padecer Enfermedad de Alzheimer (AD) (23). En otro estudio preclínico usando ratones transgénicos, se encontró que la inyección intracerebroventricular de NGB disminuyó la formación de péptidos A β , disfunción mitocondrial, apoptosis y muerte neuronal (27). Además, otros ensayos sugirieron que los efectos neuroprotectores de NGB implicaban la inhibición de la caspasa-3 y 9, la activación de la vía PI3K / Akt (23) y la eliminación de agregados de proteínas (27). Algunas funciones antiapoptóticas han sido atribuidas a NGB, ya que se ha observado que actúa sobre mecanismos mitocondriales relacionados con la formación del apoptosoma (3). El proceso de apoptosis es complejo. Algunos estudios utilizaron modelos computacionales para determinar el mecanismo de NGB en la muerte celular (28). Por ejemplo, los datos obtenidos mediante el modelado computacional sugieren que la NGB reduce la formación del apoptosoma mediante una reacción redox con el Cyt c, causando el bloqueo de la activación del iniciador pro-caspasa 9 y bloqueando así significativamente el desencadenamiento de la apoptosis (29). En el mismo estudio (28), los autores simularon la interacción entre NGB y Cyt c y validaron sus resultados utilizando un estudio *in vitro*. También encontraron una reacción muy rápida entre la neuroglobina reducida (ferrosa) y el citocromo (férrico) oxidado (23) lo que sugiere que la NGB podría afectar la iniciación de la apoptosis al interactuar con el Cyt c (23). Por lo tanto, NGB puede ser considerada como un objetivo potencial para disminuir daño neuronal, y su expresión mejorada después de una lesión cerebral probablemente refleja mecanismos endógenos de neuroprotección (23).

La NGB está regulada positivamente por compuestos farmacológicos, tales como moléculas estrogénicas y androgénicas, como la testosterona (30). La sobreexpresión de NGB por terapia génica o su inducción farmacológica puede representar un enfoque terapéutico potencial para el tratamiento de lesión cerebral traumática o patologías neurodegenerativas (23).

1.5 Distribución Neuroanatómica de neuroglobina

NGB se expresa principalmente en condiciones hipóxicas por isquemia en el sistema nervioso central y periférico (24). Sin embargo, la concentración molecular varía dependiendo del tejido. En las células retinianas, donde existe una alta demanda de oxígeno, las concentraciones de NGB pueden ser hasta 100 veces superiores que en las neuronas (31).

En el SNC (Sistema Nervioso Central), NGB se expresa predominantemente en neuronas (16). Aunque la gran mayoría de las pruebas hasta la fecha sugieren una amplia expresión de mRNA y la proteína en neuronas de diferentes regiones cerebrales, la expresión parece ser sustancialmente diferente a nivel regional y celular (31). La NGB en humanos, está altamente expresada en hipotálamo, particularmente en el área hipotalámica anterior y lateral (región mamilar), núcleo paraventricular y núcleo arcuato; en núcleo hipotalámico dorsomedial y área preóptica; núcleo tegmental laterodorsal y pontino y en núcleo amígdaloide medial basomedial y posterodorsal anterior (32).

En cerebro total, la NGB se ha encontrado en diferentes regiones incluyendo corteza, tálamo, cerebelo, hipocampo e hipotálamo (33). Estas áreas son importantes en el procesamiento de las sensaciones, la memoria y el aprendizaje, y son a menudo afectadas en choque hipóxico e isquémico, o lesiones traumáticas (23).

NGB no sólo se expresa en el sistema nervioso sino también en retina, intestino y ovario; sin embargo, no se ha detectado ninguna expresión en hígado, riñón, corazón o músculo esquelético (23).

También se ha encontrado expresión de NGB en cultivo de astrocitos cerebrales (34) y astrocitos reactivos inducidos por lesión cerebral traumática, malaria y encefalitis autoinmune experimental (34, 35). En estos trastornos del SNC se han encontrado astrocitos NGB positivos en regiones dañadas y cicatriz astrogial (34). Sub-celularmente, NGB se expresa principalmente en citoplasma de astrocitos; sin embargo, la NGB no se detecta en astrocitos post-accidente cerebrovascular (36).

NGB también está presente en líquido cefalorraquídeo de pacientes que sufren dolor crónico regional o sistémico (35) y células tumorales de glioblastoma (37). Aunado a la expresión y gran importancia que se le ha atribuido a la NGB en el SNC, se ha visto la vital importancia de indagar en cuanto a su expresión y funciones en los trastornos cerebrales o bien enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), entre otras (23).

A continuación, se muestran mapas de cortes coronales de cerebro de rata en los que se presentan las principales áreas neuroanatómicas que expresan NGB (33) (38) (Figura 2):

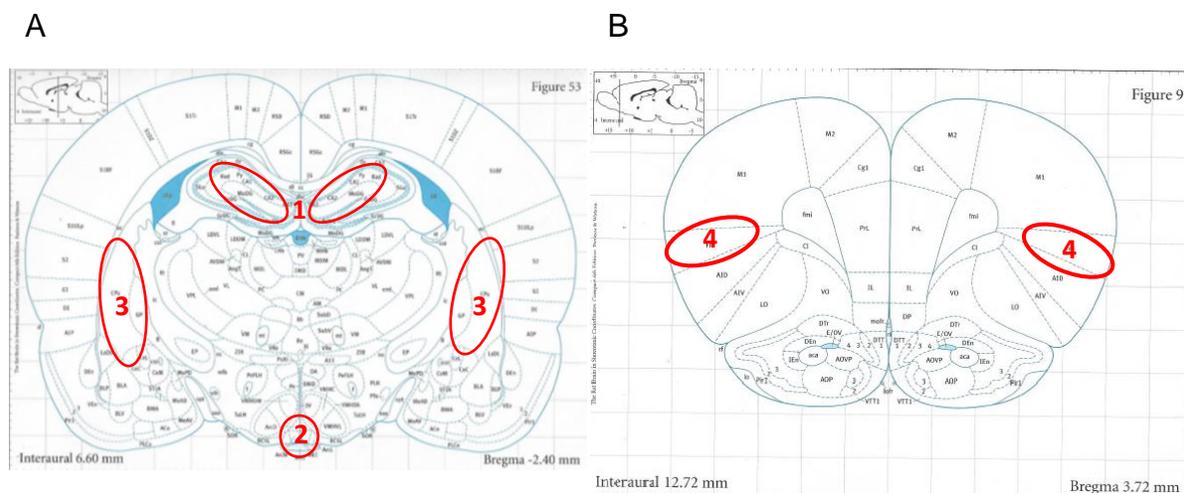


Figura 2. Mapas de corte coronal en cerebro de rata (Bregma: A)-2.40 mm; B) 3.72 mm). Se pueden identificar las zonas cerebrales donde se encuentra NGB, señaladas en rojo: A) Hipocampo (1), Hipotálamo (2), Cuerpo estriado (3) y B) Corteza prefrontal (4). Figura tomada y modificada de Paxinos (38).

1.6 Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes y afecta a alrededor del 1% de la población mayor de 60 años (39). La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo crónico caracterizado por alteraciones motrices que incluyen movimientos voluntarios lentos, temblores en reposo, rigidez muscular y deterioro de la marcha y equilibrio (40).

Este trastorno neurodegenerativo progresivo es causado principalmente por la pérdida de células dopaminérgicas en la sustancia *nigra* (SN) (41). Sin embargo, se ha aceptado ampliamente que las etapas tempranas de esta patología se relacionan con problemas del tronco encefálico, seguido más tarde por una deposición de α -sinucleína a través de la corteza cerebral (42, 43).

La alfa sinucleína es una proteína presináptica que puede ubicarse de manera soluble en el citosol o unida a membranas (44). Se ha vinculado con plasticidad sináptica y transporte vesicular intraneuronal, así como con la liberación y recaptación de dopamina (neurotransmisor catecolaminérgico que participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, emotividad y afectividad (44). Mutaciones en alfa sinucleína causadas por estrés oxidativo, agregados de nitritos, presencia de metales pesados y diversos tóxicos aumentan su concentración intracelular y consecuentemente empieza a agregarse en forma fibrilar en el soma de neuronas vulnerables, formando inclusiones denominadas cuerpos de Lewy (45) (46). Los cuerpos de Lewy conllevan a la disfunción neuronal presente en la EP, favoreciendo el aumento en la vulnerabilidad al estrés oxidativo y en último término a la aparición de apoptosis (47). En etapas más avanzadas, la EP prosigue con la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta* del mesencéfalo ventral(48, 49). La neurodegeneración que se acompaña de la pérdida de neuronas pigmentarias de neuromelanina que conduce a la despigmentación del área (50, 51). La pérdida de neuronas dopaminérgicas nigrales, por consiguiente, da lugar a la depleción de dopamina en el estriado y genera una amplia gama de disfunciones motoras (52). La EP también se asocia con síntomas no motores y no dopaminérgicos que se extienden más allá de la ruta dopaminérgica nigroestriatal y a menudo ocurren años o incluso décadas antes del diagnóstico clínico (52).

Según un estudio realizado por Kleinknecht *et al.*(53) la NGB humana mostró un efecto protector contra la formación de agregados de alfa sinucleína en levaduras y en células de mamíferos (53). La expresión de NGB redujo el número de células con agregados casi dos veces en comparación con el control, así como el número

de agregados por célula (53). Kleinknecht *et al.*(54) realizaron mediciones de lactato deshidrogenasa (LDH) para determinar si existe un efecto de neuroglobina sobre la toxicidad celular, ya que la liberación de LDH en el medio de cultivo celular es un indicador de daños de la membrana plasmática y se utiliza como marcador de citotoxicidad (53). Las mediciones de LDH fueron similares para todas las células del ensayo y apoyan que NGB actúa como supresor de la agregación de alfa-sinucleína sin causar citotoxicidad significativa (53).

1.7 Áreas neuroanatómicas afectadas

Como se mencionó anteriormente, la EP es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida de neuronas dopaminérgicas (DA) en las vías nigroestriatal y mesolímbica, incluyendo el área tegmental ventral (VTA).

En un estudio realizado por Apostolova *et al.*(54), se analizaron estructuras cerebrales en individuos normales e individuos con EP, y utilizando cartografía de distancia radial, estudiaron las diferencias estructurales y volumétricas 3D entre los hipocampos, caudados y ventrículos laterales, encontrando que no existen diferencias hipocampales y el deterioro cognitivo de la EP se asocia con la atrofia caudada anterior y la ampliación ventricular (54). La hipertrofia ventricular, la atrofia del hipocampo y la hiperintensidad de la sustancia blanca (25) se observan comúnmente en EP y se han asociado con el deterioro cognitivo (55). Además, según un estudio realizado por Breen *et al.*(44), el volumen del hipotálamo se reduce en individuos con EP en comparación con individuos control, encontrando también que los niveles de melatonina se asocian significativamente con el volumen relativo de materia gris hipotalámica en el grupo EP.

Varios estudios han demostrado que las neuronas colinérgicas del núcleo pedunculopontino (PPN) degeneran en la EP(56) (57) (58) (59). Los núcleos pedunculopontino (PPN), subcuneiforme y cuneiforme (CnF) comprenden la región locomotora mesencefálica (MLR) (57). Esta es una región funcional desde la cual la estimulación eléctrica induce locomoción coordinada en mamíferos descerebrados.

El PPN proyecta y recibe proyecciones del núcleo subtalámico (STN), globo pálido interno y sustancia *nigra pars reticulata* y *compacta* (57). Además, tiene conexiones aferentes y eferentes con cerebelo, tálamo, corteza cerebral y médula espinal (57). Las evidencias crecientes sugieren que el PPN es crucial en el desarrollo de trastornos de la marcha y el equilibrio: la manipulación experimental del PPN en mamíferos pone de manifiesto su participación en la postura y locomoción (58). Nutt *et al.*(58) demostraron recientemente que la lesión de las neuronas colinérgicas en PPN en monos fue suficiente para inducir trastornos de la marcha y del equilibrio.

Nagae *et al.* (60) investigaron cambios microestructurales dentro de los ganglios basales en pacientes con EP utilizando imágenes de tensor de difusión “DTI”(método para caracterizar cambios o diferencias microestructurales en neuropatologías). Se puede utilizar una imagen de tensor de difusión para mapear y caracterizar la difusión tridimensional del agua como una función de la localización espacial (60). El tensor de difusión describe la magnitud, grado y orientación de anisotropía (propiedad del tejido cerebral normal que depende de la direccionalidad de las moléculas del agua y de la integridad de las fibras de sustancia blanca, permite obtener imágenes de los tractos y fibras nerviosas ayudando a crear mapas de conectividad) (61), las cuales se habían reducido dentro de la *sustancia nigra* y aumentado en la difusividad media y radial dentro de la *sustancia nigra* y *globus pallidus* en comparación con controles (60).

De acuerdo a lo anterior, a continuación (Figura 3), se muestran las áreas cerebrales principalmente afectadas en EP (38, 60):

motores hacen sinapsis en la matriz homogénea del putamen. Dentro del bucle motor, la disposición somatotopica de la corteza se preserva a lo largo del circuito. Estos bucles diferentes parecen controlar movimientos a varios niveles de complejidad, así como en diferentes áreas anatómicas (62).

Los neurotransmisores primarios dentro de estos bucles son glutamato (principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso, que participa en varios procesos fisiológicos de importancia, como desarrollo de plasticidad, memoria, aprendizaje, así como en varias patologías como epilepsia y Parkinson (63)) y ácido γ -aminobutírico (GABA), neurotransmisor inhibitorio más abundante en el sistema nervioso central (62). Estos bucles contienen vías directas (excitatorias) e indirectas (inhibitorias) (62). La entrada dopaminérgica (64) en la sustancia *nigra pars compacta* parece modelar el equilibrio entre los bucles motores tanto inhibitorios como excitatorios (62). A continuación (Figura 4), se muestra la vía de señalización afectada en EP (62):

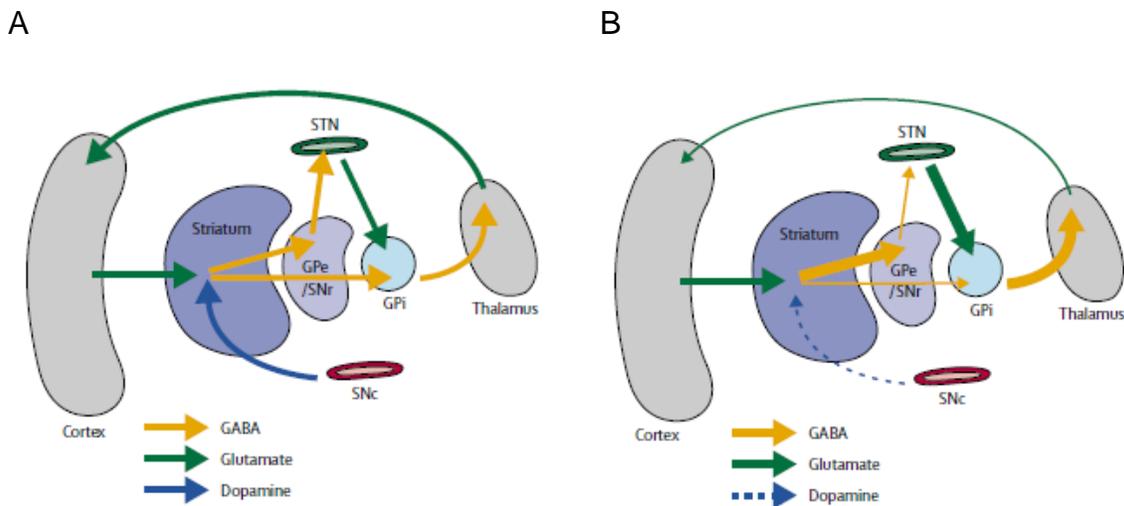
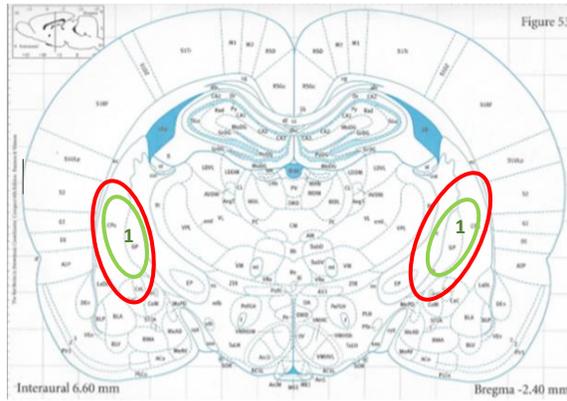


Figura 4. Modelos de la función ganglio basal, núcleos subcorticales que controlan el movimiento voluntario. A) Modelo normal de la función ganglio basal; B) Modelo para la disfunción ganglio basal en Enfermedad de Parkinson. Gpe= globo palido externo. Gpi=globo palido interno. STN= nucleo subtalámico. SNc=*substantia nigra pars compacta*. SNr=*substantia nigra pars reticulada*. Figura tomada y modificada de Burch (62).

1.8 Neuroglobina y Parkinson

En la actualidad no existen estudios sobre la NGB y su relación con las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson. Como se explicó anteriormente, se han realizado algunas investigaciones (3) (10) (24), que indagan sobre las propiedades y funciones de esta proteína cerebral, sin embargo, la información todavía es muy limitada y se requiere más investigación que podría ser de gran importancia en cuanto a las enfermedades neurodegenerativas se refiere dado a las propiedades y funciones que se le han atribuido. La comprensión del papel de la NGB en la enfermedad de Parkinson puede proporcionar los cimientos para la evaluación y diseño de nuevos tratamientos para el control de esta enfermedad, al mismo tiempo que para otras enfermedades neurodegenerativas. A continuación, se muestra una correlación de las áreas neuroanatómicas con mayor distribución de NGB y afectadas por EP (33) (31) (38) (60)(Figura 5):

A



B

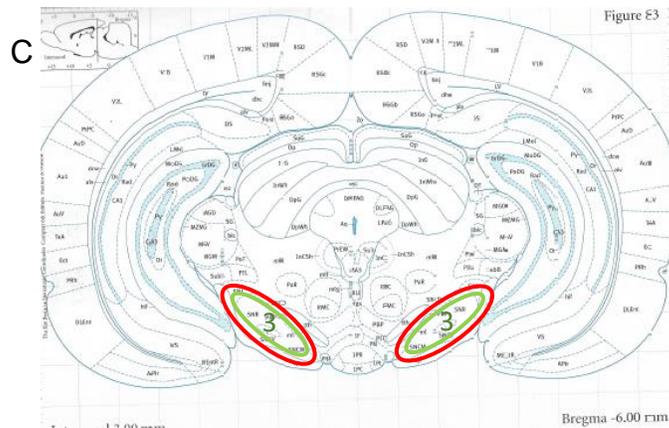
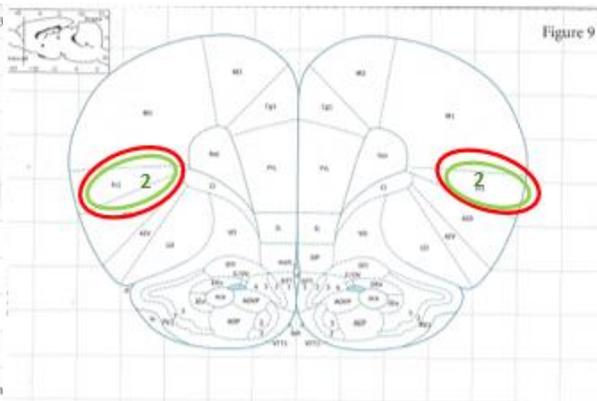


Figura 5. Cortes coronales de cerebro de rata (Bregma: A) -2.40 mm; B) 3.72 mm; C) -6.00 mm), donde se marcan en verde y rojo las áreas con mayor distribución de NGB y áreas afectadas en Parkinson: A) cuerpo estriado (1); B) Corteza Prefrontal (2) y C) *Sustancia nigra* (3). Figuras retomadas y modificadas de Paxinos (38).

2. Empleo de modelos animales para el estudio de enfermedades humanas

Los avances científicos en biología molecular y la necesidad cada vez mayor de poner en práctica los conocimientos para la identificación de biomoléculas, han traído consigo la posibilidad de utilizar animales como modelos en la experimentación. Actualmente, hay muchos animales que se utilizan con estos fines, por ejemplo: ratas y ratones, primates, perros, gatos, porcinos, conejos, entre otros.

R. norvegicus fue la primera especie de mamífero que se utilizó para la investigación científica, con trabajos que datan de antes de 1828. La primera colonia reproductora registrada para ratas se estableció en 1856. La genética de la rata tuvo un comienzo sorprendentemente temprano. Los primeros estudios de Crampe de 1877 a 1885 se centraron en la herencia del color del pelaje. Después del redescubrimiento de las leyes de Mendel al final del siglo, Bateson utilizó estos conceptos en 1903 para demostrar que el color del pelaje de rata es un rasgo mendeliano (65).

La primera cepa de rata endémica, PA, fue establecida por King en 1909. La rata se convirtió en el modelo de elección para fisiólogos, nutricionistas y otros investigadores biomédicos (66).

Durante el siglo pasado, el papel de la rata en la medicina se ha transformado como una herramienta indispensable en medicina experimental y desarrollo de fármacos; ejemplos de uso de la rata en la investigación médica humana incluyen cirugía (67), trasplante (68), cáncer (69), diabetes (70), adicción (71), regeneración neural (72), heridas (73), cicatrización ósea (74), enfermedades cardiovasculares (75) y trastornos del movimiento (76). En el desarrollo de fármacos la rata se emplea rutinariamente tanto para demostrar la eficacia de la actividad terapéutica y evaluar la toxicidad de nuevos compuestos terapéuticos antes de realizar ensayos clínicos en humanos (76).

Las ventajas de los ratones y ratas sobre otros animales experimentales incluyen la posibilidad de manipular información genética nueva dentro de la célula y transmitirla a la línea germinal. Por otro lado, la rata tiene un ciclo reproductivo muy

corto con tamaño de camadas grandes; es un animal pequeño, manejable, resistente, bien caracterizado en cuanto a su biología y por lo tanto muy usado en el laboratorio (76).

Es una especie que cuenta con muchas cepas consanguíneas diferentes. Para la rata existe un número abundante de anticuerpos y sondas de Cadn, y se han construido bibliotecas genómicas y de Cadn para cada cepa de rata. Es relativamente barato en comparación con otros animales experimentales y su mantenimiento, aun en condiciones de alta seguridad, es relativamente sencillo (77).

Según la secuenciación del genoma de rata que contiene 2.75 millones de pares de bases, se encontró que este es más pequeño que el genoma humano, que se conforma por 2.9 mil millones de pares de bases, y ligeramente mayor que el genoma del ratón, pues contiene 2,6 mil millones de pares de bases (78). Sin embargo, también se ha encontrado que el genoma de rata contiene aproximadamente el mismo número de genes que los genomas humanos y de ratón (78). Además, casi todos los genes humanos conocidos asociados a enfermedades tienen contraparte en el genoma de la rata y parecen altamente conservados a través de la evolución de los mamíferos, lo que confirma que la rata es un excelente modelo para muchas áreas de la investigación médica (78). La secuenciación del genoma ayuda a los investigadores a identificar mejor las áreas cruciales de la diferencia biológica entre las ratas y los seres humanos. La comparación del genoma humano con los de otros organismos es la herramienta más poderosa disponible para comprender los complejos componentes genómicos involucrados en la salud humana y la enfermedad (78). Según Pasupuleti *et al.* (79), los siguientes son los beneficios del uso de modelos animales en la investigación:

1. El uso de animales en la investigación ha hecho una contribución sustancial a la comprensión de los procesos biológicos
2. Ha sido responsable de muchos descubrimientos biomédicos importantes

3. Se utiliza en el desarrollo de un gran número de terapias y tratamientos preventivos, tales como antibióticos, insulina, vacunas y trasplante de órganos.

3. Planteamiento del problema

La Neuroglobina es una proteína que presenta preferencia por las neuronas del Sistema Nervioso Central. Se ha visto que esta proteína tiene actividades antiapoptóticas y antioxidantes cuando existe hipoxia, situación presente en la enfermedad de Parkinson, por lo que esta proteína podría estar teniendo un efecto neuroprotector cuando está presente este padecimiento. Actualmente, hay pocos estudios que indaguen a cerca de la presencia de esta proteína en las enfermedades neurodegenerativas, específicamente, no existen estudios que demuestren la tendencia de la presencia de NGB en la enfermedad de Parkinson, donde posiblemente podría estar incrementada. Por esto mismo, se evaluó la presencia de NGB en un modelo murino de la enfermedad de Parkinson, utilizando la técnica de inmunohistoquímica a través de los anticuerpos anticonejo neuroglobina y anticonejo biotinilado; anticuerpos nuevos para la identificación de la presencia de esta proteína en tejidos.

4. Justificación

La neuroglobina es una proteína que recientemente se identificó en el cerebro, a la cual se le han atribuido funciones neuroprotectoras que podrían ser de gran relevancia en las enfermedades neurodegenerativas, como la Enfermedad de Parkinson que actualmente es un problema de salud pública, ya que modula procesos directamente relacionados con su fisiopatología; sin embargo, existe muy poca información al respecto de la presencia de la proteína en las áreas afectadas por este padecimiento.

5. Hipótesis

Existe un aumento en la presencia de NGB en las áreas neuroanatómicas relacionadas con la enfermedad de Parkinson como es corteza prefrontal, cuerpo estriado y sustancia *nigra*, evaluada en un modelo murino para la Enfermedad de Parkinson.

6. Objetivos

6.1 Objetivo General

Determinar las diferencias en la presencia de NGB en corteza prefrontal, cuerpo estriado y sustancia *nigra*, en un modelo murino control y de la enfermedad de Parkinson.

6.2 Objetivo Específico

6.2.1 Comparar los agregados de NGB en corteza prefrontal, cuerpo estriado y sustancia *nigra* en un modelo murino de la cepa Wistar con la enfermedad de Parkinson.

7. Metodología

7.1 Implicaciones éticas

La actual investigación se llevó a cabo acogiendo todos los términos de la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, la cual tiene por objeto establecer y uniformar las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio que deben cumplir las personas físicas o morales relacionadas en todos los campos con este tipo de animales.

Los modelos animales con los que se experimentó se mantuvieron en cautiverio y bajo el debido manejo, clasificados según la categoría b de esta norma: experimentos que causan nula o mínima molestia o estrés.

La vigilancia de esta Norma corresponde a la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, así como a los Gobiernos de los Estados y del Distrito Federal, en el ámbito de sus respectivas atribuciones y circunscripciones territoriales, de conformidad con los acuerdos de coordinación respectivos.

7.2 Modelo murino

Condiciones en vivario

Para el estudio se utilizaron 8 ratas macho de la cepa Wistar, con un peso aproximado de 300 gramos \pm 50 gramos, 45 días postnatales. Los modelos se mantuvieron en condiciones estandarizadas del bioterio: ciclos de luz/oscuridad 12:12 (luces encendidas a las 5:00 am), con temperatura ambiente controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), comida y agua *ad libitum*. Todos los estudios cumplieron los principios y procedimientos descritos por los Institutos Nacionales de Salud; la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio y el comité local de la Universidad Autónoma del Estado de México.

7.2.1 Modelo murino de la enfermedad de Parkinson

Antes de la cirugía, a los modelos animales se les administró una mezcla de ketamina / xilazina (80 mg / kg de peso corporal y ketamina 10 mg / kg de peso corporal xilazina) mediante inyección intraperitoneal (27 aguja de calibre y jeringa de 1 cc). La administración adicional de anestésico se llevó a cabo según fue necesario durante el curso de cada operación para mantener un plano quirúrgico de anestesia.

La enfermedad de Parkinson se les indujo de acuerdo al siguiente procedimiento según Jáidar *et al.*(80): las ratas Wistar (23-29 días postnatal) se inyectaron con 2 µl de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Sigma, 4 µg / µl en NaCl al 0,9%, 0,5% de C₆H₈O₆) en la *sustancia nigra* derecha 1 µl / min en coordenadas estereotáxicas: anteroposterior, 3,9; Lateral, 1,8; Ventral, 6,7 mm. Una semana después de la inyección, las ratas se trataron con 4 mg / kg i.p. Anfetamina y se contaron los giros ipsilaterales durante 90 minutos con un aparato automático. Se utilizaron animales que mostraron más de 500 giros ipsilaterales para los experimentos, que se realizaron 11-15 días después de la lesión. Esta puntuación rotacional corresponde a > 97% de la lesión de las células dopaminérgicas SN (80).

7.3 Obtención de muestras

a) *Eutanasia*

Los individuos se sacrificaron 11-15 días después de inducido el daño, para ello se administraron 2 ml de pentobarbital sódico (anestesal Pfizer) por vía intramuscular y posterior a la ausencia de signos vitales se procedió a la perfusión.

b) *Perfusión*

Posterior a la inducción con pentobarbital sódico, se procedió a la apertura de la cavidad abdominal, posterior al pinzamiento de la vena cava y aorta abdominal, se introdujo una cánula por vía intracardíaca dirigida a la aorta ascendente, se fijó con

una pinza de presión y se realizó el corte de las aurículas cardiacas. Se perfundieron 200 mL de buffer de fosfatos, seguido de 250 mL de paraformaldehído al 4% al término de lo cual se procedió a la decapitación del animal y la extracción del cerebro.

c) Obtención del cerebro

Una vez finalizada la perfusión se retiró la cabeza utilizando una guillotina. Se realizó una incisión en el tegumento desde el cuello hasta la nariz y se expuso el cráneo, quitando el músculo del cuello que quedaba para que la base del cráneo estuviera expuesta. A continuación, se hizo un corte que se extendió hasta el borde distal de la superficie del cráneo posterior y un corte idéntico en el lado contralateral. Se utilizaron pinzas para retirar el hueso de la superficie dorsal del cráneo y pinzas para recortar los lados del cráneo. Con una espátula, se cortaron los bulbos olfatorios y las conexiones a lo largo de la superficie ventral del cerebro. Después de retirar el cerebro de la cavidad ósea, se colocó en un vial con 20 ml de solución de sacarosa al 10% por 24 horas al término de las cuales se sustituyó por sacarosa al 20% 24 horas más, y en las siguientes 24 horas se mantuvo con sacarosa al 30%. Posteriormente se realizaron cortes coronales de 40 μm a través de un criostato (Leica).

7.4 Inmunohistoquímica para NGB

La inmunohistoquímica es una técnica inmunoenzimática basada en la tinción de cortes histológicos y en la utilización de anticuerpos de unión específica a antígenos, formando complejos antígeno-anticuerpo, los cuales son detectados por medio de observación por microscopía. El procedimiento que se utilizó para llevar a cabo las inmunohistoquímicas en este trabajo se describe a continuación:

1. Se lavaron los cortes en PBS para inmunohistoquímica 3 veces por 5 min
PBS inmunohistoquímica (1L de solución):

-NaCl.....**8g**

-Na₂HPO₄ (12H₂O).....**2.9g**

-KH₂PO₄.....**0.2g**

-KCl.....**0.2g**

2. Se inhibió la peroxidasa endógena, sumergiendo los cortes en Solución de Ácido Peryódico al 0.28% durante 1 minuto a temperatura ambiente

3. Se lavaron los cortes en PBS para inmunohistoquímica 3 veces por 5 min

4. Se incubaron los cortes en Recuperador de Antígeno por 30 minutos a 60° C
Recuperador de Antígeno:

-Recuperador.....**1 mL**

-Agua destilada.....**20 mL**

5. Se equilibró la temperatura por 15 min a temperatura ambiente

6. Se lavaron los cortes en PBS para inmunohistoquímica 3 veces por 5 min

7. Se sumergieron los cortes en solución de bloqueo de 1.5 a 2 horas a temperatura ambiente

Solución de Bloqueo:

-PBS - Tritón 0.01% + Albúmina Sérica Bovina 2.5%.

8. Se incubaron en Anticuerpo Primario de 18 a 24 horas a 4° C (****48horas)
Anticuerpo Primario dilución 1:500 en solución de bloqueo

9. Se lavaron los cortes en PBS para inmunohistoquímica 3 veces por 5 min

10. Se incubaron en Anticuerpo Secundario Biotinilado por 2 horas a temperatura ambiente

Anticuerpo secundario dilución 1: 500 en PBS inmunohistoquímica

11. Se lavaron los cortes en PBS para inmunohistoquímica 3 veces por 5 min

12. Se incubaron en Complejo AB (Streptovidina-Peroxidasa) por 45 min a Temperatura ambiente

****Se preparó Complejo AB 30 minutos antes de usarse

13. Se lavaron los cortes en PBS para inmunohistoquímica 3 veces por 5 min

14. Se sumergieron los cortes en solución de revelado

Solución de Revelado:

-PBS inmunohistoquímica.....**10 mL**

-DAB.....**6 mg**

-Peróxido de hidrógeno 3%.....**0.1 mL**

****La solución de revelado se inactivó con cloro y permanganato de potasio al 3% antes de desecharse.

15. Se lavaron los cortes en PBS para inmunohistoquímica 3 veces por 5 min

16. Se montaron en portaobjetos los cortes con ayuda de pinceles y dejaron secar laminilla

17. Se pasó la laminilla por riel de secado (5 min en c/u)

Riel de Secado:

-Alcohol 96%

-Mezcla 1:1 de alcohol al 96% y alcohol absoluto

-Alcohol absoluto

-Mezcla 1:1 de alcohol absoluto y xilol

-Xilol 1

-Xilol 2

18. Se colocó en portaobjetos gota de resina sintética y se selló con cubreobjetos la preparación

Para la identificación de la presencia de NGB en el cerebro por medio de inmunohistoquímica y por observación al microscopio, se determinó la localización de neuroglobina en las siguientes áreas cerebrales:

Corteza prefrontal, cuerpo estriado, sustancia *nigra*.

7.5 Cuantificación de NGB

Se realizaron conteos de agregados de NGB identificados con un marcaje de color marrón, con un objetivo de 100 X en un microscopio de campo claro en un área estandarizada de 0.031 mm². Los conteos se hicieron por triplicado en cada una de las áreas a evaluar en los cortes por cada sujeto. En total se analizaron 18 campos.

Posterior a la contabilización, los datos se analizaron en el programa estadístico Statgraphics Centurion, donde se realizó un ANOVA multifactorial utilizando como factor 1 el tratamiento (control, Parkinson), y factor 2 el área del cerebro (Corteza prefrontal, cuerpo estriado y Sustancia *nigra*). La variable que se midió fue la densidad de agregados de NGB de color marrón por unidad de área (0.031 mm²). Los agregados indican la presencia de NGB en el citoplasma de las neuronas del sistema nervioso central, por campo evaluado. Las diferencias estadísticas se aceptaron cuando la $p < 0.05$.

8. Resultados

Comprobación de modelo murino de la Enfermedad de Parkinson

Una vez realizada la inducción de la Enfermedad de Parkinson por inyección de 20 μ L de 6-OHDA en la sustancia *nigra*, se evaluaron las ratas machos y se eligieron las ratas que presentaron mayor número de giros, usando como valor aceptado un número de giros mayor a 500; giros que se contabilizaron con un aparato automático, como se muestra en la Figura 6. Cabe mencionar que el método para la inducción de la Enfermedad de Parkinson en rata está muy aceptado y se llevó a cabo tanto el método como la comprobación de acuerdo a Jaidar (80).



Figura 6. Aparato automático para la prueba de giros con el fin de evaluar que la inducción de la enfermedad de Parkinson se llevó a cabo de manera correcta.

Distribución de NGB en áreas neuroanatómicas

Después de la selección de las ratas a través de la prueba de giros, una vez pasados 15 días post cirugía se prosiguió a la perfusión, de modo que se obtuvieron todos los cerebros, haciendo cortes por criostato de 40 micras, para proseguir con el método de inmunohistoquímica mencionado anteriormente, encontrando la siguiente distribución de NGB en las áreas neuroanatómicas evaluadas en este trabajo.

Corteza prefrontal

Se realizó una reconstrucción del corte del área neuroanatómica, corteza prefrontal. Los cortes reconstruidos fueron los obtenidos por criostato con grosor de 40 micras y coordenadas Bregma 3.72 mm e Interaural 12.72 mm, según Paxinos (38). Las fotografías fueron tomadas con objetivo 4X en microscopio de campo claro a través del programa ImageJ, y posteriormente la reconstrucción se realizó con el programa Image Composite Editor (Véase Figura 7 A). En la Figura 7 (A.1 y A.2) se puede observar el marcaje específico como pequeñas marcas marrones correspondientes a NGB, evaluada en la corteza prefrontal lado izquierdo, en grupo control y grupo Parkinson, respectivamente; donde se puede observar mayor marcaje de NGB en grupo con EP, como se muestra en la Figura A.1, A.2.

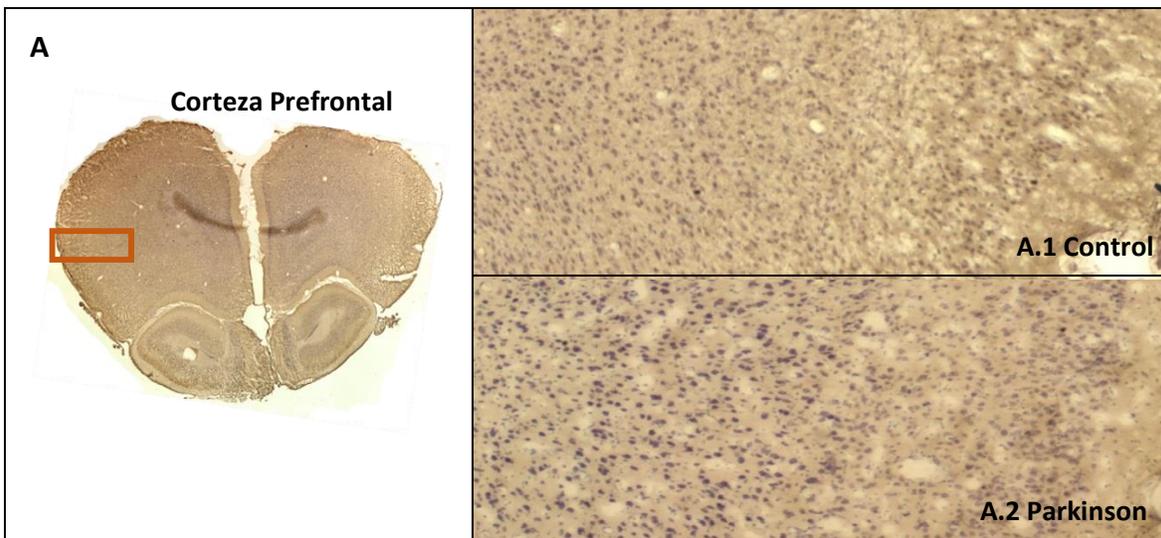


Figura 7. Localización por Inmunohistoquímica de presencia de Neuroglobina. **A**, muestra una reconstrucción del corte que se utilizó para ver la presencia de NGB en Corteza prefrontal. El cuadro en naranja muestra el área de corteza prefrontal. (A.1) Imagen de presencia de NGB en corteza prefrontal en modelo control. (A.2) Presencia de NGB en corteza prefrontal en modelo Parkinson. Ambas tomadas en microscopio de campo claro con un objetivo 4X.

Cuerpo estriado

Se realizó una reconstrucción del corte del área neuroanatómica, cuerpo estriado. Los cortes reconstruidos fueron los obtenidos por criostato con grosor de 40 micras y coordenadas Bregma -2.40 mm e Interaural 6.60 mm, según Paxinos (38). Las fotografías fueron tomadas con objetivo 4X en microscopio de campo claro a través del programa ImageJ, y posteriormente la reconstrucción se realizó con el programa Image Composite Editor (Véase Figura 8 B). En la Figura 8 (B.1 y B.2) se puede observar el marcaje específico como pequeñas marcas marrones correspondientes a NGB, evaluada en cuerpo estriado lado izquierdo, en grupo control y grupo Parkinson, respectivamente; donde se puede observar mayor marcaje de NGB en grupo con EP, como se muestra en la Figura 8 (B.1, B.2).

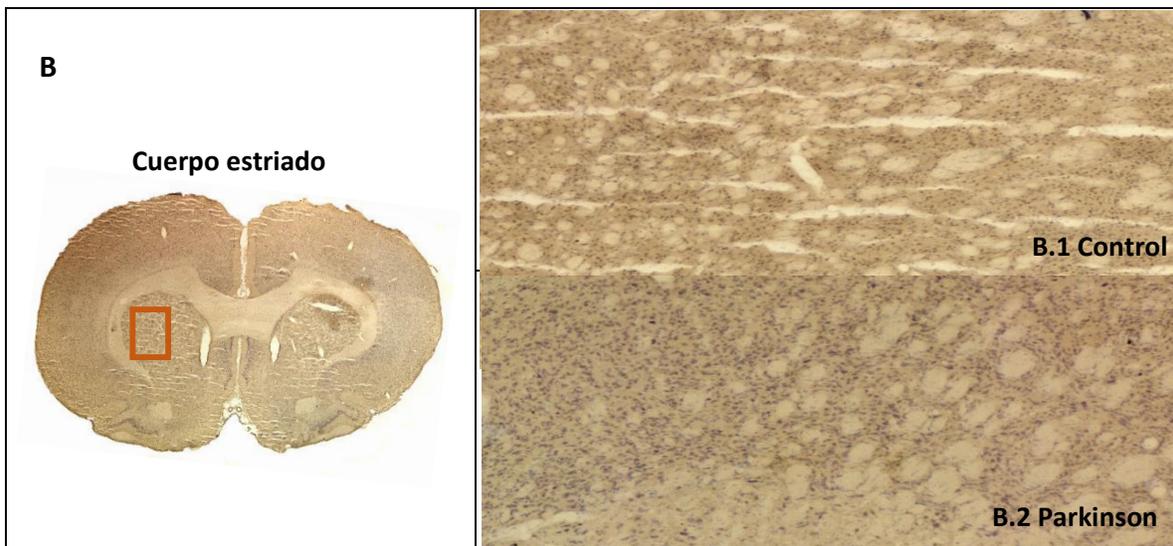


Figura 8. Localización por Inmunohistoquímica de presencia de Neuroglobina. **B**, muestra una reconstrucción del corte que se utilizó para ver la presencia de NGB en Cuerpo estriado. El cuadro en naranja muestra el área de cuerpo estriado. (B.1) Imagen de presencia de NGB en cuerpo estriado en modelo control. (B.2) Presencia de NGB en cuerpo estriado en modelo murino de Enfermedad de Parkinson. Ambas tomadas en microscopio de campo claro con un objetivo 4X.

Sustancia *nigra*

Se realizó una reconstrucción del corte del área neuroanatómica, sustancia *nigra*. Los cortes reconstruidos fueron los obtenidos por criostato con grosor de 40 micras y coordenadas Bregma -6.00 mm e Interaural 2.96 mm, según Paxinos (38). Las fotografías fueron tomadas con objetivo 4X en microscopio de campo claro a través del programa ImageJ, y posteriormente la reconstrucción se realizó con el programa Image Composite Editor (Véase Figura 9 C). En la Figura 9 (C.1 y C.2) se puede observar el marcaje específico como pequeñas marcas marrones correspondientes a NGB, evaluada en la sustancia *nigra* lado izquierdo, en grupo control y grupo Parkinson, respectivamente; donde se puede observar mayor marcaje de NGB en grupo con EP, como se muestra en la Figura 9 (C.1, C.2).

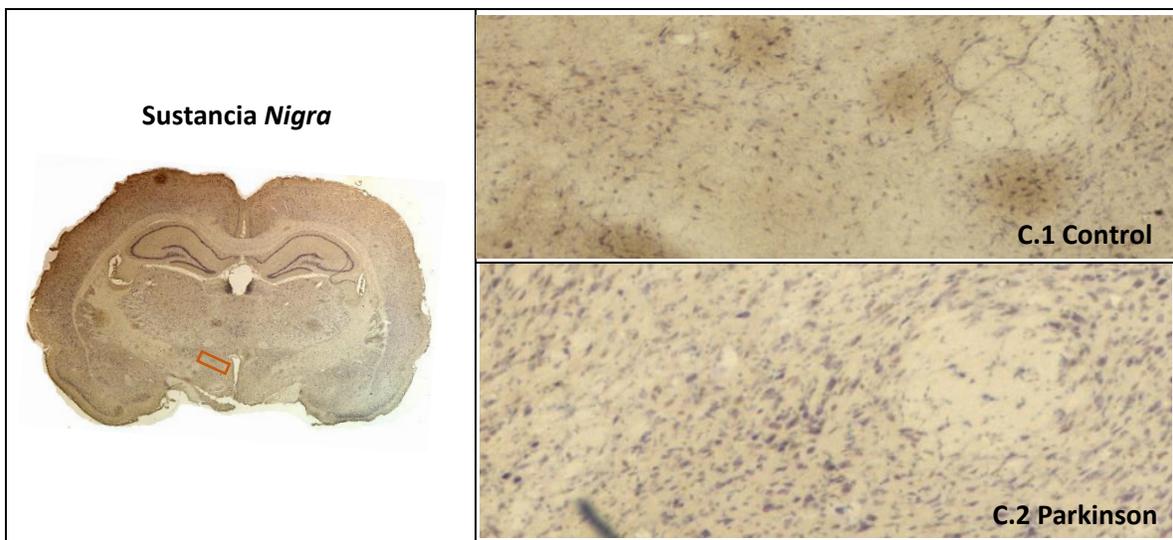
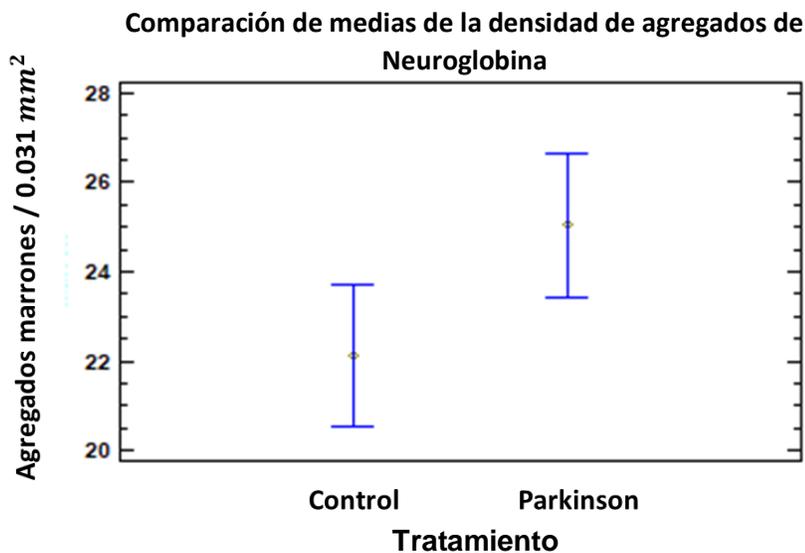


Figura 8. Localización por Inmunohistoquímica de presencia de Neuroglobina. **C**, muestra una reconstrucción del corte que se utilizó para ver la presencia de NGB en Sustancia *nigra*. El cuadro en naranja muestra el área de sustancia *nigra*. (C.1) Imagen de presencia de NGB en sustancia *nigra* en modelo control. (C.2) Presencia de NGB en sustancia *nigra* en modelo murino de Enfermedad de Parkinson. Ambas tomadas en microscopio de campo claro con un objetivo 4X.

Cuantificación de NGB

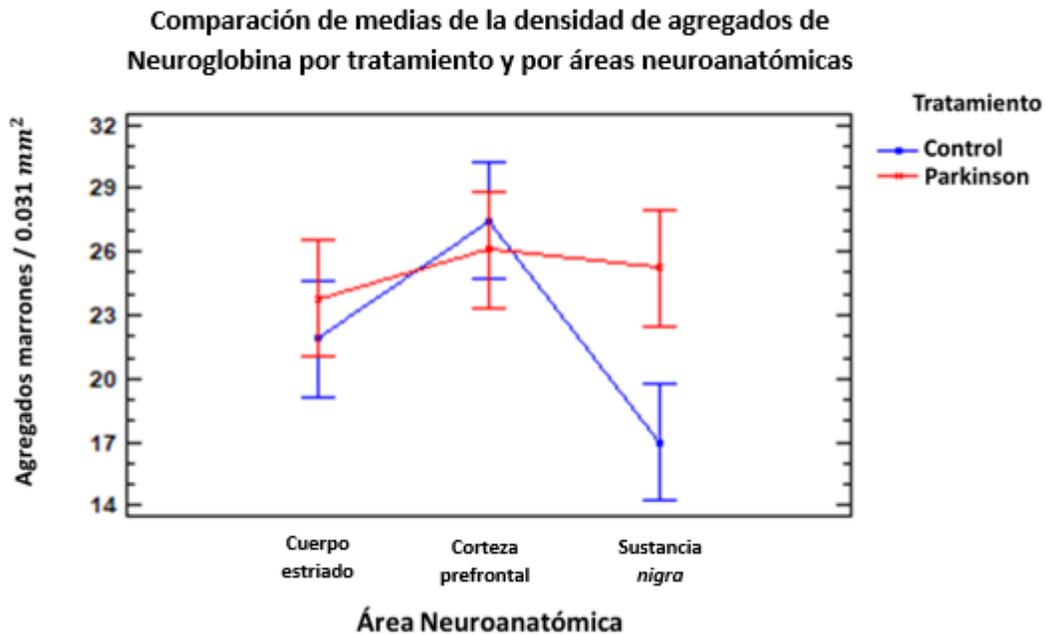
De acuerdo al estudio estadístico semicuantitativo realizando un ANOVA multifactorial, a través del cual se comparó la presencia de NGB en las diferentes áreas estudiadas y los tratamientos, con intervalos de confianza de 95%, se encontró que hay mayor presencia de NGB cuando está presente la enfermedad de Parkinson, de acuerdo a la densidad de agregados de NGB encontrados en el área del objetivo (0.031 mm^2) en los conteos por triplicado que se llevaron a cabo (Véase Gráfica 1).



Gráfica 1. Comparación de medias de la densidad de agregados de NGB entre el grupo control y el grupo con Parkinson. Se muestran intervalos de confianza del 95% para cada grupo. La densidad de agregados de NGB entre el grupo control no es estadísticamente significativa comparada con el grupo con Parkinson.

Sin embargo, entre las áreas evaluadas en ambos tratamientos, hay diferencias significativas solamente en Sustancia *nigra* cuando está presente la enfermedad de Parkinson, ya que tanto en Corteza prefrontal y Cuerpo estriado entre los tratamientos no hay diferencias significativas en cuanto a la presencia de Neuroglobina, sin embargo, en corteza prefrontal se muestra una tendencia de

mayor agregados de NGB cuando está presente la EP, como se muestra en la Gráfica 2, ya que comparamos las medias de la densidad de agregados de NGB por tratamiento y por áreas neuroanatómicas realizando un ANOVA multifactorial, con intervalos de confianza del 95%.



Gráfica 2. Comparación de las medias de la densidad de agregados de NGB, por tratamiento y por áreas neuroanatómicas. Se muestran intervalos de confianza del 95% contruidos con la distancia mínima significativa (LSD). El tratamiento control se muestra en color azul y el tratamiento de Parkinson se muestra en color rojo. Intervalos sobrepuestos no presentan diferencias; intervalos no sobrepuestos si presentan diferencias significativas.

9. Discusión

NGB tiene una amplia presencia en el sistema nervioso central, la cual ha sido demostrada en diversos estudios en diferentes áreas cerebrales. Según Wistub (26), esta proteína está presente en corteza, tálamo, hipocampo, hipotálamo, entre otras áreas. En nuestro estudio encontramos presencia de esta proteína en todas las áreas cerebrales estudiadas que engloban: cuerpo estriado, corteza prefrontal y sustancia *nigra*, hallazgo que coincide con otros estudios como Hankeln (24) y Cutrupi (25).

Ante situaciones normales, en las áreas evaluadas tratamiento control, dentro de este mismo grupo se encontró una mayor presencia de NGB en cuerpo estriado y corteza prefrontal como se muestra en la figura 7(A.1) y 8(B.1). Sin embargo, también existe presencia en sustancia *nigra* en sujeto control, pero en menor proporción comparada con las otras áreas evaluadas, datos que se corroboran en la Gráfica 2.

En la enfermedad de Parkinson, como se había mencionado anteriormente, no existen estudios publicados al respecto, por lo que los datos obtenidos en la presente investigación son de gran relevancia, ya que este es el primer reporte en el que se indica e identifica un patrón de presencia de NGB en un modelo para la enfermedad de Parkinson, lo cual puede ser un parteaguas para identificar el rol que juega neuroglobina en la enfermedad de Parkinson. Cabe hacer mención que la enfermedad de Parkinson es el principal trastorno neurodegenerativo del movimiento que actualmente afecta al 1% de la población mayor de 60 años (32). Además, en México se ha estimado una prevalencia de 40-50 casos por cada 100,000 habitantes/ año. Se ha calculado que en el mundo debido al aumento de la tasa de sobrevivencia y con esto el aumento de enfermedades neurodegenerativas, la enfermedad de Parkinson afecta actualmente 4.1-4.6 millones de personas mayores de 50 años, calculándose que para el año 2030 esta cifra será duplicada, lo que conlleva un problema de salud pública.

Debido a la gran importancia epidemiológica de esta patología, analizar la presencia de NGB es de relevancia e interés, ya que gracias a nuestro estudio se encontró que en sustancia *nigra*, cuerpo estriado y corteza prefrontal hay un incremento en la presencia de esta proteína cuando está presente la enfermedad de Parkinson, sin embargo, la presencia de NGB solamente es estadísticamente significativa en Sustancia *nigra*, área en la que el incremento en la presencia de NGB, es de gran importancia en modelo murino de la enfermedad de Parkinson, ya que resaltamos que sustancia *nigra*, es la principal área afectada durante esta patología por la pérdida de neuronas dopaminérgicas, por lo que, al existir un alza en la presencia de esta proteína en ésta, podría estar llevando a cabo sus propiedades neuroprotectoras y ser necesaria para la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas que se proyectan hacia ganglios basales o corteza prefrontal.

Cabe hacer mención que la mayor presencia de NGB en sustancia *nigra* en el modelo de enfermedad de Parkinson, también podría atribuirse al efecto de la inducción de la enfermedad, ya que en el presente modelo experimental se analizó 15 días post-cirugía la presencia de NGB, lo cual pudiese haber favorecido el alza de la proteína como respuesta a una afectación aguda, al llevar a cabo su función neuroprotectora antipoptótica y antioxidante, como lo describen diversos artículos como Hua *et al* (12), Dewilde *et al* (8), Fago *et al* (22).

Cabe resaltar, que existen pocos estudios que indaguen acerca de la presencia de NGB en enfermedades neurodegenerativas. De hecho, existe un estudio (81) donde se evaluó la presencia de NGB en áreas afectadas en la enfermedad de Huntington, patología neurodegenerativa donde se ve afectado principalmente cuerpo estriado, tálamo y corteza. En dicho estudio encontraron mayor presencia de NGB cuando está presente la enfermedad, sin embargo, aunque hay una mayor presencia de la proteína en cuerpo estriado comparada con el control, la presencia de NGB en el estriado es menor, que, en tálamo y corteza, a pesar de que el cuerpo estriado es la principal área afectada en la enfermedad de Huntington. Lo cual también concuerda con nuestros resultados, pero en las áreas afectadas en la enfermedad de Parkinson, sustancia *nigra*, cuerpo estriado y corteza, sin embargo, en nuestro

estudio, aunque hay una tendencia a mayor presencia de neuroglobina en todas las áreas, solo encontramos diferencias estadísticamente significativas en sustancia *nigra*, cuando está presente la enfermedad. Lo anterior, podría deberse a la protección de modo que las áreas con proyecciones desde sustancia *nigra*, área donde se presentó la muerte de neuronas dopaminérgicas, no se vean mayormente afectadas, previniendo la apoptosis de neuronas en ganglios basales o corteza prefrontal, sin embargo, faltan más estudios al respecto.

10. Conclusión

- Primer informe que demuestra un patrón de presencia de NGB durante la inducción aguda de la enfermedad de Parkinson en un modelo murino.
- Los resultados de este estudio proporcionan un mayor apoyo a la hipótesis de que NGB podría desempeñar un papel neuroprotector en enfermedad de Parkinson, ya que con la inducción de esta patología se produce un alza de la presencia de esta proteína en el área más afectada que es la Sustancia *nigra*.

11. Perspectivas

Evaluar y comparar la presencia de NGB en las diferentes etapas de la enfermedad de Parkinson para tener un mayor entendimiento del momento en el que la proteína se hace presente y el por qué.

12. Bibliografía

1. Burmester T, Weich B, Reinhardt S, Hankeln T. A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature*. 2000;407(6803):520-3.
2. Kugelstadt D, Haberkamp M, Hankeln T, Burmester T. Neuroglobin, cytoglobin, and a novel, eye-specific globin from chicken. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;325(3):719-25.
3. Burmester T, Hankeln T. What is the function of neuroglobin? *The Journal of experimental biology*. 2009;212(Pt 10):1423-8.
4. Qiu XY, Chen XQ. Neuroglobin - recent developments. *Biomolecular concepts*. 2014;5(3):195-208.
5. Tosqui P, Colombo MF. Neuroglobin and cytoglobin: two new members of globin family. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*. 2011;33(4):307-11.
6. Ascenzi P, di Masi A, Leboffe L, Fiocchetti M, Nuzzo MT, Brunori M, et al. Neuroglobin: From structure to function in health and disease. *Molecular aspects of medicine*. 2016;52:1-48.
7. Brittain T. The anti-apoptotic role of neuroglobin. *Cells*. 2012;1(4):1133-55.
8. Ascenzi P, Bocedi A, de Sanctis D, Pesce A, Bolognesi M, Marden MC, et al. Neuroglobin and cytoglobin: Two new entries in the hemoglobin superfamily*. *Biochemistry and molecular biology education : a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 2004;32(5):305-13.
9. Pesce A, De Sanctis D, Nardini M, Dewilde S, Moens L, Hankeln T, et al. Reversible hexa- to penta-coordination of the heme Fe atom modulates ligand binding properties of neuroglobin and cytoglobin. *IUBMB life*. 2004;56(11-12):657-64.
10. Dewilde S, Kiger L, Burmester T, Hankeln T, Baudin-Creuzat V, Aerts T, et al. Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family. *J Biol Chem*. 2001;276(42):38949-55.
11. Pesce A, Bolognesi M, Bocedi A, Ascenzi P, Dewilde S, Moens L, et al. Neuroglobin and cytoglobin. Fresh blood for the vertebrate globin family. *EMBO reports*. 2002;3(12):1146-51.
12. Hamdane D, Kiger L, Dewilde S, Uzan J, Burmester T, Hankeln T, et al. Hyperthermal stability of neuroglobin and cytoglobin. *The FEBS journal*. 2005;272(8):2076-84.
13. Reuss S, Saaler-Reinhardt S, Weich B, Wystub S, Reuss MH, Burmester T, et al. Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues. *Neuroscience*. 2002;115(3):645-56.
14. Pesce A, Dewilde S, Nardini M, Moens L, Ascenzi P, Hankeln T, et al. Human brain neuroglobin structure reveals a distinct mode of controlling oxygen affinity. *Structure*. 2003;11(9):1087-95.
15. Burmester T, Haberkamp M, Mitz S, Roesner A, Schmidt M, Ebner B, et al. Neuroglobin and cytoglobin: genes, proteins and evolution. *IUBMB life*. 2004;56(11-12):703-7.
16. Burmester T, Hankeln T. Neuroglobin: a respiratory protein of the nervous system. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*. 2004;19:110-3.
17. Hua S, Antao ST, Corbett A, Witting PK. The significance of neuroglobin in the brain. *Current medicinal chemistry*. 2010;17(2):160-72.
18. Wakasugi K, Nakano T, Morishima I. Oxidized human neuroglobin acts as a heterotrimeric α protein guanine nucleotide dissociation inhibitor. *J Biol Chem*. 2003;278(38):36505-12.
19. Herold S, Fago A, Weber RE, Dewilde S, Moens L. Reactivity studies of the Fe(III) and Fe(II)NO forms of human neuroglobin reveal a potential role against oxidative stress. *J Biol Chem*. 2004;279(22):22841-7.

20. Lee VY, McClintock DS, Santore MT, Budinger GR, Chandel NS. Hypoxia sensitizes cells to nitric oxide-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2002;277(18):16067-74.
21. Brunori M, Giuffre A, Nienhaus K, Nienhaus GU, Scandurra FM, Vallone B. Neuroglobin, nitric oxide, and oxygen: functional pathways and conformational changes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(24):8483-8.
22. Liu ZF, Zhang X, Qiao YX, Xu WQ, Ma CT, Gu HL, et al. Neuroglobin protects cardiomyocytes against apoptosis and cardiac hypertrophy induced by isoproterenol in rats. *International journal of clinical and experimental medicine.* 2015;8(4):5351-60.
23. Baez E, Echeverria V, Cabezas R, Avila-Rodriguez M, Garcia-Segura LM, Barreto GE. Protection by Neuroglobin Expression in Brain Pathologies. *Frontiers in neurology.* 2016;7:146.
24. Fago A, Hundahl C, Malte H, Weber RE. Functional properties of neuroglobin and cytoglobin. Insights into the ancestral physiological roles of globins. *IUBMB life.* 2004;56(11-12):689-96.
25. Schneuer M, Flachsbarth S, Czech-Damal NU, Folkow LP, Siebert U, Burmester T. Neuroglobin of seals and whales: evidence for a divergent role in the diving brain. *Neuroscience.* 2012;223:35-44.
26. Van Leuven W, Van Dam D, Moens L, De Deyn PP, Dewilde S. A behavioural study of neuroglobin-overexpressing mice under normoxic and hypoxic conditions. *Biochimica et biophysica acta.* 2013;1834(9):1764-71.
27. Lechauve C, Rezaei H, Celier C, Kiger L, Corral-Debrinski M, Noinville S, et al. Neuroglobin and prion cellular localization: investigation of a potential interaction. *Journal of molecular biology.* 2009;388(5):968-77.
28. Brittain T, Skommer J, Henty K, Birch N, Raychaudhuri S. A role for human neuroglobin in apoptosis. *IUBMB life.* 2010;62(12):878-85.
29. Skommer J, Helbo S, Henty K, Brittain T. Ligand binding, reactivity and biological activity of a distal pocket mutant of neuroglobin. *Int J Biol Macromol.* 2012;51(3):284-90.
30. Toro-Urrego N, Garcia-Segura LM, Echeverria V, Barreto GE. Testosterone Protects Mitochondrial Function and Regulates Neuroglobin Expression in Astrocytic Cells Exposed to Glucose Deprivation. *Front Aging Neurosci.* 2016;8:152.
31. Hankeln T, Wystub S, Laufs T, Schmidt M, Gerlach F, Saaler-Reinhardt S, et al. The cellular and subcellular localization of neuroglobin and cytoglobin -- a clue to their function? *IUBMB life.* 2004;56(11-12):671-9.
32. Cutrupi S, Ferrero G, Reineri S, Cordero F, De Bortoli M. Genomic lens on neuroglobin transcription. *IUBMB life.* 2014;66(1):46-51.
33. Wystub S, Laufs T, Schmidt M, Burmester T, Maas U, Saaler-Reinhardt S, et al. Localization of neuroglobin protein in the mouse brain. *Neuroscience letters.* 2003;346(1-2):114-6.
34. Chen X, Liu Y, Zhang L, Zhu P, Zhu H, Yang Y, et al. Long-term neuroglobin expression of human astrocytes following brain trauma. *Neuroscience letters.* 2015;606:194-9.
35. DellaValle B, Hempel C, Kurtzhals JA, Penkowa M. In vivo expression of neuroglobin in reactive astrocytes during neuropathology in murine models of traumatic brain injury, cerebral malaria, and autoimmune encephalitis. *Glia.* 2010;58(10):1220-7.
36. Jin K, Mao Y, Mao X, Xie L, Greenberg DA. Neuroglobin expression in ischemic stroke. *Stroke.* 2010;41(3):557-9.
37. Emara M, Turner AR, Allalunis-Turner J. Hypoxia differentially upregulates the expression of embryonic, fetal and adult hemoglobin in human glioblastoma cells. *International journal of oncology.* 2014;44(3):950-8.
38. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 6 ed. ELSEVIER, editor. USA: ELSEVIER; 2009. 161 p.

39. de Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, et al. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*. 2000;54(11 Suppl 5):S21-3.
40. Stacy M. Medical treatment of Parkinson disease. *Neurologic clinics*. 2009;27(3):605-31, v.
41. Hornykiewicz O. The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. *Journal of neural transmission Supplementum*. 2006(70):9-15.
42. McCann H, Cartwright H, Halliday GM. Neuropathology of alpha-synuclein propagation and Braak hypothesis. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2016;31(2):152-60.
43. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*. 2003;24(2):197-211.
44. Breen DP, Nombela C, Vuono R, Jones PS, Fisher K, Burn DJ, et al. Hypothalamic volume loss is associated with reduced melatonin output in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2016;31(7):1062-6.
45. Olteanu A, Pielak GJ. Peroxidative aggregation of alpha-synuclein requires tyrosines. *Protein Sci*. 2004;13(11):2852-6.
46. Ischiropoulos H. Protein tyrosine nitration--an update. *Arch Biochem Biophys*. 2009;484(2):117-21.
47. Demey I, Allegri R. Demencia en la enfermedad de parkinson y demencia por cuerpos de lewy. *Revista Neurológica Argentina*. 2008;33.
48. German DC, Manaye K, Smith WK, Woodward DJ, Saper CB. Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease: computer visualization. *Annals of neurology*. 1989;26(4):507-14.
49. German DC, Manaye KF, Sonsalla PK, Brooks BA. Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease and MPTP-induced parkinsonism: sparing of calbindin-D28k-containing cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1992;648:42-62.
50. Gibb WR, Lees AJ. Anatomy, pigmentation, ventral and dorsal subpopulations of the substantia nigra, and differential cell death in Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1991;54(5):388-96.
51. Fedorow H, Tribi F, Halliday G, Gerlach M, Riederer P, Double KL. Neuromelanin in human dopamine neurons: comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*. 2005;75(2):109-24.
52. Bellucci A, Mercuri NB, Venneri A, Faustini G, Longhena F, Pizzi M, et al. Review: Parkinson's disease: from synaptic loss to connectome dysfunction. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2016;42(1):77-94.
53. Kleinknecht A, Popova B, Lazaro DF, Pinho R, Valerius O, Outeiro TF, et al. C-Terminal Tyrosine Residue Modifications Modulate the Protective Phosphorylation of Serine 129 of alpha-Synuclein in a Yeast Model of Parkinson's Disease. *PLoS genetics*. 2016;12(6):e1006098.
54. Apostolova LG, Beyer M, Green AE, Hwang KS, Morra JH, Chou YY, et al. Hippocampal, caudate, and ventricular changes in Parkinson's disease with and without dementia. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2010;25(6):687-95.
55. Apostolova L, Alves G, Hwang KS, Babakchanian S, Bronnick KS, Larsen JP, et al. Hippocampal and ventricular changes in Parkinson's disease mild cognitive impairment. *Neurobiology of aging*. 2012;33(9):2113-24.
56. Jellinger K. The pedunculopontine nucleus in Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1988;51(4):540-3.

57. Garcia-Rill E, Simon C, Smith K, Kezunovic N, Hyde J. The pedunclopontine tegmental nucleus: from basic neuroscience to neurosurgical applications: arousal from slices to humans: implications for DBS. *Journal of neural transmission*. 2011;118(10):1397-407.
58. Nutt JG, Bloem BR, Giladi N, Hallett M, Horak FB, Nieuwboer A. Freezing of gait: moving forward on a mysterious clinical phenomenon. *The Lancet Neurology*. 2011;10(8):734-44.
59. Zweig RM, Jankel WR, Hedreen JC, Mayeux R, Price DL. The pedunclopontine nucleus in Parkinson's disease. *Annals of neurology*. 1989;26(1):41-6.
60. Nagee LM, Honce JM, Tanabe J, Shelton E, Sillau SH, Berman BD. Microstructural Changes within the Basal Ganglia Differ between Parkinson Disease Subtypes. *Frontiers in neuroanatomy*. 2016;10:17.
61. Alexander AL, Lee JE, Lazar M, Field AS. Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2007;4(3):316-29.
62. Burch D, Sheerin F. Parkinson's disease. *The Lancet*. 2005.
63. Medina-Ceja L, Guerrero-Cazares H, Canales-Aguirre A, Morales-Villagran A, Feria-Velasco A. [Structural and functional characteristics of glutamate transporters: how they are related to epilepsy and oxidative stress]. *Revista de neurologia*. 2007;45(6):341-52.
64. Bahena-Trujillo R, Flores-G., Arias-Montañó A. Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Biomed*. 2000;11:36-60.
65. Lindsey JR. *The Laboratory Rat*. 1979.
66. Kendall C, Wagner JE. Characterization of strain specific typing antisera for genetic monitoring of inbred strains of rats. *Laboratory animal science*. 1985;35(4):364-9.
67. Kuntz C, Kienle P, Schmeding M, Benner A, Autschbach F, Schwalbach P. Comparison of laparoscopic versus conventional technique in colonic and liver resection in a tumor-bearing small animal model. *Surg Endosc*. 2002;16(8):1175-81.
68. Kitagawa K, Hamada Y, Nakai K, Kato Y, Okumura T. Comparison of one- and two-step procedures in a rat model of small bowel transplantation. *Transplant Proc*. 2002;34(3):1030-2.
69. Alves A, Charre L, Panis Y, Cardoso J, Fabre M, Brisson E, et al. Total vascular exclusion of the liver enhances the efficacy of retroviral-mediated associated thymidine kinase and interleukin-2 genes transfer against multiple hepatic tumors in rats. *Surgery*. 2003;133(6):669-77.
70. Ravingerova T, Neckar J, Kolar F. Ischemic tolerance of rat hearts in acute and chronic phases of experimental diabetes. *Mol Cell Biochem*. 2003;249(1-2):167-74.
71. Smyth MD, Barbaro NM, Baraban SC. Effects of antiepileptic drugs on induced epileptiform activity in a rat model of dysplasia. *Epilepsy Res*. 2002;50(3):251-64.
72. Crisci AR, Ferreira AL. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates the regeneration of the sciatic nerve after neurotomy in rats. *Ultrasound Med Biol*. 2002;28(10):1335-41.
73. Fray MJ, Dickinson RP, Huggins JP, Ocleston NL. A potent, selective inhibitor of matrix metalloproteinase-3 for the topical treatment of chronic dermal ulcers. *J Med Chem*. 2003;46(16):3514-25.
74. Hussar P, Piirsoo A, Martson A, Toom A, Haviko T, Hussar U. Bone healing models in rat tibia after different injuries. *Ann Chir Gynaecol*. 2001;90(4):271-9.
75. Forte A, Esposito S, De Feo M, Galderisi U, Quarto C, Esposito F, et al. Stenosis progression after surgical injury in Milan hypertensive rat carotid arteries. *Cardiovasc Res*. 2003;60(3):654-63.
76. Peterson J, Guyer M, Felsenfeld A, Old S, Mockrin S, Collins F. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*. 2004;428.
77. Rodríguez E. Ethics of research with animal models for human diseases. *SciELO*. 2007;13.
78. Bethesda. Compare Rat Genome With Human and Mouse. NIH. 2004.

79. Pasupuleti MK, Molahally SS, Salwaji S. Ethical guidelines, animal profile, various animal models used in periodontal research with alternatives and future perspectives. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2016;20(4):360-8.
80. Jaidar O, Carrillo-Reid L, Hernandez A, Drucker-Colin R, Bargas J, Hernandez-Cruz A. Dynamics of the Parkinsonian striatal microcircuit: entrainment into a dominant network state. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30(34):11326-36.
81. Cardinale A, Fusco FR, Paldino E, Giampa C, Marino M, Nuzzo MT, et al. Localization of neuroglobin in the brain of R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2018;39(2):275-85.

Anexo I

Perfusión y extracción del cerebro

1. Usando el baño de agua, tampón de perfusión caliente a 37 ° C. Colocar la válvula de salida en un vaso lleno con tampón. Llenar una jeringa de 50 ml con tampón y se conecte a un tubo fijador. Lave la tubería en varias ocasiones por la expulsión y retirada del tampón.
2. Borrar la línea con el tampón hasta que todas las burbujas de aire en la tubería se eliminan. Es crucial para el éxito de una perfusión no tener burbujas de aire en cualquiera de las líneas.
3. Retirar la jeringa y conectar el fijador de paraformaldehído al 4% (temperatura ambiente) el contenedor. Para evitar burbujas de aire en el extremo del tubo, apretar el tubo, mientras que la colocación del tubo en el recipiente de manera que una gota de tampón sobresale desde el extremo to ponerse en contacto con la superficie del fluido dentro del contenedor.
4. Cierre la puerta de salida (extremo de la aguja). Gire la válvula de amortiguación (azul) a la misma posición que la válvula de fijador (blanco). Esto permitirá que el flujo desde la línea de tampón solo.
5. Abra la puerta de salida y repita el paso A1 a A3 para el llenado de la línea de amortiguación. Después de que todas las burbujas de aire se eliminan cerrar el orificio de salida, retire la jeringa y conectar el recipiente tampón, teniendo cuidado de no introducir burbujas de aire en la tubería.
6. Sistema de prueba para la capacidad de mantener la presión de bombeo del manómetro de goma. Normalmente existe una cierta resistencia debido a la compresión de aire en el sistema.
7. Instalación de herramientas de la cirugía con el fin de fácil acceso: Llenar aguja de perfusión con tampón para eliminar la posibilidad de burbujas de aire.
8. Antes de la cirugía, una mezcla de ketamina / xilazina (hasta 80 mg / kg de peso corporal y ketamina 10 mg / kg de peso corporal xilazina) se administra mediante inyección intraperitoneal (27 aguja de calibre y jeringa de 1 cc). La administración adicional de anestésico se llevará a cabo según sea necesario durante el curso de cada operación para mantener un plano quirúrgico de anestesia.
9. Una vez que el animal ha llegado a un plano quirúrgico de anestesia, colóquelo en la bandeja poco profunda llena de hielo picado. (Use dedo pizca de respuesta el método para determinar la profundidad de la anestesia. Se debe asegurar que el animal no responde antes de continuar).

10. Haga una incisión 5-6 cm lateral a través del tegumento y la pared abdominal justo debajo de la caja torácica. Con cuidado, separar el hígado a partir del diafragma.
11. Haga una pequeña incisión en la membrana con las tijeras curvas, romas. La posición y la presión del dedo pueden ayudar en la capacidad de cortar el diafragma.
12. Continuar la incisión diafragma a lo largo de toda la longitud de la caja torácica para exponer la cavidad pleural.
13. Coloque las tijeras curvas, romas a un lado de las costillas, el desplazamiento de cuidado de los pulmones, y hacer un cuT a través de la caja torácica hasta la clavícula. Haga un corte similar en el lado contralateral.
14. Elevación del esternón de distancia, recortar cuidadosamente cualquier tejido que lo conecta con el corazón. Sujetar la punta del esternón con la pinza hemostática y colocar la pinza hemostática sobre la cabeza. Cuando se hace correctamente, el timo se levanta desde el corazón, junto con el esternón, que proporciona una visión clara de los grandes vasos.
15. Hacer una pequeña incisión en el extremo posterior del ventrículo izquierdo con unas tijeras iris.
16. Pasar una aguja de calibre 15-perfusión romo o de oliva con punta-a través del ventrículo corte en la aorta ascendente. La punta debe ser visible a través de la pared de la aorta, y no debe llegar al arco de la aorta en las arterias braquial y carotídeo divergen.
17. Utilizar una pinza hemostática para sujetar el corazón, esto asegura la aguja y evita la fuga. Si se desea, el hemostato modificado puede ser utilizado para sujetar la aorta alrededor de la punta de la aguja (estas hemostatos permanecer en su lugar hasta que comienza la disección, pero se omiten las ilustraciones futuras para mayor claridad).
18. Por último, hacer una incisión a la aurícula derecha del animal con unas tijeras iris para crear una toma de corriente tan grande como sea posible sin dañar la aorta descendente. En este punto el animal está listo para ser perfundido.
19. Abrir y conectar el puerto de salida a la aguja de la base con cuidado de no introducir burbujas de aire.
20. Sube el manómetro de la bombilla a una presión de 80 mm Hg con rapidez y de manera uniforme. Mantener esta presión durante todo el período de infusión de amortiguamiento. Inicie el temporizador.
21. Ajuste el ángulo de la aguja. El ángulo de la aguja es crítico para la consecución de una tasa máxima de flujo (observar el cambio de flujo con ajuste del ángulo).
22. Cambie el beneficio ER válvula (azul) una vez tampón está casi terminado (200 ml). El líquido debe estar en ejecución claro. La limpieza del hígado

es un indicador de una buena perfusión. El hígado debe ser clara en este punto. Indique el tiempo para sus registros.

23. Temblores de fijación deben ser observadas en cuestión de segundos, lo que debería ser considerado como el verdadero tiempo de la fijación. Indique el tiempo para sus registros.
24. La presión puede ser gradualmente aumentar hasta un máximo de 130 mm de Hg 2 para mantener un caudal constante.
25. Cierre la válvula de salida una vez que el fijador está casi terminado. Indique que termina el tiempo para sus registros.
26. La rata debe ser rígida en esta etapa.
27. El paraformaldehído se ha de recoger y almacenar para su eliminación de acuerdo a los reglamentos de su institución.