



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Evaluación de la expresión de neuropéptido Y en un modelo básico de rata
parkinsoniana sometida a hipoxia crónica

Tesis para optar el título de Licenciado en Biología

Oscar Javier Núñez Marca

LIMA – PERÚ

2018

ASESOR:

Dr. Luis Ángel Aguilar Mendoza

JURADO CALIFICADOR:

Dr. Edward Málaga-Trillo

Dra. Cristina Guerra Giraldez

Mg. José Luis Macarlupú

EL presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurociencia y Comportamiento, localizado en los Laboratorios de Investigación y Desarrollo – LID, de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, bajo la dirección del Dr. Luis Ángel Aguilar Mendoza y con financiamiento de “Estudio Básico de Reparación y Mejora de Memoria y Aprendizaje por Frecuencia de Ritmo Theta en Neurodegeneración, Daño Cerebral y Alzheimer”.

Código: CONV-000116-2015-FONDECYT-DE. El estudio fue registrado bajo el código de SIDISI 61610 y aprobado por la oficina de la DUICT.

Resumen:

Aproximadamente, el 33% de la población peruana vive en altura, sometida a una condición de hipoxia crónica que podría exacerbar la enfermedad de Parkinson y un mecanismo posible de neuroprotección sería la expresión del neuropéptido Y. Los neuropéptidos, son péptidos sintetizados en las células nerviosas, a nivel del sistema nervioso central y periférico. El uso del modelo animal parkinsoniano por la inyección unilateral de 6-hidroxidopamina a nivel del encéfalo de la rata, produce muerte neuronal a nivel de la sustancia negra, donde existe una población neuronal mayoritariamente dopaminérgica, emulando la característica principal de la enfermedad de Parkinson. Con el fin de entender una posible explicación del rol neuroprotector del neuropéptido Y, se evaluó su expresión mediante inmunohistoquímica a partir de cortes tipo Charcot en cerebros de ratas parkinsonianas y ratas controles sometidas a hipoxia crónica. El modelo de rata parkinsoniana sometido a hipoxia crónica fue confirmado a nivel comportamental, mediante el test de rotación obteniéndose mayor número de vueltas contralaterales a la lesión en las ratas Parkinsonianas. A nivel fisiológico los animales mostraron una diferencia de hematocrito de 20,72 % después de ser expuestos a una condición de hipoxia crónica (PB = 433 Torr; PIO₂ = 90,9 Torr) por 3 semanas. A nivel neurohistológico se evaluó neuronas inmunoreactivas para tiroxinahidroxilasa mediante el programa ImageJ y se encontró mayor número de neuronas dopaminérgicas muertas en el hemisferio operado del grupo Parkinson comparado con los demás hemisferios. La observación promedio del conteo de neuronas inmunoreactivas para neuropéptido Y a nivel neurohistológico, fueron observadas en diferentes estructuras cerebrales del encéfalo de la rata. Se concluye que el aumento de la expresión del neuropéptido Y podría actuar como un sistema compensatorio frente a la enfermedad de Parkinson en condiciones de hipoxia crónica.

Palabras claves

Enfermedad de Parkinson, neuropéptido Y, hipoxia, tirosina hidroxilasa, sustancia negra

Abstract:

Approximately 33% of the Peruvian population lives in height, subjected to a condition of chronic hypoxia that could exacerbate Parkinson's disease and a possible mechanism of neuroprotection would be the expression of neuropeptide Y. Neuropeptides are peptides synthesized in nerve cells, at the level of the central and peripheral nervous system. The use of the parkinsonian animal model by the unilateral injection of 6-hydroxydopamine in the brain of the rat, produces neuronal death at the level of the substantia nigra, where there is a predominantly dopaminergic neuronal population, emulating the main characteristic of Parkinson's disease. In order to understand a possible explanation of the neuroprotective role of the neuropeptide Y, its expression was evaluated by means of immunohistochemistry from Charcot-type cuts in brains of parkinsonian rats and control rats subjected to chronic hypoxia. The parkinsonian rat model subjected to chronic hypoxia was confirmed at the behavioral level, using the rotation test, obtaining a greater number of contralateral turns to the lesion in Parkinson's rats. At the physiological level, the animals showed a difference in hematocrit of 20.72% after being exposed to a condition of chronic hypoxia (PB = 433 Torr; PIO₂ = 90.9 Torr) for 3 weeks. At the neurohistological level, immunoreactive neurons for tyrosine hydroxylase were evaluated by the ImageJ program and a greater number of dead dopaminergic neurons were found in the operated hemisphere of the Parkinson group compared to the other hemispheres. The average observation of the count of immunoreactive neurons for neuropeptide Y and neurohistological level, were observed in different brain structures of the rat brain. It is concluded that the increase in the expression of neuropeptide Y could act as a compensatory system against Parkinson's disease in conditions of chronic hypoxia.

Keywords

Parkinson's disease, neuropeptide Y, hypoxia, tyrosine hydroxylase, substantia nigra

Leyenda

núcleo ventral tuberomamilar (VTM)

área hipotalámica lateral (LH)

núcleo hipotalámico ventromedial central (VMHC)

núcleo hipotalámico ventromedial ventrolateral (VMHVL)

área hipotalámico posterior (PH)

haz del prosencéfalo mediano(mfb)

núcleo rojo (R)

núcleo epilemniscal (ELm)

tracto mamilar principal (pm)

núcleo mamilar medial (MMn)

núcleo premamilar dorsal (PMD)

núcleo supramamilar (SuM)

área tegmental ventral (VTA)

pedúnculo mamilar (mp)

sustancia negra pars reticular (SNR)

núcleo interfascicular (IF)

lemnisco medial (ml)

sustancia negra parte medial (SMM)

núcleo rojo parte parvicelular (RPC)

núcleo rojo parte magnocelular (RMC)

núcleo interpenducular dorsomedial (IPDM)

núcleo interpenducular rostral (IPR)

núcleo pararubral (PaR)

pedúnculo cerebral parte basal (cp)

núcleo parasubtalámico (PSTh)

tereta (Te)

6-hidróxidopamina (6-OHDA)

neuropéptido Y (NPY)

solución fosfato salina (PBS)

sustancia negra (SN)

Presión Inspirada de Oxígeno (PI_{O_2})

Presión barométrica (PB)

dopamina (DA)

tirosina hidroxilasa (TH)

Hemoglobina (Hb)

N-metil-D-aspartato (NMDA)

ácido γ -aminobutírico (GABA)

ÍNDICE

	Pág.
I. Introducción.....	1 - 4
II. Hipótesis General.....	5
III. Objetivos.....	6
IV. Materiales y Método.....	7 – 15
IV.i Animales.....	7
IV.ii Guía de ruta.....	7
IV.iii Lesión.....	8 – 9
IV.iv Hipoxia crónica.....	10
IV.v Test de rotación.....	11
IV.vi Perfusión.....	11 – 12
IV.vii Inmunohistoquímica.....	13 – 14
IV.viii Densitometría óptica para tiroxinahidroxilasa.....	14
IV.vix Reconstrucción de imágenes.....	15
V. Resultados.....	16 - 48
VI. Discusión.....	49 - 52
VII. Conclusiones.....	52
VIII. Perspectivas.....	52
IX. Referencia bibliográfica.....	53 - 59

I. INTRODUCCIÓN

Aproximadamente, el 33 % de la población peruana vive en altura sobre los 2 000 metros sobre el nivel del mar (msnm) (1). Además, más de 4 millones de habitantes viven entre 3 000 y 4 500 msnm (1). Por tanto, esta población vive en condiciones de hipoxia crónica. Manifestando hipoxemia y modificaciones en el comportamiento del sistema respiratorio, cardiovascular, renal y neuroendocrino para contrarrestar la baja presión parcial de oxígeno (O_2) a nivel arterial. Algunas manifestaciones fisiológicas en condiciones de hipoxia crónica son: aumento de hematocrito, concentración de hemoglobina y la presión arterial pulmonar (2). La hipoxia crónica a nivel del sistema nervioso central conduce a un aumento de flujo sanguíneo cerebral y capacidad de transporte de oxígeno (3). En condiciones extremas de hipoxia existe un aumento del flujo de Ca^{2+} a través de los receptores NMDA induciendo a la apoptosis neuronal (4,5).

Además de los mecanismos fisiológicos mencionados anteriormente como respuesta a una condición de hipoxia crónica (2). Los efectos de la hipoxia han sido estudiados en animales de laboratorio, sometidos a hipoxia crónica a una presión barométrica de 450 Torr por 14 y 21 días, encontrando un aumento en la mejor captación de dopamina (DA) y alteraciones mitocondriales a nivel de corteza cerebral respectivamente (6,7). Otros trabajos en ratas sometidas a hipoxia moderada (10 % de oxígeno) durante 3 semanas y 9 % de oxígeno por 8 horas observaron alteraciones en neuropéptidos como angiotensina, substancia P, Colecistoquinina y neuropéptido Y (8,9). La hipoxia también juega un rol importante en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a nivel mitocondrial, a través del Factor Inducible por la Hipoxia-1 (10,11). Los ROS cumplen un rol importante en procesos fisiológicos vitales como en cascadas de señalización y regulación celular (12). El

desequilibrio (falta o exceso) de los ROS está relacionado a trastornos autoinmunes, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (13-15).

Se postula que los ROS son factores desencadenantes de las enfermedades neurodegenerativas (16). Sin embargo, existen otros factores involucrados como los procesos inflamatorios, déficits epigenéticos y transcripcionales, mutaciones genéticas y agregación de proteínas (17-19). Las enfermedades neurodegenerativas, son un grupo heterogéneo de enfermedades, que pueden afectar a nivel cognitivo, sensorial y motor como por ejemplo el habla, pensamiento, equilibrio, coordinación de movimientos finos entre otras características; compartiendo como característica en común la muerte progresiva neuronal. Además, estas enfermedades tienen una etiología genética y/o ambiental, pudiendo ser multifactoriales como en la enfermedad de Parkinson (EP) (20).

La prevalencia de la EP varía ampliamente en el mundo, desde 14 por 100 000 habitantes en China, 328 por 100 000 habitantes en India, 108 a 257 por 100 000 habitantes en Europa y 658 por 100 000 habitantes en Argentina (21-24). En el Perú no existen trabajos completos de prevalencia de la EP, excepto el estudio en Ulcumayo, Junín en el 2008 a 3 600 msnm (493 Torr aproximadamente), el cual determinó una prevalencia de 6,71 por 1 000 habitantes mayores de 40 años (25). Sumado a esto, la Oficina de estadística del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN) ha reportado un aumento en el número de pacientes con EP desde el año 2006 (26). Además, la casuística observada por INCN incluye pacientes de todo el Perú (26). Por otro lado, los datos obtenidos de la prevalencia de pacientes con EP del estudio en Ulcumayo el 2008, permite observar una población que nació y reside a una altura de 3 600 msnm, preguntándonos si existe un factor neuroprotector contra la EP en dicha población.

La EP se caracteriza por la acumulación y agregación de proteínas mal plegadas de alfa-sinucleína, conllevando a la muerte de neuronas dopaminérgicas a nivel de la sustancia negra pars compacta y produciendo signos clínicos motores como bradicinesia, temblor, rigidez e inestabilidad en la postura (27). Presentando también síntomas no motores tales como déficit olfativo, disfunción autonómica, déficit cognitivo, desordenes de sueño y depresión (28-31). Estudios realizados en cerebros de pacientes con la EP, encontraron alteraciones a nivel de la cadena respiratoria y mutaciones en el ADN mitocondrial (32). También se ha reportado la acumulación del radical hidroxilo debido a una disminución de glutatión, así como una reducción de este último y un aumento de los niveles de glutatión oxidado (33,34). Otros estudios en pacientes con la EP han demostrado que tienen una respuesta hipóxica subnormales, acompañado por una baja percepción a disnea (35).

El uso de modelos animales de laboratorio más usados hasta la fecha para comprender la EP tiene como base la lesión dopaminérgica unilateral inducida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) produciendo muerte neuronal a nivel de la sustancia negra, donde existe una población neuronal mayoritariamente dopaminérgica, emulando la característica principal de la EP (36,37). La inyección unilateral de 6-OHDA en un modelo animal como la rata (rata parkinsoniana) produce un comportamiento de rotación alrededor de su mismo eje, por la estimulación de apomorfina. A nivel neurohistopatológico se observa pérdida de: niveles de DA estriatal, fibras y neuronas inmunoreactivas para tirosinahidroxilasa (TH) a nivel de la sustancia negra (38). Además, este modelo permite el uso de nuevos fármacos y terapia preclínica contra la EP (38). La disminución de los niveles DA es causada por el decaimiento de la enzima TH, limitante de la velocidad de la biosíntesis de catecolaminas y encargada de catalizar la conversión el aminoácido L-tirosina a dihidroxifenilalanina (precursor de DA) (39).

Estudios anatómicos y funcionales revelaron que el NPY interactúa con el sistema dopaminérgico, existiendo proyecciones entre las interneuronas estriatales NPY y los dos sistemas neuronales dopaminérgicos nigroestriales y corticostriatal (40). El NPY es una sustancia neuroactiva de 36 aminoácidos, ampliamente distribuido a nivel de sistema nervioso central (SNC) como en el hipotálamo, amígdala, locus coeruleus y corteza cerebral (41). El NPY es sintetizado principalmente en neuronas GABAérgicas, cumpliendo funciones de neuromodulador y/o neurohormona. Entre las funciones se ha documentado la ingesta de alimentos, sueño, formación de huesos, dolor, depresión, presión arterial, actividad convulsiva, ansiedad, memoria, desarrollo, maduración del SNC y neuroprotección (42). Además, el NPY está involucrado en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas (42-49).

A partir de la observación de la prevalencia de la EP, en la población de Ulcumayo que vive y reside a una altura de 3 600 msnm. Nos preguntamos si la condición de hipoxia crónica podría ser un factor de exacerbación en la EP y como respuesta a dicha condición, el NPY podría ser un factor neuroprotector contra la EP. Por lo tanto, el presente estudio utilizó el modelo de rata parkinsoniana sometida a hipoxia crónica y su evaluación a nivel comportamental por test de rotación, fisiológico por porcentaje de hematocrito y neurohistológico mediante densitometría óptica para poder entender el rol que juega la expresión del neuropéptido Y a nivel neurohistológico.

II. Hipótesis General

Existe un aumento en la expresión del Neuropeptido Y a nivel del encéfalo de la rata parkinsoniana sometida a hipoxia crónica, como un posible mecanismo neuroprotector frente a la enfermedad de Parkinson.

III. Objetivos

General

- Evaluar la expresión de Neuropeptido Y en un modelo de rata parkinsoniana sometida a hipoxia crónica a través de inmunohistoquímica.

Específicos

- Evaluar por medio de test de rotación la lesión motora del modelo de rata parkinsoniana sometida a hipoxia crónica luego de la aplicación de apomorfina vía intramuscular.
- Evaluar semicuantitativamente por densitometría óptica, los niveles de la enzima tiroxinahidroxilasa en la sustancia negra en cerebros de ratas parkinsonianas sometidas a hipoxia crónica.
- Evaluar la expresión de neuropeptido Y en cerebros de ratas parkinsonianas sometidas a una condición de hipoxia crónica.

IV. Materiales y Métodos

IV.i Animales

Se trabajó con 14 ratas machos de la cepa Holtzman, de 3 meses de vida con un peso promedio de 240-270 g. Los cuales fueron separados en 2 grupos de 7 ratas (estudios anteriores utilizaron 6 ratas por grupo) (37). Los animales fueron acondicionados en jaulas con condiciones higiénicas, un ambiente controlado de ciclo luz / oscuridad de 12 horas y alimentación ad libitum dentro del bioterio de las instalaciones del LID (Laboratorios de Investigación y Desarrollo) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. El estudio fue registrado bajo el código de SIDISI 61610 y aprobado por la oficina de la Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT).

IV.ii Guía de ruta

Se diseñó un cronograma para organizar los experimentos y pruebas de los animales tratados. (Figura 1)

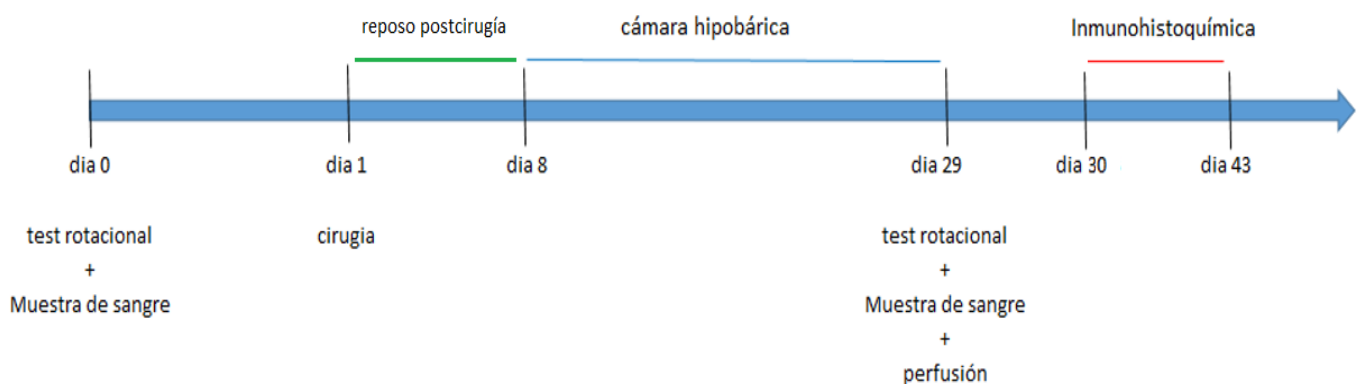


Figura 1: La presente figura muestra los días donde se realizaron las pruebas y experimentos. Donde el día 0 representa el inicio y las condiciones iniciales.

IV.iii Lesión

En el día 1, se preparó las 14 ratas para la cirugía (en el hemisferio derecho). Primero fueron anestesiadas con Ketamina 100 mg/Kg, Xilacina 5 mg/Kg y Atropina 0,4 mg/kg intraperitoneal. También se usó Lidocaína como anestesia local a nivel del canal auditivo externo para reducir el dolor producido por la manipulación del animal en el aparato estereotáxico (Figura 2). Los animales fueron divididos en dos grupos de 7 ratas cada uno: grupo Sham y grupo Parkinson. El grupo Sham, fue definido como el grupo al cual se inyectó, mediante una jeringa Hamilton, 5 μ L de solución vehículo (buffer fosfato salino(PBS) con 0,2 % de ácido ascórbico). Al grupo Parkinson se inyectó 6-hidróxidopamina (6-OHDA) con solución vehículo (30 μ g/5 μ L) (Figura 3). Los 2 grupos fueron tratados a nivel del fascículo prosencefálico medial (MFB), según el atlas de coordenadas estereotáxica de cerebro de ratas de Paxinos – Watson, cuarta edición (50). Las coordenadas usadas para la generación del modelo animal parkinsoniano fue anteroposterior (AP) -2,00 mm, Lateral-dorsal (LD) +2,00 mm, dorsoventral (DV) -8,00 mm (51) (Figura 4). Luego de la cirugía, los animales fueron suturados mediante una aguja de cirugía añadiendo sulfadiazina de plata al 1 % para evitar futuras infecciones y posteriormente dejadas en jaulas para su recuperación por una semana del día 1 a 8 (Figura 1) antes de ser introducidas a la cámara hipobárica.



Figura 2: La presente figura muestra el aparato estereotáxico, el cual tiene una serie de tornillos y barras para sostener la cabeza del animal y colocarla en una posición fija con un sistema de coordenadas.



Figura 3: La presente figura muestra un animal anestesiado y sujeto en el aparato estereotáxico para la inyección de 6-hidróxidopamina.

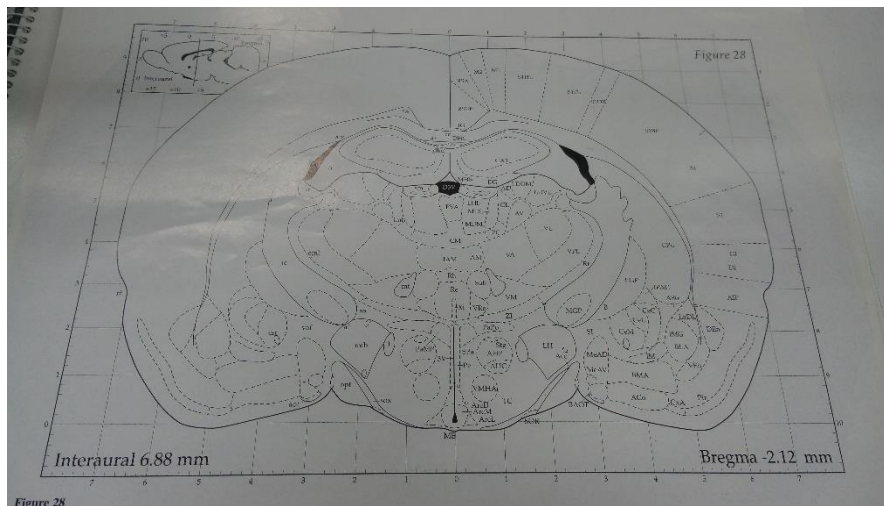


Figura 4: La presente figura muestra el libro de coordenadas estereotáxica para cerebro de rata de Paxinos y Watson cuarta edición para ubicar el sitio de inyección de la sustancia vehículo y de 6-hidróxidopamina en las coordenadas (AP) -2,00 mm, Lateral-dorsal (LD) +2,00 mm y dorsoventral (DV) -8,00 mm.

IV.iv Hipoxia crónica

Las 14 ratas fueron sometidas por 3 semanas (día 8 a 29) (Figura 1) a condiciones de hipoxia crónica mediante el uso de una cámara hipobárica, la cual es una cámara conectada a una motobomba capaz de extraer el aire dentro de esta y generar un ambiente parcial de vacío (Figura 5). Los animales estuvieron a una Presión Barométrica (PB) = 433 Torr y una Presión Inspirada de Oxígeno (PI_{O_2}) = 90,9 Torr (Figura 6) (52). Durante el experimento se tomaron las medidas necesarias para evitar el dolor y estrés innecesario de los animales, como el monitoreo diario de salud y eutanasia en caso necesario. También se tomaron muestras de sangre para determinar el porcentaje de hematocrito antes (día 0) y después (día 29) de la exposición a la cámara hipobárica (Figura 1)



Figura 5: La presente figura muestra la cámara hipobárica donde se alojaron los animales por 3 semanas.

Figura 6: La presente figura muestra las jaulas de los animales dentro de la cámara hipobárica y el monitoreo diario de estos.



IV.v Test de rotación

Los 2 grupos experimentales (Sham y Parkinson) fueron evaluados antes de la cirugía (precirugía) (día 0) y del sacrificio (presacrificio) (día 29), mediante el test de rotación. Ambos grupos fueron inyectados con apomorfina 0,5 mg/kg (Sigma Chemical Co.) disuelto en NaCl al 0,9 % por vía intramuscular. Posteriormente los animales fueron dejados por 5 min para su aclimatación y se registró por 5 min el número total de rotaciones ipsilateral y contralateral a la lesión unilateral selectiva. (figura 7) (51).



Figura 7: La presente figura muestra una rata dentro en un recipiente cilíndrico después de la inyección con apomorfina. Se observó que la rata daba rotaciones ipsilateral y contralateral a la lesión.

IV.vi Perfusión

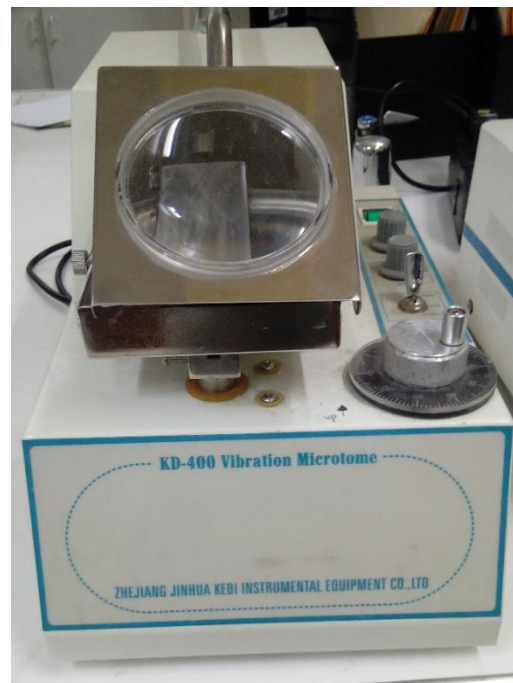
Acabado la prueba de rotación y extracción de sangre el día 29 (Figura 1). Los animales fueron anestesiados mediante pentobarbital sódico 90 mg/Kg intraperitoneal, para ser perfundidos (introducción lenta y continua de un líquido a través del corazón). Se utilizó un sistema de inyección de solución de lavado (solución salina) 400 mL y solución fijadora (paraformaldehído al 4 %) 300 mL, los cuales estaban acoplados a una cánula calibre 16 con

punta roma. Se introdujo la cánula en el corazón, ingresando por el ventrículo hasta llegar a nivel de la arteria aorta y se liberó (cortó) la aurícula derecha para la eliminación de la sangre (Figura 8). Posteriormente los cerebros de los animales fueron extraídos y mantenidos en paraformaldehído al 4 % por 24 horas a 4 °C para su fijación. Las muestras fueron preservadas en PBS y luego cortadas mediante un vibratomo (KD-400 vibration Microtome) (Figura 9), obteniéndose cortes neurohistológico tipo Charcot (coronales) de 50 μ m. Para la conservación de algunos cortes coronales se usó pizadinamida al 0,01 % en PBS para su posterior utilización.



Figura 8: La presente figura muestra la perfusión de una rata para la posterior extracción del cerebro.

Figura 9: La presente figura muestra el aparato vibratomo (KD-400 vibration Microtome) usado para cortes coronales de tejidos a 50 μ m.



IV.vii Inmunohistoquímica

Los cortes coronales de 50 μm obtenidos a partir de los cerebros tratados de ambos grupos (Sham y Parkinson) fueron procesados del día 30 a 43 (Figura 1). Los cortes coronales fueron 3 veces lavados con PBS en agitación por 10 min. Luego fueron trasladados a una placa con pocillos. Se añadió 2 ml de solución 1 (7 mL H_2O_2 al 30 % + 13 mL metanol) eliminando la peroxidasa endógena y dejados en oscuridad por 30 min a temperatura ambiente (agitando 1 a 2 min cada 10 min). Finalizado el tiempo, los cortes coronales fueron 3 veces lavados con PBS en agitación por 10 min. Y dejados en solución mezcla 2 % (49 mL PBS + 1 mL de suero de caballo + 100 μL Triton 100) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

Se preparó 2 soluciones con anticuerpo primario A y B. El anticuerpo primario A: 5 mL de solución mezcla 2 % + 5 μL anticuerpo policlonal IgG anti-tiroxinahidroxilasa hecho en conejo dilución 1/1000 (Marca Merck, código AB152) y anticuerpo primario B: 5 mL de solución mezcla 2 % + 2 μL anticuerpo policlonal IgG anti-neuropeptido Y hecho en conejo dilución 1/2500 (Marca Abcam, código ab30914). Se agregó 1 mL de anticuerpo primario diferente a cada pocillo que contenían los cortes coronales y fueron dejados por 90 min a temperatura ambiente en agitación para ser luego incubados por 19 horas a 4 °C

Finalizado las 19 horas, los cortes coronales fueron 3 veces lavados con PBS en agitación por 10 min. Luego dejadas en solución con anticuerpo secundario biotinilado hecho en conejo (Marca Merck, código AB-1000) 1:200 (10 mL solución mezcla 2 % + 50 μL anticuerpo secundario) durante 60 min a temperatura ambiente en agitación. Finalizado el tiempo, los cortes coronales fueron 3 veces lavados con PBS nuevamente en agitación por 10 min y fue agregado el complejo ABC (solución mezcla 2 % + 2 gotas de A + 2 gotas B) (Vector Lab), durante 60 min a temperatura ambiente en agitación.

Finalmente, los cortes coronales fueron 3 veces lavados con PBS en agitación por 10 min y revelados con DAB (diaminobencidina) (Vector Lab) durante 1 min a temperatura ambiente y en oscuridad. El material usado en el revelado con DAB fue inactivado con lejía y luego descartado.

Los cortes coronales revelados fueron adheridos a laminas portaobjetos y secadas por 24 horas a temperatura ambiente. Tanto las láminas neurohistológicas inmunoreactivas para TH y NPY fueron deshidratadas mediante alcohol 100 %, seguidas de xilol 100 % para ser cubiertas con laminilla.

IV.viii Densitometría óptica para tiroxinahidroxilasa

Las láminas neurohistológicas inmunoreactivas para TH de los 2 grupos (grupo Sham y Parkinson) fueron leídas mediante un microscopio Leica DM20 a 2.5X para su posterior fotografía, mediante el uso de una cámara digital (Marca Leica) (53). Se obtuvieron campos fotográficos de los cortes coronales de cada hemisferio (derecho e izquierdo) de cada animal y se calculó la densitometría óptica a nivel de la sustancia negra usando el programa ImageJ. Se generaron 4 grupos (Parkinson hemisferio derecho, Parkinson hemisferio izquierdo, Sham hemisferio derecho, y Sham hemisferio izquierdo) y se compararon las medias de las densitometrías ópticas de los grupos por el test de ANOVA Tukey, mediante el programa STATA 14.

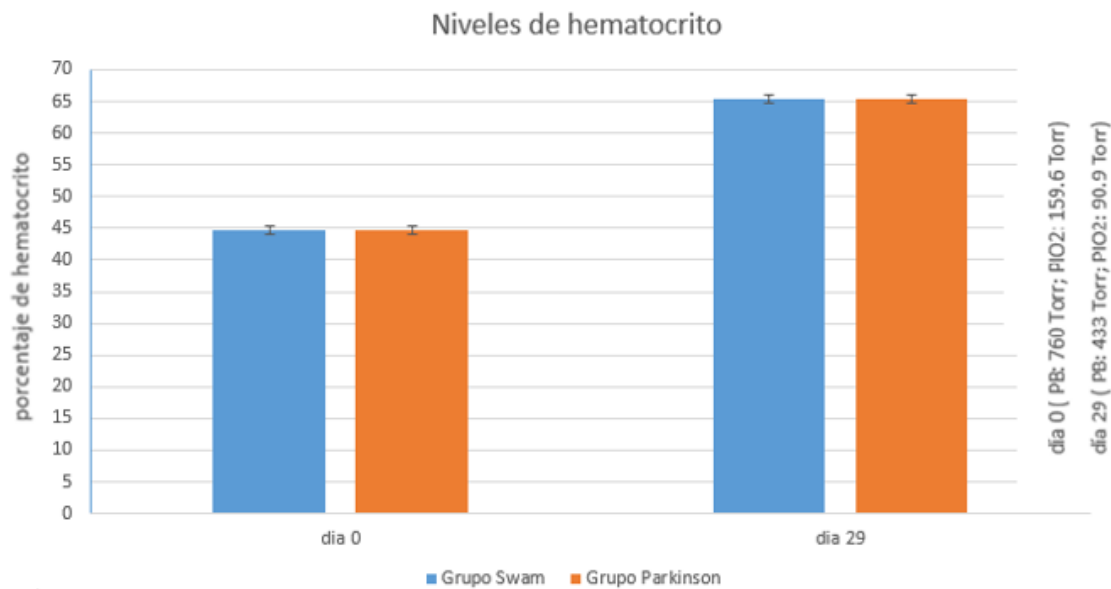
IV.ix Reconstrucción de Imágenes

Las estructuras anatómicas en las láminas neurohistológicas inmunoreactivas para NPY fueron identificadas mediante un microscopio Leica DM20 a 2.5X, usando el libro de coordenadas estereotáxica para cerebro de rata de Paxinos y Watson cuarta edición (50). Luego se procedió a contar las neuronas inmunoreactivas en cada lámina neurohistológica, la observación promedio del conteo de neuronas inmunoreactivas para NPY y generando una imagen por diferente nivel anteroposterior de bregma.

V. Resultados

Porcentaje de Hematocrito de ratas sometidas a hipoxia crónica

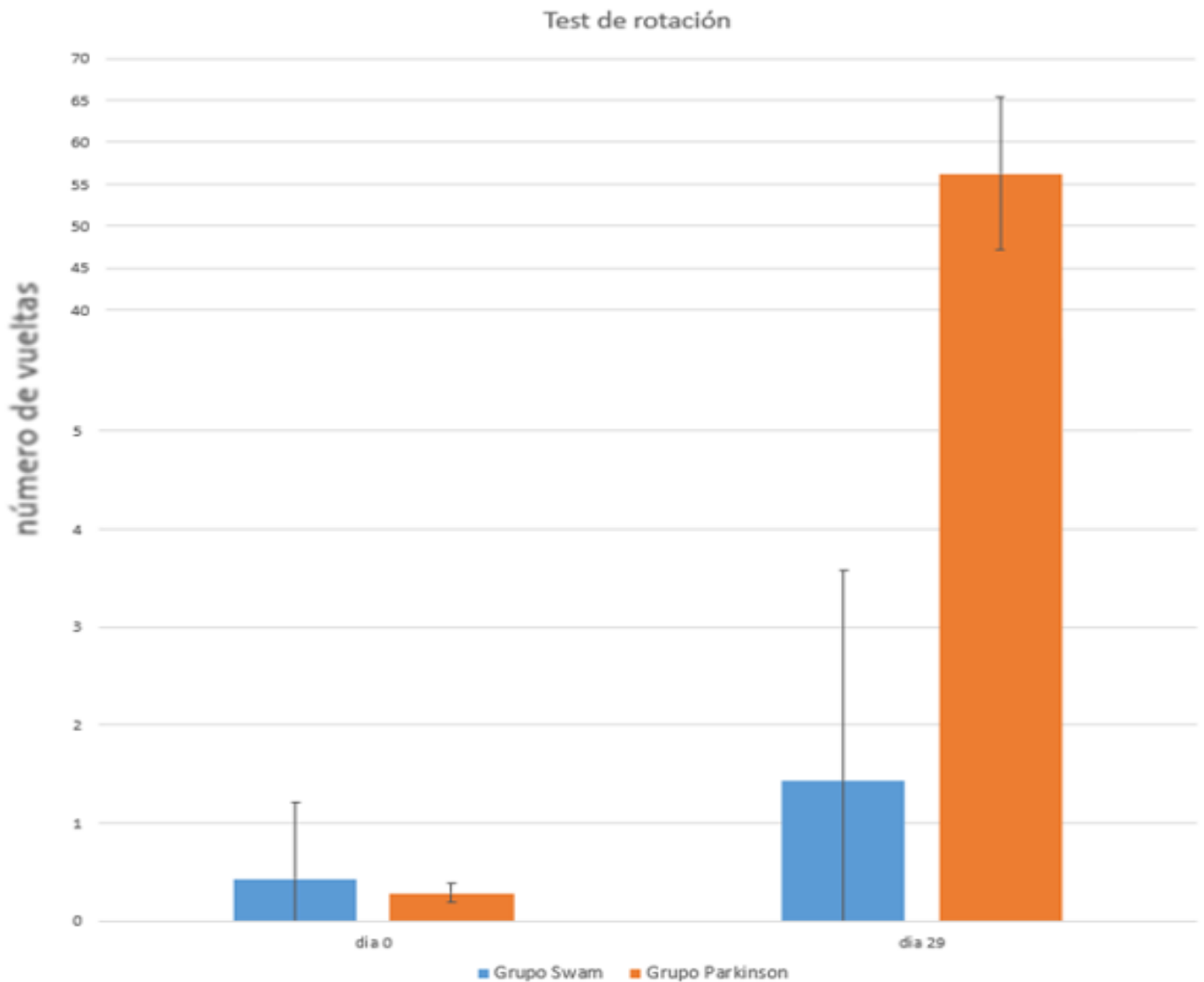
En las 14 ratas machos que fueron sometidos a hipoxia crónica (PB = 433 Torr ; PI_{O_2} = 90,9 Torr) mediante el uso de la cámara hipobárica por 3 semanas (día 8 a 29), se observó un aumento del porcentaje de hematocrito (Gráfica 1). El valor promedio del porcentaje de hematocrito para ambos grupos antes de la cirugía (día 0) fue 44,71 %, mientras que el valor promedio del porcentaje de hematocrito antes del sacrificio (día 29) fue 65,43 %.



Gráfica 1: La presente grafica de barras muestra el promedio del porcentaje de hematocrito el día 0 (PB = 760 Torr; PI_{O_2} = 159.6 Torr) y 29 (PB = 433 Torr; PI_{O_2} = 90,9 Torr) para ambos grupos (grupo Parkinson y Sham). El promedio del porcentaje de hematocrito el día 0 para los grupos Swam y Parkinson son 44,71 con una σ de 0,76. Mientras el promedio del porcentaje de hematocrito el día 29 para el grupo Sham es 65,43 con una σ de 0,98 y el grupo Parkinson es 65,43 con una σ de 0,53. Se observa que el promedio del porcentaje de hematocrito en ambos grupos es mayor el día 29 comparado con el día 0.

Test de rotación

En el experimento realizado en los dos grupos (Parkinson y Sham), se observó un mayor número de vueltas en el grupo Parkinson después de haber sido inyectado con apomorfina vía intramuscular el día 29 comparado con el grupo Sham (Gráfica 2). Los 2 grupos mostraron reducido o ausente número de vueltas después de ser inyectados con apomorfina vía intramuscular el día 0 (Gráfica 2). El comportamiento de los animales con lesión unilateral selectiva inducido por apomorfina, un agonista dopaminérgico, presentó una conducta rotatoria ipsilateral a la lesión, producido por el desequilibrio de dopamina entre el estriado homolateral y contralateral a la lesión dopaminérgica. Por consiguiente, un mayor número de vueltas es proporcional a una mayor muerte de neuronas dopaminérgicas a nivel de la sustancia negra.



Gráfica 2: La presente gráfica de barras muestra el promedio del número de vueltas de los 2 grupos (Parkinson y Sham) producido por la aplicación de apomorfina vía intramuscular el día 0 y 29. El promedio del número de vueltas el día 0 para el grupo Sham es 0,43 con una desviación estándar(σ) de 0,79 y para el grupo Parkinson es 0,29 con una σ de 0,49. Mientras que el promedio del número de vueltas el día 29 para los grupos Sham es 1,43 con una σ de 2,15 y el grupo Parkinson es 56,29 con una σ de 8,99.

Densitometría óptica para tiroxinahidroxilasa

En el presente trabajo el 6-OHDA fue inyectado en la posición (AP) -2,00 mm, Lateral-dorsal (LD) +2,00 mm, dorsoventral (DV) -8,00 mm, produciendo una lesión unilateral a nivel precortical. La aplicación de 6-OHDA destruye neuronas adrenérgicas a nivel de los ganglios simpáticos. A nivel del sistema nervioso central el 6-OHDA destruye neuronas catecolaminérgicas, a nivel de la sustancia negra, donde existe una población neuronal mayoritariamente dopaminérgica (36). La neurotoxicidad de 6-OHDA es mediada por su capacidad de inhibir el complejo-I, conduciendo a la disminución del ATP y generando especies reactivas de oxígeno. Además, la 6-OHDA también inhibe la enzima tirosina hidroxilasa (37), mediado también por receptores de NMDA en la neurodegeneración (54). Otros mecanismos por los cuales actúa el 6-OHDA es la reducción de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa y disminución de glutatión (GSH) (55). Trabajos anteriores mencionan que el 6-OHDA puede ser inyectado directamente a nivel de la sustancia negra, generando un modelo experimental animal con la enfermedad de Parkinson agudo. Para el presente trabajo se usó las coordenadas mencionadas anteriormente para generar un modelo experimental animal con la enfermedad de Parkinson crónico (Figura 4) (51,56).

De los cuatro campos fotográficos de los cortes coronales de neuronas inmunoreactivas para tiroxinahidroxilasa a nivel de la sustancia negra obtenidos de los 4 grupos generados (Parkinson hemisferio derecho, Parkinson hemisferio izquierdo, Sham hemisferio derecho, y Sham hemisferio izquierdo), se observó que el grupo Parkinson hemisferio derecho había menos neuronas inmunoreactivas para tiroxinahidroxilasa a nivel de la sustancia negra comparado con los demás grupos (Figuras del 10 al 13).

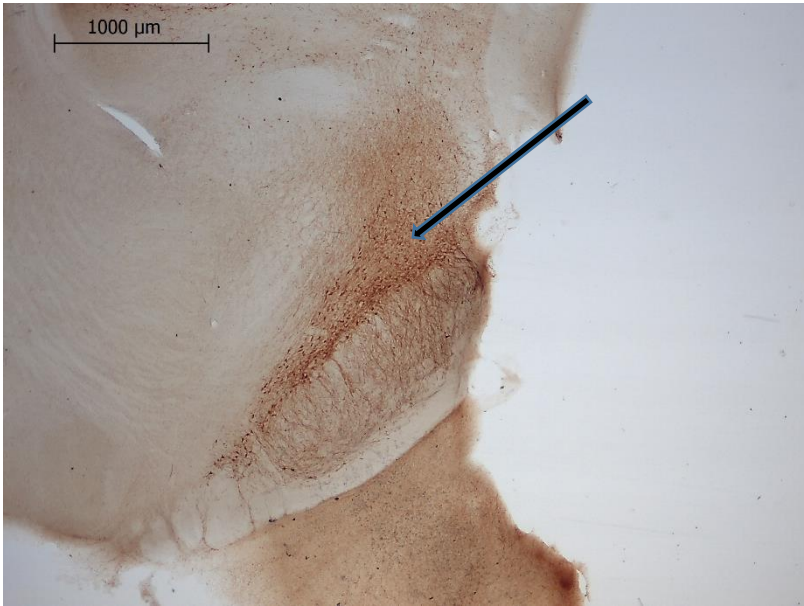


Figura 10: La presente figura muestra un campo fotográfico de un corte coronal de neuronas inmunoreactivas para tiroxinahidroxilasa a nivel de la sustancia negra del hemisferio izquierdo de una rata parkinsoniana. Tomado a 2.5X mediante un microscopio Leica DM20. La flecha indica la sustancia negra (SN).

Figura 11: La presente figura muestra un campo fotográfico de un corte coronal de neuronas inmunoreactivas para tiroxinahidroxilasa a nivel de la sustancia negra del hemisferio derecho de una rata parkinsoniana. Tomado a 2.5X mediante un microscopio Leica DM20. La flecha indica la sustancia negra (SN).





Figura 12: La presente figura muestra un campo fotográfico de un corte coronal de neuronas inmunoreactivas para tiroxinahidroxilasa a nivel de la sustancia negra del hemisferio izquierdo de una rata Sham. Tomado a 2.5X mediante un microscopio Leica DM20. La flecha indica la sustancia negra (SN).

Figura 13: La presente figura muestra un campo fotográfico de un corte coronal de neuronas inmunoreactivas para tiroxinahidroxilasa a nivel de la sustancia negra del hemisferio derecho de una rata Sham. Tomado a 2.5X mediante un microscopio Leica DM20. La flecha indica la sustancia negra (SN).



Los valores obtenidos de densitometría óptica de los 4 grupos mediante el programa ImageJ (Tabla 1) fueron comparados usando las medias de densitometría óptica mediante ANOVA. Se determinó que al menos una de las medias de densitometría óptica de un grupo era diferente (Tabla 2 y Tabla 3). Luego se determinó mediante el test Tukey, que el grupo Parkinson hemisferio derecho mostraba una diferencia significativa comparada con los demás grupos (Tabla 4).

Tabla 1: El presente cuadro muestra los valores de densitometría óptica de los campos fotográficos de los cortes coronales de neuronas inmunoreactivas para tiroxinahidroxilasa a nivel de la sustancia negra de los 4 grupos generados (Parkinson hemisferio derecho, Parkinson hemisferio izquierdo, Sham hemisferio derecho, y Sham hemisferio izquierdo) obtenidos por el programa ImageJ.

Tabla 1: Densitometría óptica de Tiroxinahidroxilasa usando ImageJ

Parkinson hemisferio derecho	Parkinson hemisferio izquierdo	Sham hemisferio derecho	Sham hemisferio izquierdo
0,227 528 541	0,309 493 106	0,301 299 778	0,351 635 553
0,184 603 396	0,280 627 617	0,278 384 733	0,301 689 602
0,184 603 396	0,280 627 617	0,272 400 163	0,362 956 256
0,207 349 358	0,278 525 878	0,166 313 907	0,169 537 776
0,233 790 287	0,281 842 417	0,275 219 600	0,338 979 990
0,268 332 174	0,309 363 547	0,266 857 664	0,282 208 812

0,246 188 169	0,288 871 966	0,347 412 411	0,352 406 198
0,187 873 044	0,273 715 343	0,380 425 547	0,385 317 233
0,208 430 334	0,254 328 303	0,347 749 160	0,367 454 007
0,176 597 923	0,232 875 592	0,2974 233 53	0,331 667 511
0,175 438 514	0,239 432 776	0,174 519 788	0,277 718 262
0,211 804 308	0,258 111 480	0,284 238 222	0,305 945 722
0,299 429 400	0,364 915 167	0,301 509 482	0,328 512 611
0,193 441 963	0,254 090 926	0,240 440 537	0,248 524 996
0,169 139 595	0,264 812 665		
0,223 267 648	0,317 011 096		
0,232 737 645	0,293 216 054		

Tabla 2: La presente tabla muestra el Test Shapiro–Wilk para los 4 grupos (Parkinson hemisferio derecho, Parkinson hemisferio izquierdo, Sham hemisferio derecho, y Sham hemisferio izquierdo). En los 4 grupos el valor de p no fue menor a 0,05 ,por lo tanto, no se rechazó H_0 , los datos tienen una distribución normal. El test Shapiro–Wilk fue obtenido mediante el programa STATA 14.

```
-> tratamiento = Parkinsoncirugia
```

```
Shapiro-Wilk W test for normal data
```

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
densidadop~a	17	0.92949	1.490	0.795	0.21341

```
-> tratamiento = Parkinsonnocirugia
```

```
Shapiro-Wilk W test for normal data
```

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
densidadop~a	17	0.94330	1.198	0.360	0.35947

```
-> tratamiento = Shamcirugia
```

```
Shapiro-Wilk W test for normal data
```

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
densidadop~a	14	0.93225	1.254	0.445	0.32798

```
-> tratamiento = Shamnocirugia
```

```
Shapiro-Wilk W test for normal data
```

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
densidadop~a	14	0.90424	1.772	1.127	0.12996

Tabla 3: La presente tabla muestra el Test ANOVA para los 4 grupos (Parkinson hemisferio derecho, Parkinson hemisferio izquierdo, Sham hemisferio derecho, y Sham hemisferio izquierdo). El valor de **p** fue menor a 0,05 , por tanto, al menos una de las medias de los grupos comparados es diferente. El test ANOVA fue obtenido mediante el programa STATA 14.

```
. oneway densidadoptica tratamiento
```

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	.085872659	3	.02862422	13.28	0.0000
Within groups	.124984335	58	.002154902		
Total	.210856994	61	.003456672		

```
Bartlett's test for equal variances: chi2(3) = 8.3635 Prob>chi2 = 0.039
```

```
. pwmean densidadoptica, over(tratamiento) mcompare(tukey) effects
```

Tabla 4: La presente tabla muestra el Test Tukey, comparando los 4 grupos (Parkinson hemisferio derecho, Parkinson hemisferio izquierdo, Sham hemisferio derecho, y Sham hemisferio izquierdo) entre sí. El valor de p fue menor a 0,05 en todas las comparaciones del grupo Parkinson hemisferio derecho versus los demás grupos, por tanto, se rechazó H_0 . El test Tukey fue obtenido mediante el programa STATA 14.

Pairwise comparisons of means with equal variances

over : tratamiento

	Number of Comparisons
tratamiento	6

densidadoptica	Contrast	Std. Err.	Tukey		Tukey	
			t	P> t	[95% Conf. Interval]	
tratamiento						
Parkinsonnocirugia						
vs						
Parkinsoncirugia	.0677239	.0159222	4.25	0.000	.0256078	.10984
Shamcirugia vs Parkinsoncirugia	.0674518	.0167535	4.03	0.001	.0231369	.1117667
Shamnocirugia vs Parkinsoncirugia	.1010489	.0167535	6.03	0.000	.056734	.1453638
Shamcirugia vs Parkinsonnocirugia	-.0002721	.0167535	-0.02	1.000	-.044587	.0440428
Shamnocirugia						
vs						
Parkinsonnocirugia	.0333251	.0167535	1.99	0.204	-.0109898	.07764
Shamnocirugia vs Shamcirugia	.0335972	.0175455	1.91	0.233	-.0128125	.0800068

Inmunohistoquímica para NPY

Se obtuvieron imágenes (Figuras del 14 al 20) a diferentes niveles posteroanterior de bregma: -3,6 mm, -3.8 mm, -4,16 mm, -4,3 mm, -5,3 mm, -5,8 mm y -6,04 mm respectivamente; a partir de la observación promedio de conteo de neuronas inmunoreactivas para NPY, usando un microscopio Leica DM20 a 2.5X y el libro de coordenadas estereotáxica para cerebro de rata de Paxinos y Watson cuarta edición (50). Se observó la distribución del NPY en el grupo Parkinson en 7 diferentes niveles de bregma. Por otro lado, la distribución del NPY fue observada en el grupo Sham fue en 2 niveles diferentes de bregma -3,8 mm y -5,3 mm (Figuras 15 y 18). Se identificaron estructuras en las láminas neurohistológicas inmunoreactivas para NPY como el núcleo ventral tuberomamilar (VTM), área hipotalámica lateral (LH), núcleo hipotalámico ventromedial central (VMHC), núcleo hipotalámico ventromedial ventrolateral (VMHVL), área hipotalámico posterior (PH), haz del prosencéfalo mediano(mfb), núcleo rojo (R), núcleo epilemniscal (ELm), tracto mamilar principal (pm), núcleo mamilar medial (MMn), núcleo premamilar dorsal (PMD), núcleo supramamilar (SuM), área tegmental ventral (VTA), pedúnculo mamilar (mp), sustancia negra pars reticular (SNR), núcleo interfascicular (IF), lemnisco medial (ml), sustancia negra parte medial (SMM), núcleo rojo parte parvicelular (RPC), núcleo rojo parte magnocelular (RMC), núcleo interpenducular dorsomedial (IPDM), núcleo interpenducular rostral (IPR), núcleo pararubral (PaR), pedúnculo cerebral parte basal (cp), núcleo parasubtalámico (PSTh) y Tereta (Te). Se creó una tabla para comparar las estructuras donde hubo presencia de las neuronas inmunoreactivas para NPY entre el grupo Parkinson y Sham (Tabla 5).

Finalmente se realizó un campo fotográfico de un corte coronal de neuronas inmunoreactivas para NPY del grupo Sham a nivel de hipocampo (Figura 21), debido a que

solo hubo neuronas inmunoreactivas para NPY en SNR y PSTh a nivel de bregma -5,3 mm y -3,8 mm respectivamente.

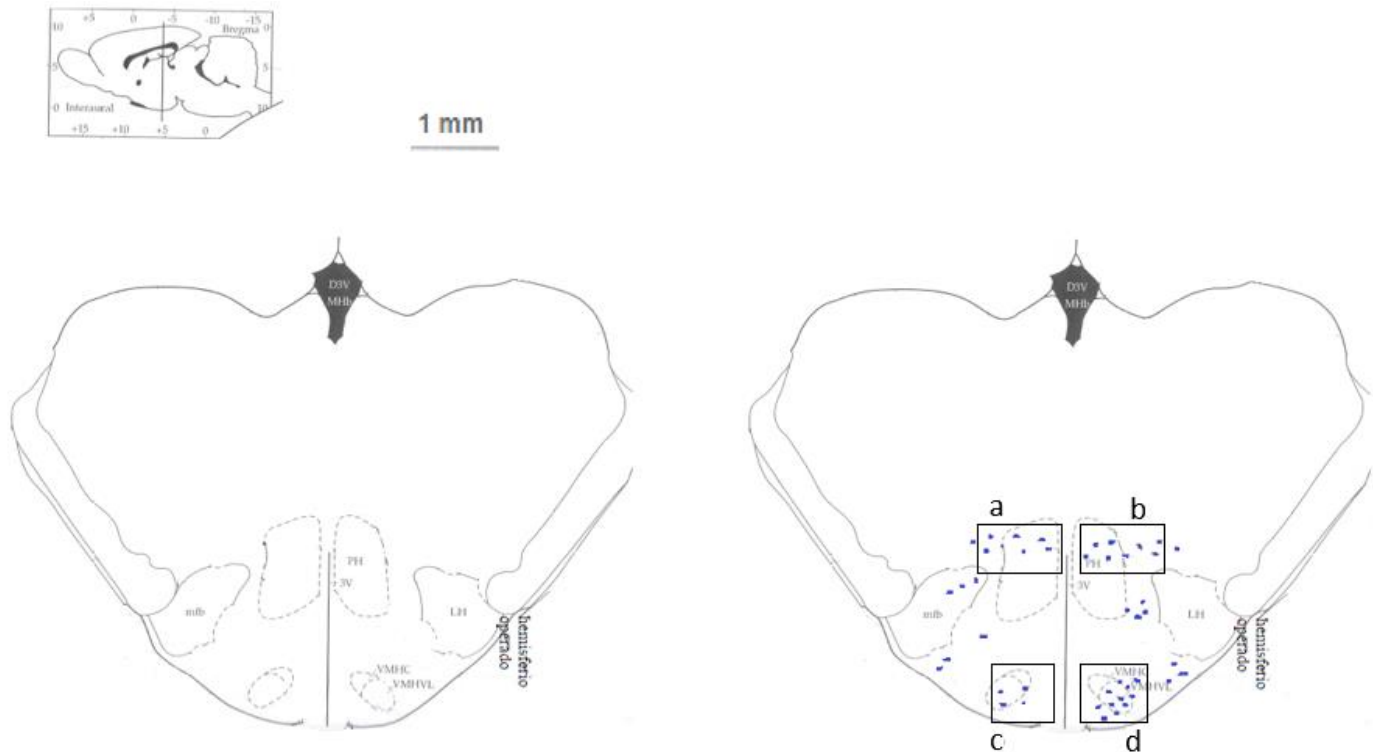


Figura 14: La presente figura muestra la observación promedio de neuronas inmunoreactivas para NPY a partir de los cortes coronales de las láminas neurohistológicas inmunoreactivas para NPY a nivel de bregma -3,60 mm. EL corte coronal del grupo Parkinson (imagen derecha) se muestra neuronas inmunoreactivas para NPY en la periferia de LH (área hipotalámica lateral), VMHC (núcleo hipotalámico ventromedial central), VMHVL (núcleo hipotalámico ventromedial), PH (área hipotalámico posterior) y mfb (haz del prosencéfalo mediano). Los recuadros “a”, “b”, “c” y “d” son figuras que muestran campos fotográficos de un corte coronal de neuronas inmunoreactivas para NPY.

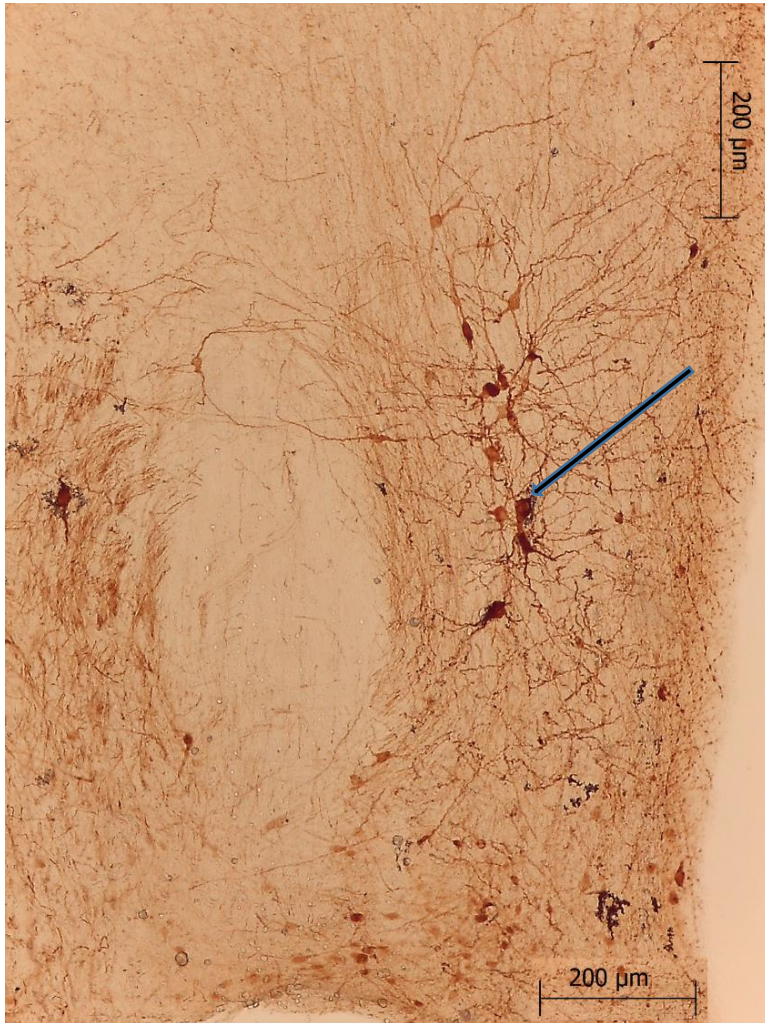


Figura 14 Recuadro "a": La presente figura muestra un campo fotográfico de un corte coronal de neuronas inmunoreactivas para NPY del recuadro "a" dentro de la figura 14, en el hemisferio no operado de una rata del grupo Parkinson a nivel de bregma -3,60 mm. La Tomado a 10X mediante un microscopio Leica DM20. Donde la flecha indica una neurona inmunoreactiva para NPY.

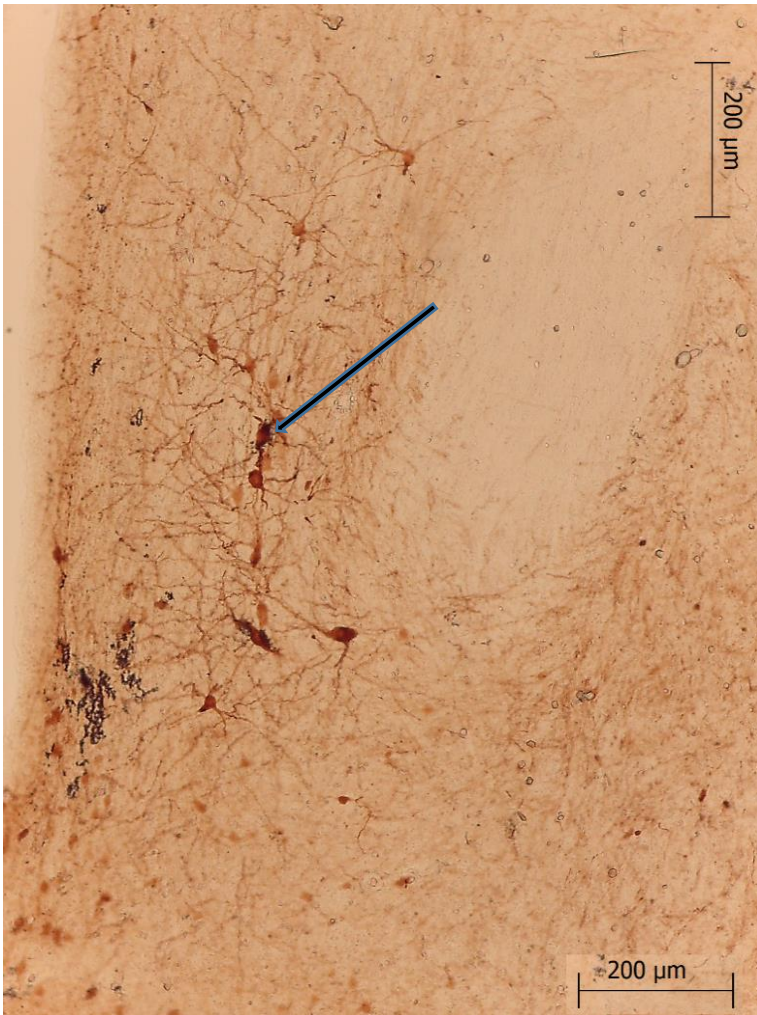


Figura 14 Recuadro “b”: La presente figura muestra un campo fotográfico de un corte coronal de neuronas inmunoreactivas para NPY del recuadro “b” dentro de la figura 14, en el hemisferio operado de una rata del grupo Parkinson a nivel de bregma -3,60 mm. Tomado a 10X mediante un microscopio Leica DM20. Donde la flecha indica una neurona inmunoreactiva para NPY.

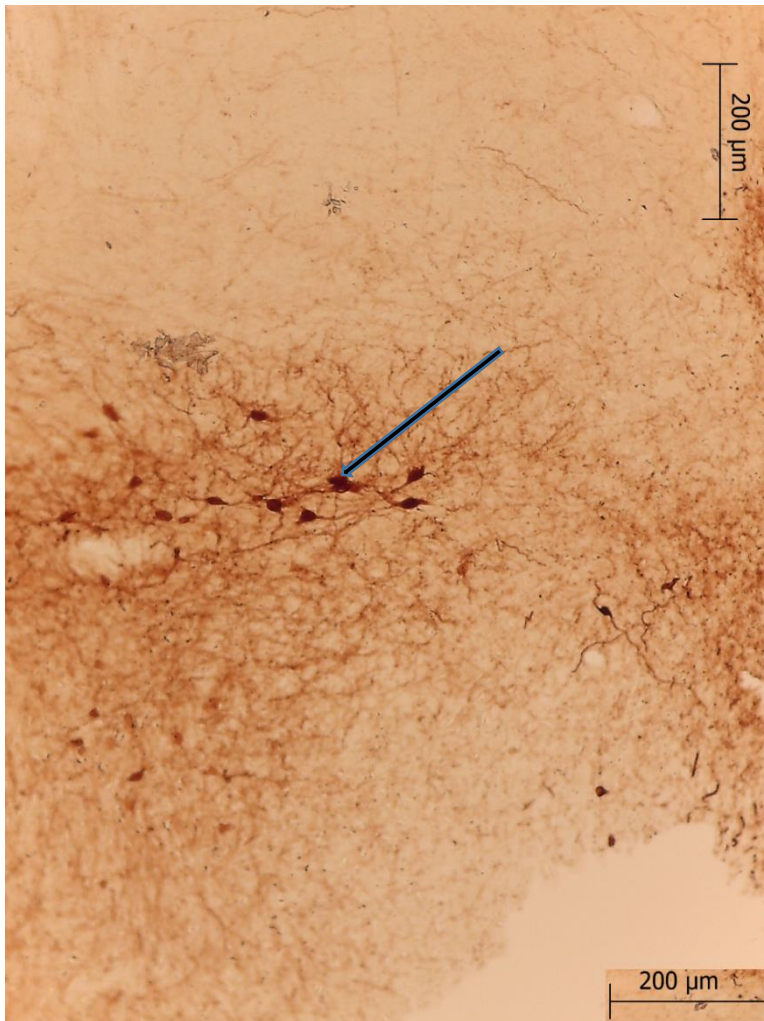


Figura 14 Recuadro “c”: La presente figura muestra un campo fotográfico de un corte coronal de neuronas inmunoreactivas para NPY del recuadro “c” dentro de la figura 14, en el hemisferio no operado de una rata del grupo Parkinson a nivel de bregma -3,60 mm. Tomado a 10X mediante un microscopio Leica DM20. Donde la flecha indica una neurona inmunoreactiva para NPY.

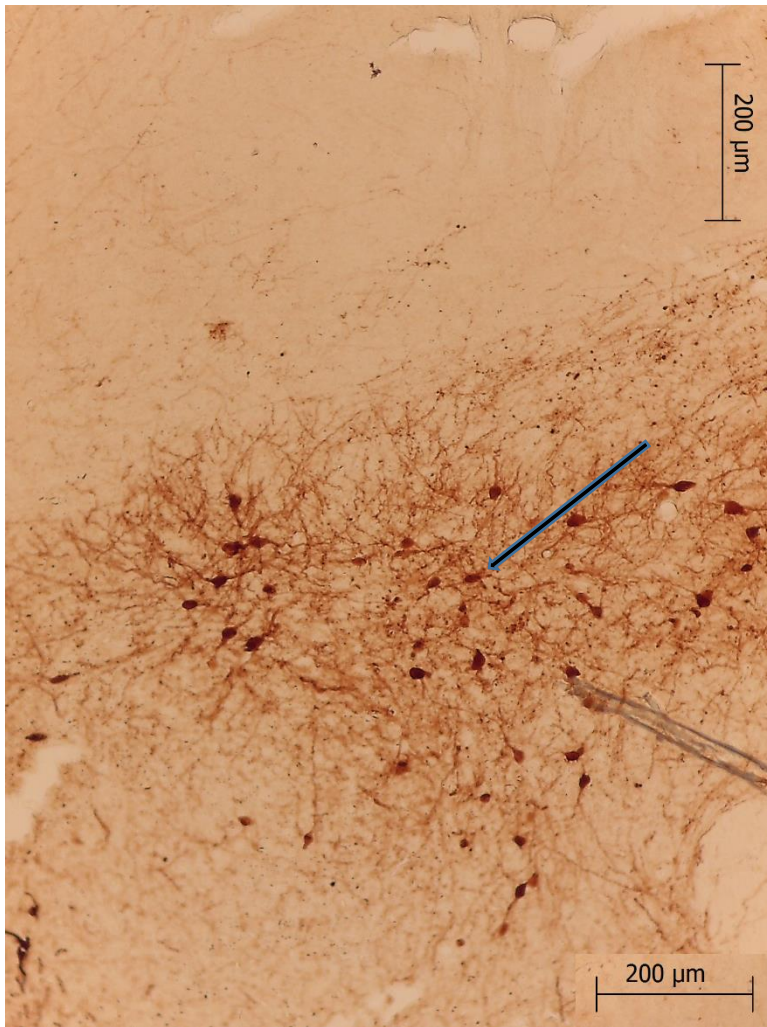


Figura 14 Recuadro “d”: La presente figura muestra un campo fotográfico de un corte coronal de neuronas inmunoreactivas para NPY del recuadro “d” dentro de la figura 14, en el hemisferio operado de una rata del grupo Parkinson a nivel de bregma -3,60 mm. Tomado a 10X mediante un microscopio Leica DM20. Donde la flecha indica una neurona inmunoreactiva para NPY.

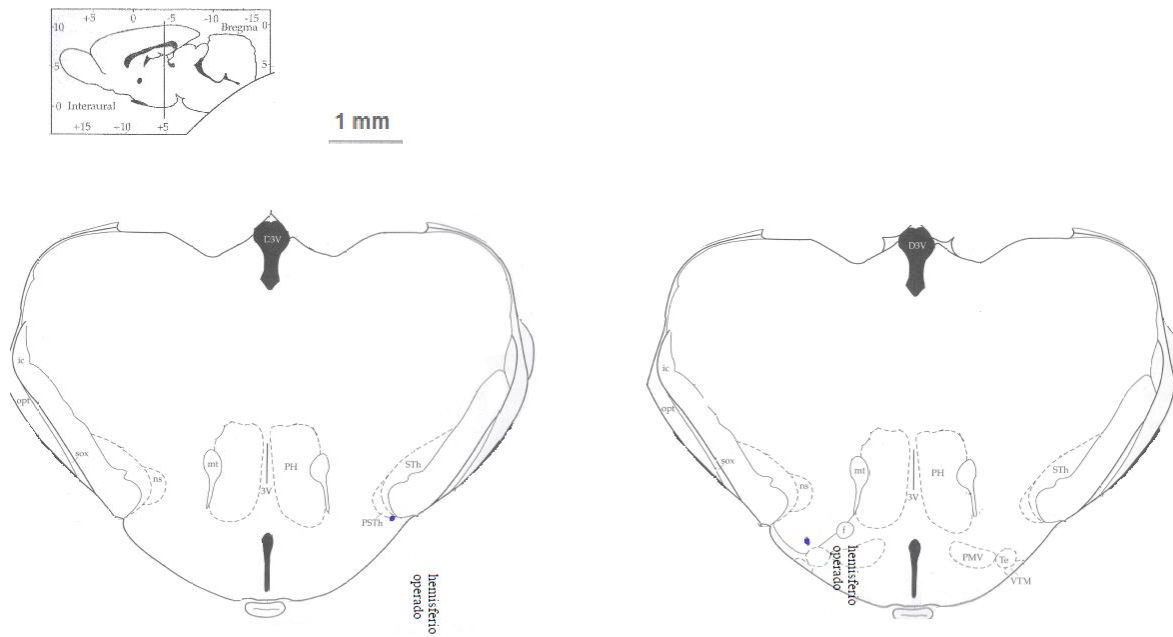
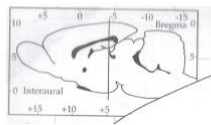


Figura 15: La presente figura muestra la observación promedio de neuronas inmunoreactivas para NPY a partir de los cortes coronales de láminas neurohistológicas inmunoreactivas para NPY a nivel de bregma -3,80 mm. El corte coronal del grupo Parkinson (imagen derecha) muestra neuronas inmunoreactivas para NPY en la periferia de Te (tereta los núcleos hipotalámicos). Además, en el corte coronal del grupo Sham (imagen izquierda) muestra neuronas inmunoreactivas para NPY en la periferia de PSTh (núcleo parasubtalámico).



1 mm

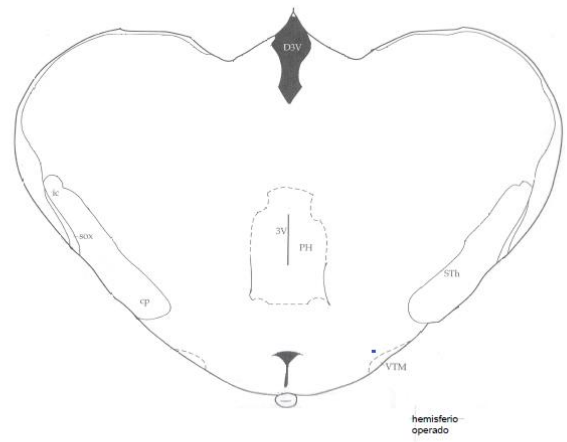
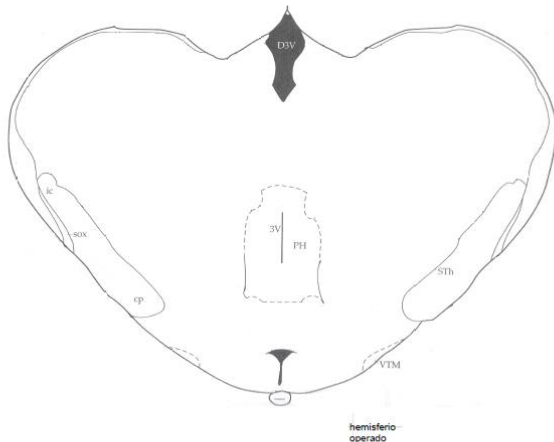


Figura 16: La presente figura muestra la observación promedio de neuronas inmunoreactivas para NPY a partir de los cortes coronales de láminas neurohistológicas inmunoreactivas para NPY a nivel de bregma -4,16 mm. El corte coronal del grupo Parkinson (imagen derecha) muestra neuronas inmunoreactivas para NPY en la periferia de VTM (núcleo ventral tuberomamilar).

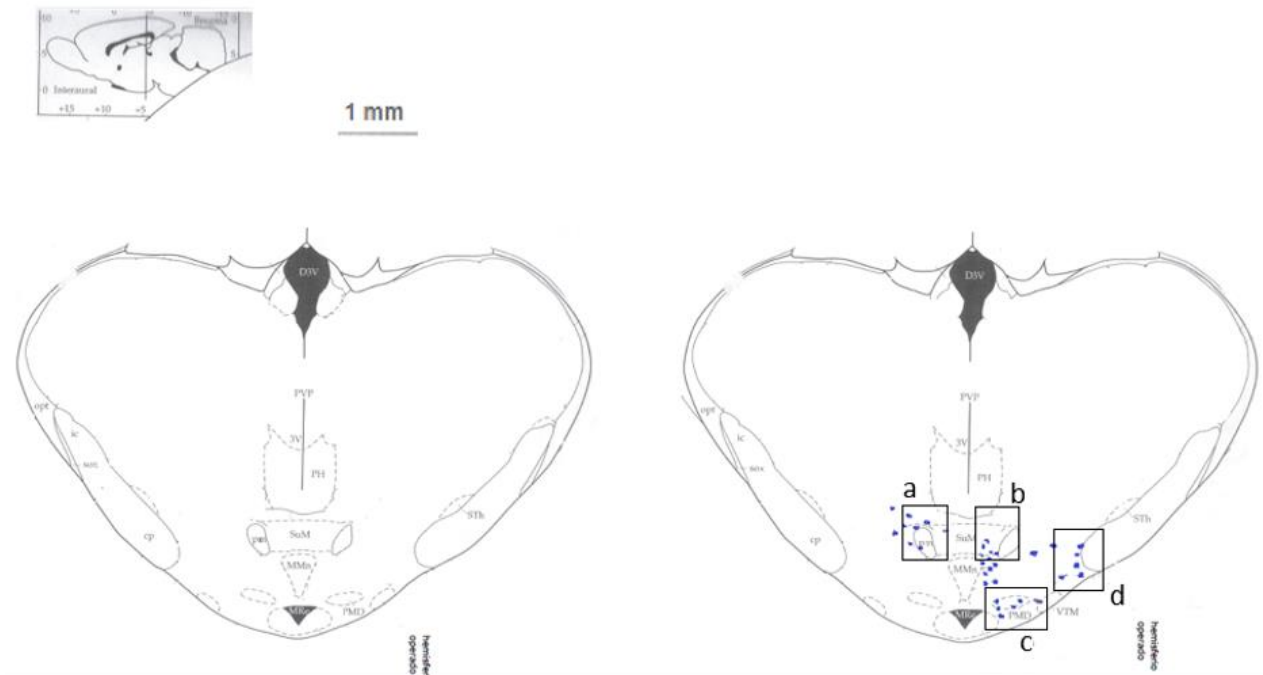


Figura 17: La presente figura muestra la observación promedio de neuronas inmunoreactivas para NPY a partir de los cortes coronales de láminas neurohistológicas inmunoreactivas para NPY a nivel de bregma -4,30 mm. El corte coronal del grupo Parkinson (imagen derecha) muestra neuronas inmunoreactivas para NPY dentro y la periferia de pm (tracto mamilar principal). También se observa neuronas inmunoreactivas para NPY en la periferia de MMn (núcleo mamilar medial), PMD (núcleo premamilar dorsal) y SuM (núcleo supramamilar). Los recuadros “a”, “b”, “c” y “d” son figuras que muestran campos fotográficos de un corte coronal de neuronas inmunoreactivas para NPY.

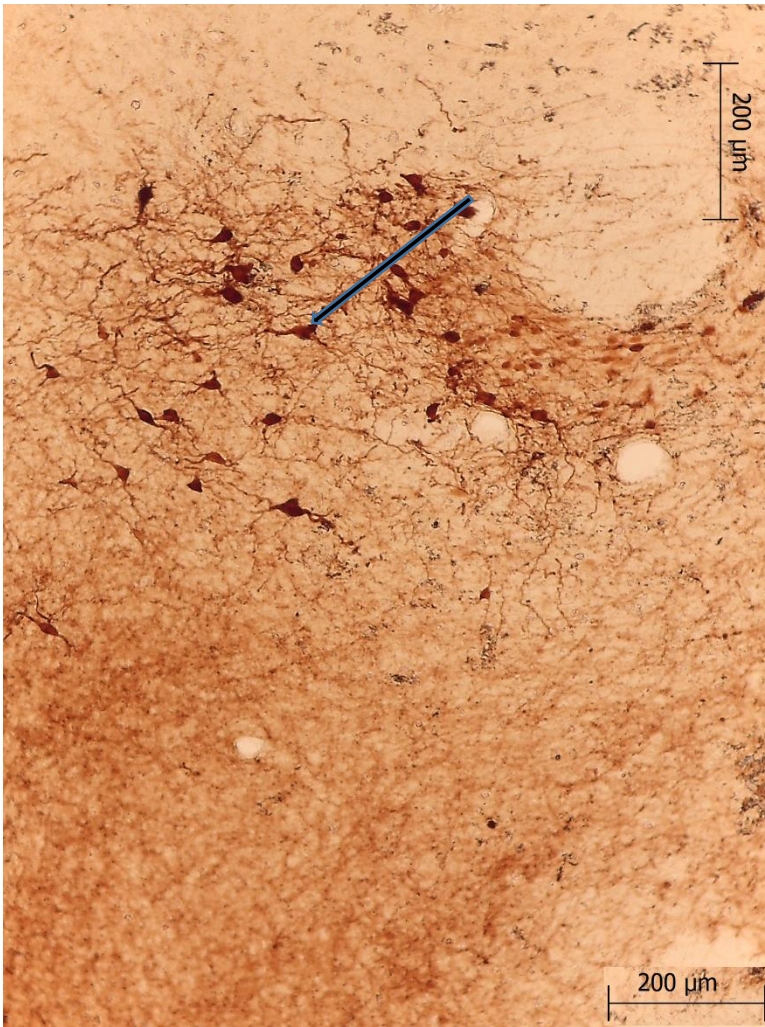


Figura 17 Recuadro “a”: La presente figura muestra un campo fotográfico de un corte coronal de neuronas inmunoreactivas para NPY del recuadro “a” dentro de la figura 17, en el hemisferio no operado de una rata del grupo Parkinson a nivel de bregma -4,30 mm. La Tomado a 10X mediante un microscopio Leica DM20. Donde la flecha indica una neurona inmunoreactiva para NPY.

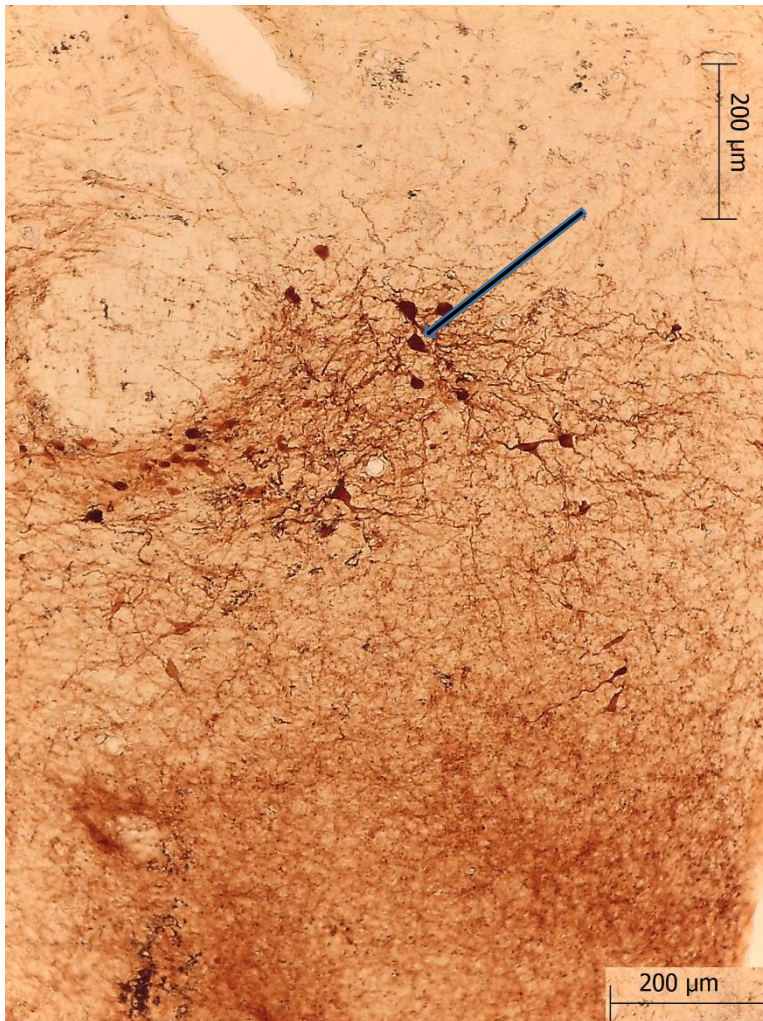


Figura 17 Recuadro “b”: La presente figura muestra un campo fotográfico de un corte coronal de neuronas inmunoreactivas para NPY del recuadro “b” dentro de la figura 17, en el hemisferio operado de una rata del grupo Parkinson a nivel de bregma -4,30 mm. La Tomado a 10X mediante un microscopio Leica DM20. Donde la flecha indica una neurona inmunoreactiva para NPY.

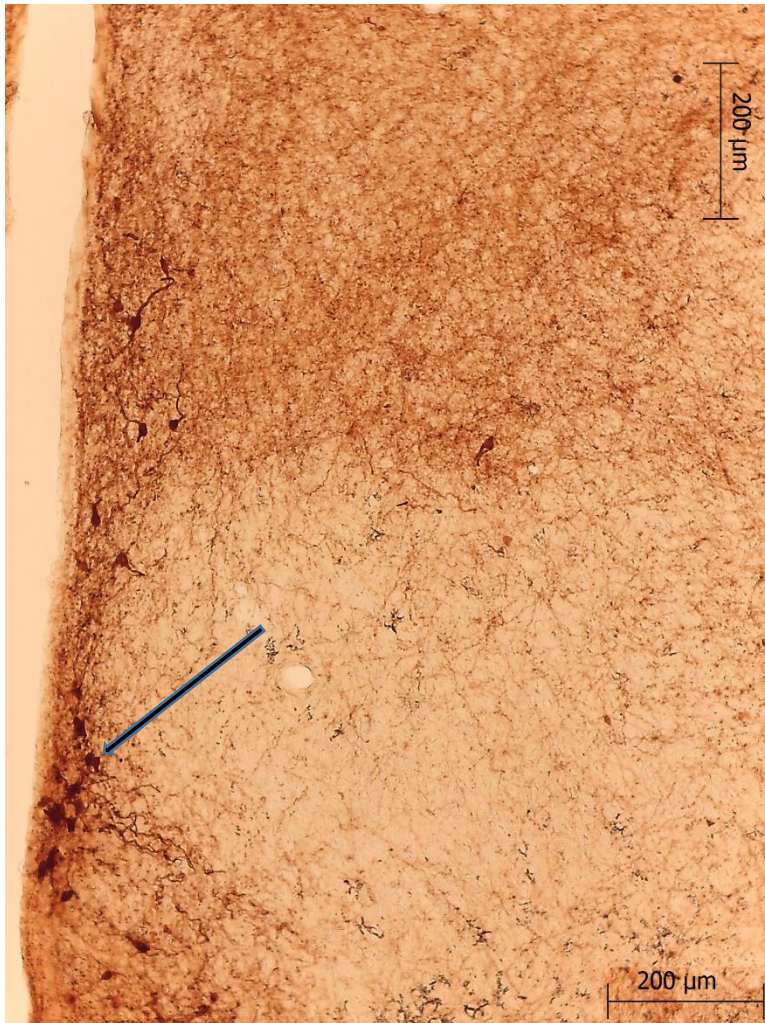


Figura 17 Recuadro “c”: La presente figura muestra un campo fotográfico de un corte coronal de neuronas inmunoreactivas para NPY del recuadro “c” dentro de la figura 17, en el hemisferio operado de una rata del grupo Parkinson a nivel de bregma -4,30 mm. La Tomado a 10X mediante un microscopio Leica DM20. Donde la flecha indica una neurona inmunoreactiva para NPY.

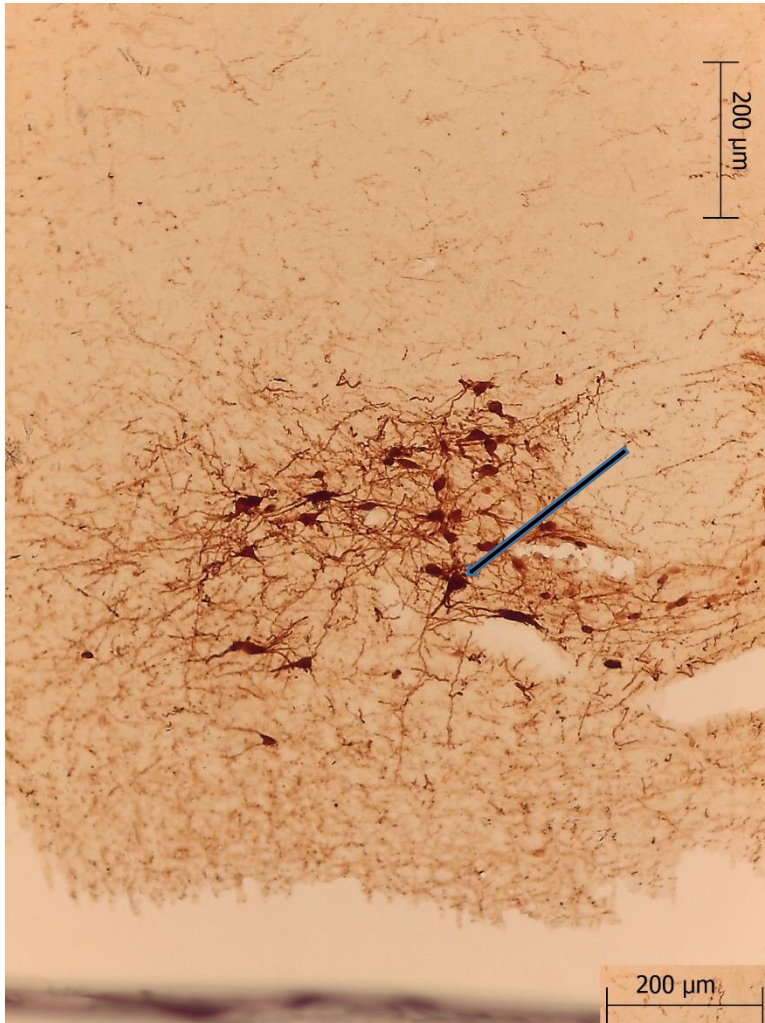


Figura 17 Recuadro “d”: La presente figura muestra un campo fotográfico de un corte coronal de neuronas inmunoreactivas para NPY del recuadro “d” dentro de la figura 17, en el hemisferio operado de una rata del grupo Parkinson a nivel de bregma -4,30 mm. La Tomado a 10X mediante un microscopio Leica DM20. Donde la flecha indica una neurona inmunoreactiva para NPY.

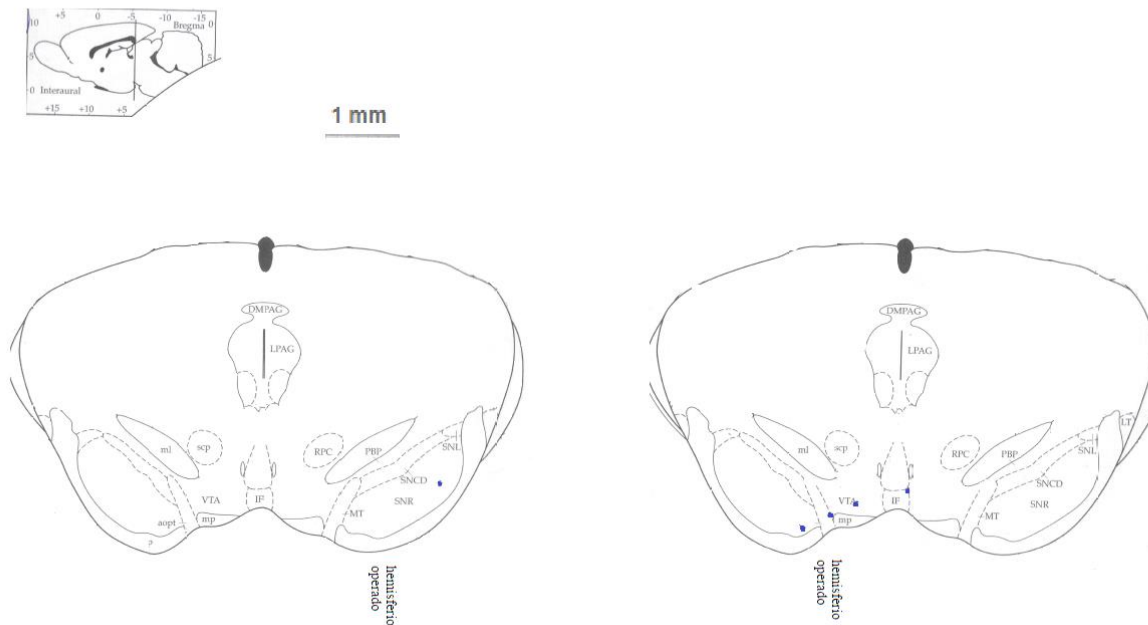


Figura 18: La presente figura muestra la observación promedio de neuronas inmunoreactivas para NPY a partir de los cortes coronales de láminas neurohistológicas inmunoreactivas para NPY a nivel de bregma -5,30 mm. El corte coronal del grupo Parkinson (imagen derecha) muestra neuronas inmunoreactivas para NPY dentro y la periferia de SNR (sustancia negra pars reticular). También se observa neuronas inmunoreactivas para NPY en la periferia de VTA (área tegmental ventral), mp (pedúnculo mamilar), y IF (núcleo interfascicular). Además, existe presencia de neuronas inmunoreactivas para NPY dentro de SNR en el grupo Sham.

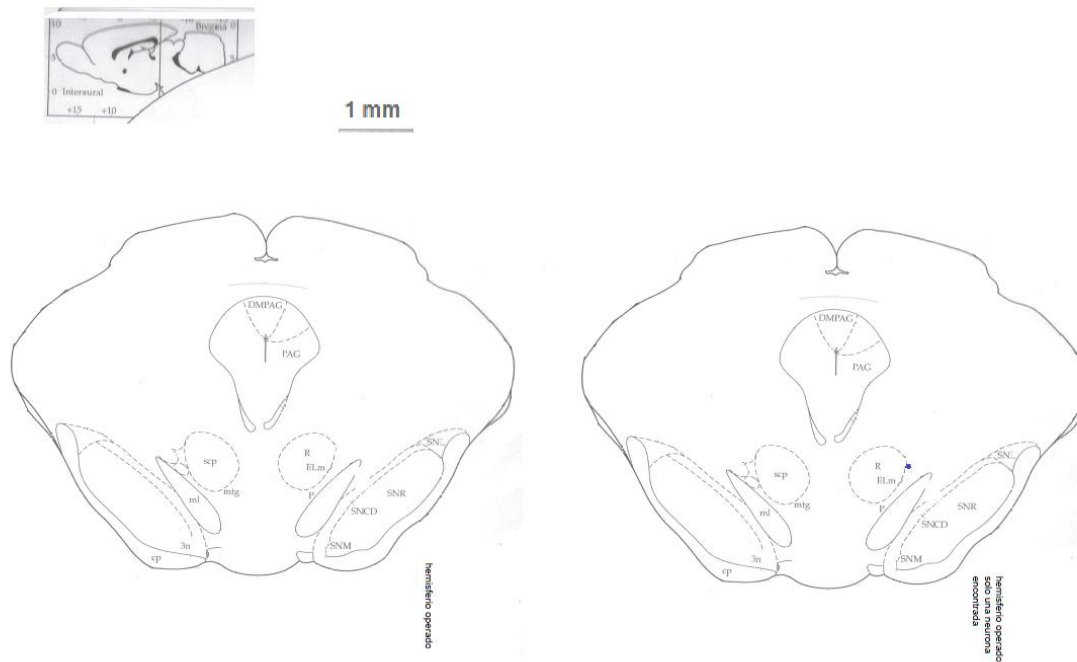


Figura 19: La presente figura muestra la observación promedio de neuronas inmunoreactivas para NPY a partir de los cortes coronales de láminas neurohistológicas inmunoreactivas para NPY a nivel de bregma -5,80 mm. El corte coronal del grupo de Parkinson (imagen derecha) muestra neuronas inmunoreactivas para NPY en la periferia de R (núcleo rojo) y ELM (núcleo epilemniscal).

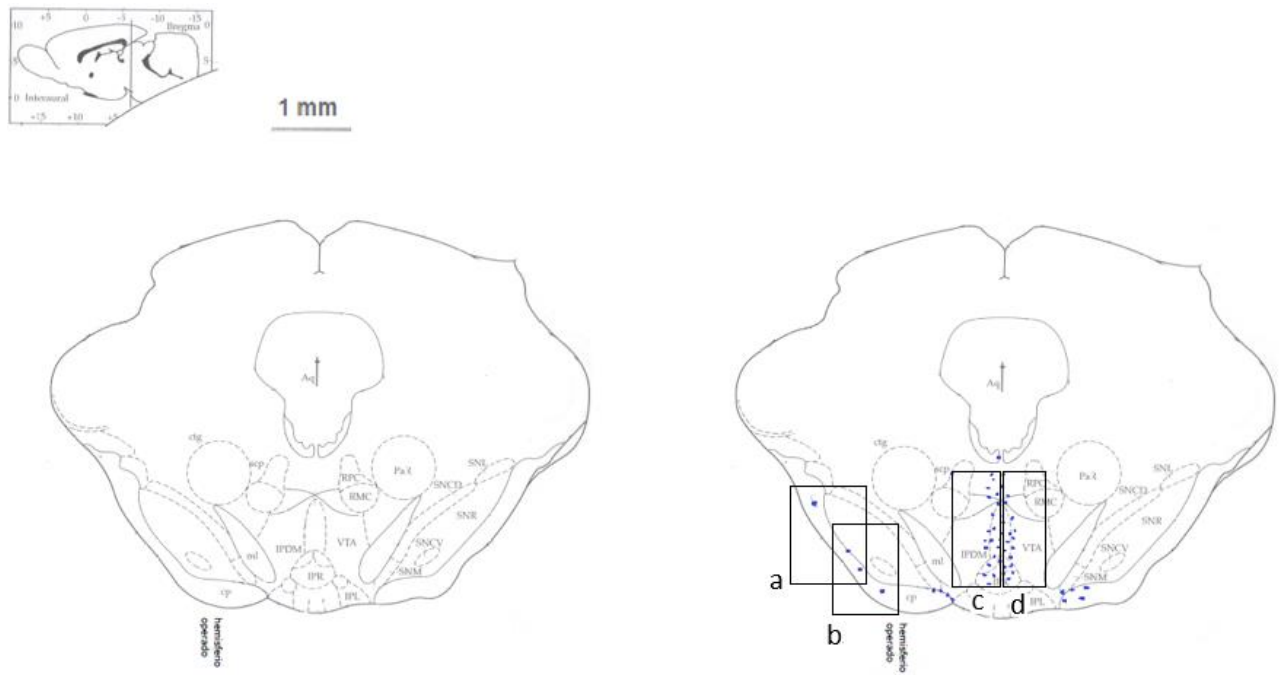


Figura 20: La presente figura muestra la observación promedio de neuronas inmunoreactivas para NPY a partir de los cortes coronales de las láminas neurohistológicas inmunoreactivas para NPY a nivel de bregma -6,04 mm. El corte coronal del grupo de Parkinson (imagen derecha) muestra neuronas inmunoreactivas para NPY en la periferia de VTA (área tegmental ventral), ml (lemnisco medial), SMM (sustancia negra parte medial), RPC (núcleo rojo parte parvicelular), RMC (núcleo rojo parte magnocelular), IPDM (núcleo interpenducular dorsomedial), IPR (núcleo interpenducular rostral), PaR (núcleo pararubral) y cp (pedúnculo cerebral parte basal). Los recuadros “a”, “b”, “c” y “d” son figuras que muestran campos fotográficos de un corte coronal de neuronas inmunoreactivas para NPY.

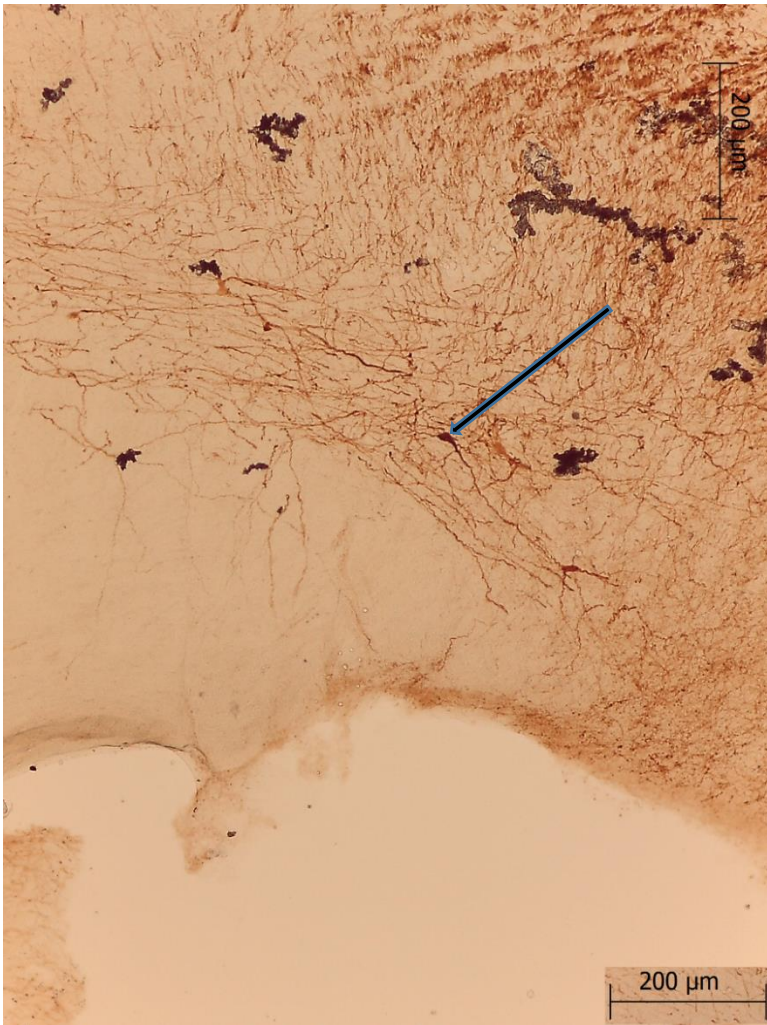


Figura 20 Recuadro “a”: La presente figura muestra un campo fotográfico de un corte coronal de neuronas inmunoreactivas para NPY del recuadro “a” dentro de la figura 20, en el hemisferio operado de una rata del grupo Parkinson a nivel de bregma -6,04 mm. Tomado a 10X mediante un microscopio Leica DM20. Donde la flecha indica una neurona inmunoreactiva para NPY.

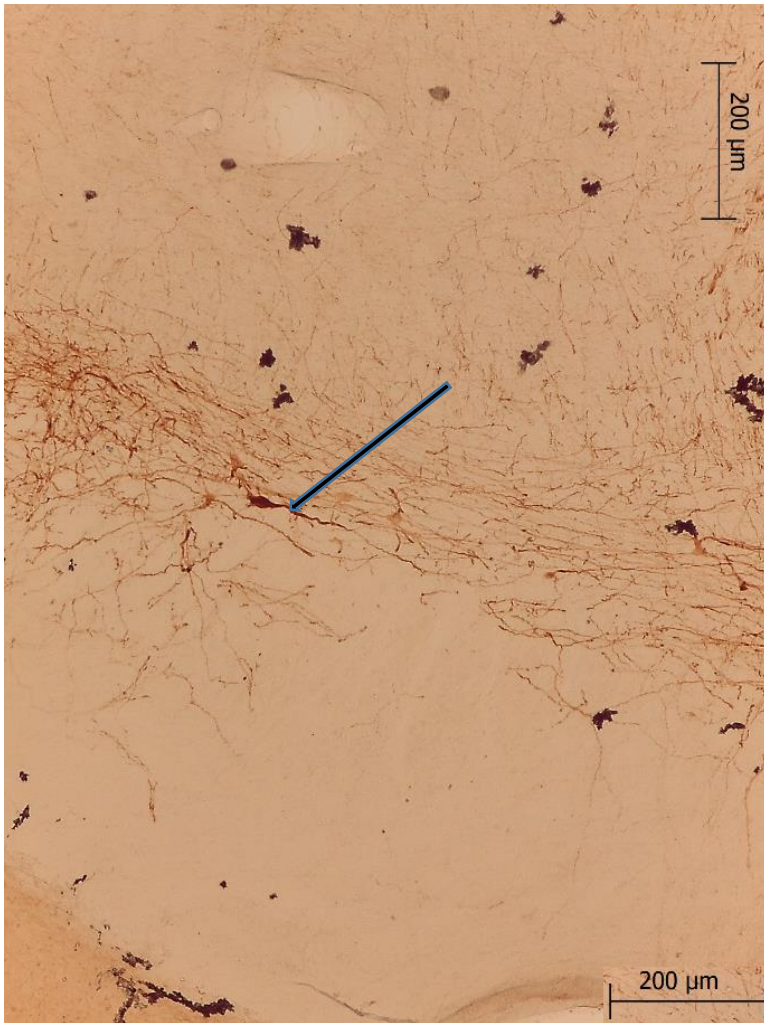


Figura 20 Recuadro “b”: La presente figura muestra un campo fotográfico de un corte coronal de neuronas inmunoreactivas para NPY del recuadro “b” dentro de la figura 20, en el hemisferio operado de una rata del grupo Parkinson a nivel de bregma -6,04 mm. Tomado a 10X mediante un microscopio Leica DM20. Donde la flecha indica una neurona inmunoreactiva para NPY.

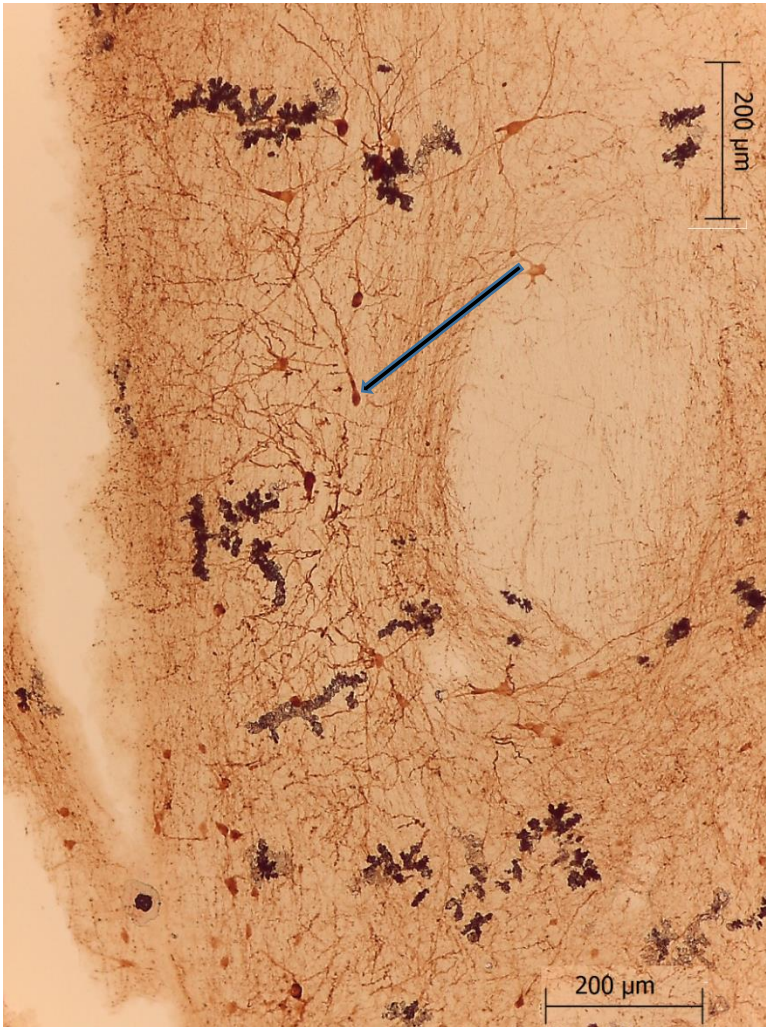


Figura 20 Recuadro “c”: La presente figura muestra un campo fotográfico de un corte coronal de neuronas inmunoreactivas para NPY del recuadro “c” dentro de la figura 20, en el hemisferio operado de una rata del grupo Parkinson a nivel de bregma -6,04 mm. Tomado a 10X mediante un microscopio Leica DM20. Donde la flecha indica una neurona inmunoreactiva para NPY.

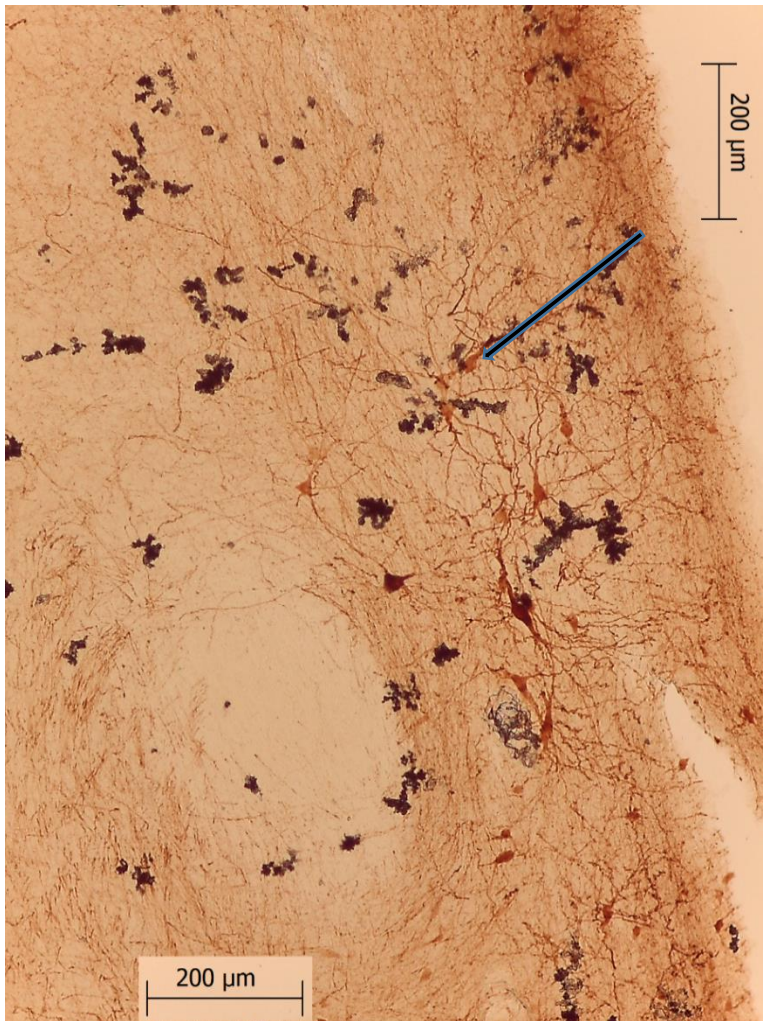


Figura 20 Recuadro “d”: La presente figura muestra un campo fotográfico de un corte coronal de neuronas inmunoreactivas para NPY del recuadro “d” dentro de la figura 20, en el hemisferio no operado de una rata del grupo Parkinson a nivel de bregma -6,04 mm. Tomado a 10X mediante un microscopio Leica DM20. Donde la flecha indica una neurona inmunoreactiva para NPY.

Tabla 5: La presente tabla muestra las estructuras y núcleos donde se encontraron neuronas inmunoreactivas para NPY a diferentes niveles posteroanterior de Bregma para ambos grupos (Parkinson y Sham) sometidos a hipoxia crónica (PB = 433 Torr ; PIO₂ = 90,9 Torr).

bregma (mm)	Sham	Parkinson	bregma (mm)	Sham	Parkinson
-3,6	-	LH	-5,3	-	IF
-3,6	-	VMHC	-5,3	-	mp
-3,6	-	VMHVL	-5,8	-	R
-3,6	-	PH	-5,8	-	Elm
-3,6	-	mfb	-6,04	-	VTA
-3,8	PSTh	Te	-6,04	-	ml
-4,16	-	VTM	-6,04	-	SMM
-4,3	-	pm	-6,04	-	RPC
-4,3	-	MMn	-6,04	-	RMC
-4,3	-	PMD	-6,04	-	IPDM
-4,3	-	SuM	-6,04	-	IPR
-5,3	-	VTA	-6,04	-	PaR
-5,3	SNR	SNR	-6,04	-	cp

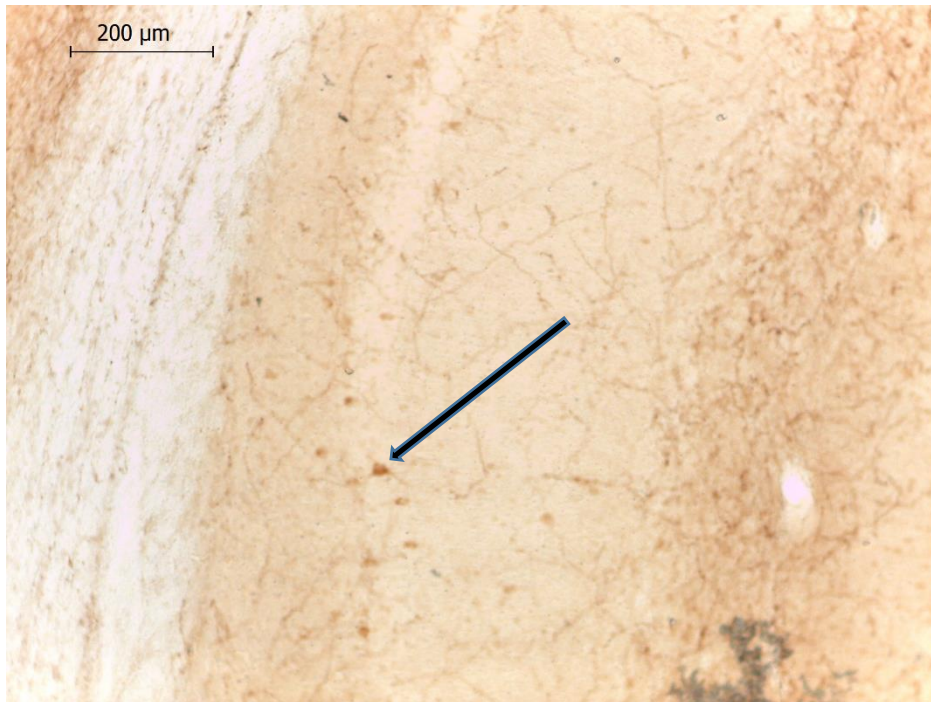


Figura 21: La presente figura muestra un campo fotográfico de un corte coronal de neuronas inmunoreactivas para NPY a nivel de hipocampo de una rata del grupo Sham. Tomado a 10X mediante un microscopio Leica DM20. Donde la flecha indica una neurona inmunorreactiva para NPY.

VI. Discusión

Nuestro objetivo es evaluar la expresión del NPY en un modelo de rata Parkinsoniana sometida a hipoxia crónica, a partir de los indicios de que la condición de hipoxia crónica jugaría un rol en el inicio de la EP y que el NPY podría actuar como un factor neuroprotector.

El incremento promedio del porcentaje de hematocrito para ambos grupos después de la exposición a hipoxia crónica fue 20,72 % (Gráfica 1). Este valor confirmaría que el incremento del porcentaje de hematocrito es producto de la respuesta fisiológica a la baja presión parcial de O₂ a nivel arterial, conllevando al incremento de hemoglobina para contrarrestar la hipoxemia producida, similar a lo encontrado en estudios en animales de laboratorio en hipoxia crónica (403,53 Torr) por 5 meses (57). Otros estudios encontraron un incremento del nivel de Hemoglobina, 15 Hb a 20,71 Hb en hipoxia crónica (433 Torr) por 5 semanas (52). La exposición a un ambiente hipóxico produce adaptaciones estructurales y funcionales a nivel del SNC en la rata como: duplicación de la densidad capilar, disminución promedio de la distancia intercapilar, activación del gen HIF- 1 y Angiopoyetina-2 (58). La capacidad de los organismos senescentes para responder a una condición de estrés como la hipoxia se ve disminuida con la edad, como la disminución de factor de crecimiento endotelial vascular (59). Por lo que la hipoxia crónica sería también un factor que exacerba la EP en pacientes de edad avanzada clínicamente diagnosticado con la EP y un mecanismo posible de neuroprotección sería el aumento de la expresión de NPY.

A partir de los hallazgos encontrados en ambos grupos experimentales (Parkinson y Sham) mediante el test de rotación (Gráfica 2), se confirma que el incremento del número de vueltas contralateral a la lesión en las ratas es producto de la muerte de neuronas dopaminérgicas a nivel de la sustancia negra por la 6-OHDA. La aplicación de apomorfina,

agonista dopaminérgico, tiene un mayor impacto dopaminérgico en el hemisferio dañado (hemisferio derecho), conduciendo a un comportamiento de movimiento (vueltas) contralateral a la lesión producida por 6-OHDA, debido a una mayor sensibilidad de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 en el neostriado (hemisferio derecho dañado), estructura neuroanatómica implicada en el control del movimiento y equilibrio (60). Estos resultados guardan relación con estudios realizados en modelos animales parkinsonianos inducidos con 6-OHDA (61).

La primera demostración de los efectos biológicos de 6-OHDA, fue informado hace más de 50 años y la generación de modelos animales parkinsonianos ha sido ampliamente utilizado (62,63). A partir de los resultados de densitometría óptica de los 4 grupos generados (tabla 4), se confirma la muerte de neuronas dopaminérgicas causado por la neurotoxicidad de 6-OHDA a nivel de la SN. Esto confirma la causa neurológica real de nuestro modelo básico para EP, ya que otros estudios que obtuvieron más del 40 % de muerte de neuronas dopaminérgicas a nivel de la SN después de 21 días realizada la lesión (64).

La expresión del NPY está ampliamente distribuida en estructuras como hipocampo, corteza cerebral, amígdala, hipotálamo (excepto área preóptica lateral y núcleo supraquiasmático), tálamo (excepto núcleo talámico paraventricular), cerebelo, puente, medula, bulbo olfatorio (excepto Capa de células gránulo del accesorio y Capa plexiforme externa del accesorio) (The Human Protein Atlas Project by Knut & Alice Wallenberg foundation) (63). En el presente trabajo, a partir de las imágenes obtenidas del promedio de neuronas inmunoreactivas para NPY a diferentes niveles anteroposterior de Bregma, se observó la expresión de NPY en el área del hipotálamo (Figura 14), dicha área implicada en la homeostasis energética y biosíntesis del NPY en núcleo arqueado (ARC) (66). La expresión del NPY en la área hipotalámica lateral (LH) (Figura 14) juega un rol importante en el comportamiento como sueño-vigilia y búsqueda de drogas (placer); teniendo LH

proyecciones hacia el área tegmental ventral (VTA), el cual está involucrada en los circuitos de recompensa dopaminérgicos (67). La expresión del NPY en VTA (Figuras 18 y 20), tienen un rol inhibitorio directo sobre las neuronas dopaminérgicas y GABAérgicas dentro de VTA (67). La expresión del NPY fue observada en la periferia del núcleo tálámico hipotalámico (Figura 15) y del área hipotalámica posterior (PH) (Figura 14). Estudios en el área hipotalámica posterior (PHA) muestran expresión del NPY así como hipocretina, TH y GABA (68). Así mismo se muestra que la expresión del NPY está localizada principalmente a nivel dorsal y ventral de PHA (68). Por otra parte, no se ha reportado expresión del NPY en el núcleo premamilar dorsal (Figura 16). También se observó la expresión del NPY en el núcleo supramamilar (Figura 17), similar a lo encontrado en otros estudios donde está involucrado en los procesos de memoria (69).

La expresión del NPY a nivel de la sustancia negra (Figura 18) para ambos grupos experimentales, mostró diferencias en el promedio de neuronas con inmunoreacción para NPY. La expresión de NPY en SNCD, SNR y SNM; y SNR en el grupo Parkinson (Figura 18) y Sham (Figura 20) respectivamente fue mayor en el primero. EL NPY actuaría como un mayor neuroprotector, mediante el receptor Y2, estimulando la síntesis de DA (42). La expresión de NPY en la periferia del núcleo rojo también fue observada (Figuras 19 y 20). La pérdida de neuronas dopaminérgicas en EP, conduce a un aumento de hierro a nivel de SN, existiendo una asociación entre el contenido de hierro en el núcleo rojo y la discinesia (70). Estudios mencionan que el núcleo rojo es crucial para producir el mecanismo de caída de la salida respiratoria durante la hipoxemia isocapnica en el recién nacido (71,72).

En el presente trabajo, la presencia de inmunoreacción para NPY en las láminas neurohistológicas, las estructuras como VMHC, VMHVL, VTM, VTA, SNR, R, IPDM, IPR, LH fueron iguales a las reportadas por inmunofluorescencia en The Human Protein Atlas Project (65). El NPY es una sustancia neuroactiva constitutiva a nivel de estructuras como el

área hipotalámica lateral (73). La reducida presencia de neuronas con inmunoreacción para NPY en el grupo Sham, podría ser debido a la sensibilidad de la técnica empleada (65). La expresión del NPY en SNR, PSTh, corteza cerebral e hipocampo del grupo Sham (Figura 20), sugiere una sobreexpresión del NPY en las estructuras cerebrales observadas en condiciones de hipoxia crónica (tabla5).

VII. Conclusiones

- Hay expresión de NPY, observadas mediante inmunohistoquímica, en neuroestructuras a nivel subcortical como LH, VMHC, VMHVL, PH, mfb, Te, VTM, pm, MMn, PMD, SuM, VTA, SNR, IF, mp, R, Elm, ml, SMM, RPC, RMC, IPDM, IPR, PaR, cp en el modelo de rata parkinsoniana sometida a hipoxia crónica.
- El NPY es una sustancia neuroactiva que podría actuar como un sistema compensatorio frente a la enfermedad de Parkinson e Hipoxia a nivel del encefalo de la rata.

VIII. Perspectivas

En estudios futuros se podría cuantificar la expresión de proteínas y ARNm del neuropéptido Y y Tirosinahidroxilasa a nivel de la sustancia negra en las ratas parkinsonianas sometidas a hipoxia crónica.

IX. Referencia bibliográfica

1. Gustavo F. Gonzales. Patrones demográficos reproductivos y de morbilidad. *Acta Andina*. 1988; 8:85-93
2. León-Velarde F, Villafuerte FC, Richalet J-P. Chronic mountain sickness and the heart. *Prog Cardiovasc Dis*. 2010; 52(6):540-549.
3. Xu K, Puchowicz MA, LaManna JC. Renormalization of regional brain blood flow during prolonged mild hypoxic exposure in rats. *Brain Res*. 2004; 1027(1-2):188-91.
4. Bickler PE, Fahlman CS, Ferriero DM. Hypoxia increases calcium flux through cortical neuron glutamate receptors via protein kinase C. *J Neurochem*. febrero de 2004; 88(4):878-884.
5. Banasiak KJ, Xia Y, Haddad GG. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol*. 2000; 62(3):215-249.
6. Chávez JC, Pichiule P, Boero J, Arregui A. Reduced mitochondrial respiration in mouse cerebral cortex during chronic hypoxia. *Neurosci Lett*. 1995; 193(3):169-172.
7. Arregui A, Hollingsworth Z, Penney JB, Young AB. Autoradiographic evidence for increased dopamine uptake sites in striatum of hypoxic mice. *Neurosci Lett*. 1994; 167(1-2):195-197.
8. Arregui A, Barer GR, Emson PC. Neurochemical studies in the hypoxic brain: substance P, met-enkephalin, GABA and angiotensin converting enzyme. *Life Sci*. 1981; 28(26):2925-2929.
9. Schwarzer C, Sperk G, Rauca C, Pohle W. Neuropeptide Y and somatostatin immunoreactivity in the rat hippocampus after moderate hypoxia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1996; 354(1):67-71.
10. Bell EL, Klimova TA, Eisenbart J, Schumacker PT, Chandel NS. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Trigger Hypoxia-Inducible Factor-Dependent Extension of the Replicative Life Span during Hypoxia. *Molecular and Cellular Biology*. 2007; 27(16):5737-5745.

11. Murphy MP. Modulating mitochondrial intracellular location as a redox signal. *Sci Signal*. 2012; 5(242):39.
12. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Krause K-H. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*. 2012; 142:w13659.
13. Mauch L, Lun A, O'Gorman MR, Harris JS, Schulze I, Zychlinsky A, et al. Chronic granulomatous disease (CGD) and complete myeloperoxidase deficiency both yield strongly reduced dihydrorhodamine 123 test signals but can be easily discerned in routine testing for CGD. *Clin Chem*. 2007; 53(5):890–896.
14. Loukogeorgakis SP, van den Berg MJ, Sofat R, Nitsch D, Charakida M, Haiyee B, et al. Role of NADPH oxidase in endothelial ischemia/reperfusion injury in humans. *Circulation*. 2010; 121(21):2310-2316
15. Thomas MP, Chartrand K, Reynolds A, Vitvitsky V, Banerjee R, Gendelman HE. Ion channel blockade attenuates aggregated alpha synuclein induction of microglial reactive oxygen species: relevance for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2007; 100(2):503–19.
16. Manoharan S, Guillemin GJ, Abiramasundari RS, Essa MM, Akbar M, Akbar MD. The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016: 8590578.
17. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell*. 2010; 140(6):918-934.
18. Lee S-J, Lim H-S, Masliah E, Lee H-J. Protein aggregate spreading in neurodegenerative diseases: Problems and perspectives. *Neuroscience Research*. 2011; 70(4):339-348
19. Sananbenesi F, Fischer A. The epigenetic bottleneck of neurodegenerative and psychiatric diseases. *Biol Chem*. 2009; 390(11):1145-1153.
20. Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front Cell Neurosci*. 2015; 9:124.

21. Wang SJ, Fuh JL, Teng EL, Liu CY, Lin KP, Chen HM, et al. A door-to-door survey of Parkinson's disease in a Chinese population in Kinmen. *Arch Neurol.* 1996; 53(1):66-71.
22. Bharucha NE, Bharucha EP, Bharucha AE, Bhise AV, Schoenberg BS. Prevalence of Parkinson's disease in the Parsi community of Bombay, India. *Arch Neurol.* 1988; 45(12):1321-1323.
23. Melcon MO, Anderson DW, Vergara RH, Rocca WA. Prevalence of Parkinson's disease in Junín, Buenos Aires Province, Argentina. *Mov Disord.* 1997; 12(2):197-205.
24. von Campenhausen S, Bornschein B, Wick R, Bötzel K, Sampaio C, Poewe W, et al. Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol.* agosto de 2005;15(4):473-90.
25. Luis T, Mori N, Mariano C, José D, Marleni M, Jorge M, et al. Prevalencia de la enfermedad de Parkinson: Un estudio puerta a puerta en cinco distritos de Ulcumayo- Junín-Perú. *Diagnóstico.* 2008; 24(4): 150-156
26. Victoria Marca, Oscar Acosta, Mario Cornejo-Olivas, Olimpio Ortega, Doris Huerta, Pilar Mazzetti. Polimorfismo genético de la apolipoproteína E en una población peruana. *Rev Peru Med.* 2011; 28(4):589-594.
27. Stefanis L. α -Synuclein in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 4: a009399
28. Menza M, Dobkin RD, Marin H, Bienfait K. Sleep disturbances in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2010; 25 (Suppl 1):S117-122.
29. Marsh L. Depression and Parkinson's Disease: Current Knowledge. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2013; 13(12):409.
30. Doty RL. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol.* 2012; 8(6):329-339.
31. Biundo R, Weis L, Antonini A. Cognitive decline in Parkinson's disease: the complex picture. *NPJ Parkinsons Dis.* 2016; 2:16018.

32. Lin MT, Cantuti-Castelvetri I, Zheng K, Jackson KE, Tan YB, Arzberger T, et al. Somatic mitochondrial DNA mutations in early Parkinson and incidental Lewy body disease. *Ann Neurol.* 2012; 71(6):850-854
33. Abraham S, Soundararajan CC, Vivekanandhan S, Behari M. Erythrocyte antioxidant enzymes in Parkinson's disease. *Indian J Med Res.* 2005; 121(2):111-115.
34. Sherer TB, Betarbet R, Stout AK, Lund S, Baptista M, Panov AV, et al. An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. *J Neurosci.* 2002; 22(16):7006-7015.
35. Onodera H, Okabe S, Kikuchi Y, Tsuda T, Itoyama Y. Impaired chemosensitivity and perception of dyspnoea in Parkinson's disease. *Lancet.* 2000; 356(9231):739-740.
36. Simola N, Morelli M, Carta AR. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox Res.* 2007; 11(3-4):151-167
37. Perese DA, Ulman J, Viola J, Ewing SE, Bankiewicz KS. A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. *Brain Res.* 1989; 494(2):285-293.
38. Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* 2004; 318(1):215-224.
39. Daubner SC, Le T, Wang S. Tyrosine Hydroxylase and Regulation of Dopamine Synthesis. *Arch Biochem Biophys.* 2011; 508(1):1-12.
40. Vuillet J, Kerkerian L, Kachidian P, Bosler O, Nieoullon A. Ultrastructural correlates of functional relationships between nigral dopaminergic or cortical afferent fibers and neuropeptide Y-containing neurons in the rat striatum. *Neurosci Lett.* 1989; 100(1-3):99-104.
41. Adrian TE, Allen JM, Bloom SR, Ghatei MA, Rossor MN, Roberts GW, et al. Neuropeptide Y distribution in human brain. *Nature.* 1983; 306(5943):584-586.
42. Decressac M, Barker RA. Neuropeptide Y and its role in CNS disease and repair. *Exp Neurol.* 2012; 238(2):265-272.
43. Parker JA, Bloom SR. Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. *Neuropharmacology.* 2012; 63(1):18-30.

44. Dyzma M, Boudjeltia KZ, Faraut B, Kerkhofs M. Neuropeptide Y and sleep. *Sleep Med Rev.* 2010; 14(3):161-165.
45. Gray WP. Neuropeptide Y signalling on hippocampal stem cells in health and disease. *Mol Cell Endocrinol.* 2008; 288(1-2):52-62.
46. Khor EC, Baldock P. The NPY system and its neural and neuroendocrine regulation of bone. *Curr Osteoporos Rep.* 2012; 10(2):160-168.
47. Zeltser LM, Seeley RJ, Tschöp MH. Synaptic plasticity in neuronal circuits regulating energy balance. *Nat Neurosci.* 2012; 15(10):1336-1342.
48. Deng W, Aimone JB, Gage FH. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci.* 2010; 11(5):339-350.
49. Rafael Coveñas, Luis Aguilar. Avances en Neurociencias. Neuropeptidos: Investigación. básica y clínica. 1st ed. Lima. Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas. 2010
50. George Paxinos, Charles Watson. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 4th edit. The United States of America. 1998.
51. Delattre AM, Kiss A, Szawka RE, Anselmo-Franci JA, Bagatini PB, Xavier LL, et al. Evaluation of chronic omega-3 fatty acids supplementation on behavioral and neurochemical alterations in 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease. *Neurosci Res.* 2010; 66(3):256-264.
52. Gamboa J, Macarlupú JL, Rivera-Chira M, Monge-C C, León-Velarde F. Effect of domperidone on ventilation and polycythemia after 5 weeks of chronic hypoxia in rats. *Respir Physiol Neurobiol.* 2003; 135(1):1-8.
53. Coveñas R, Mangas A, Medina LE, Sánchez ML, Aguilar LA, Díaz-Cabiale Z, Narváez JA. Mapping of somatostatin-28 (1–12) in the alpaca diencephalon. *Journal of Chemical Neuroanatomy.* 2011; 42: 89–98.
54. Beal MF. Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. *Ann Neurol.* 1998; 44(3 Suppl 1):S110-114.
55. Perumal AS, Gopal VB, Tordzro WK, Cooper TB, Cadet JL. Vitamin E attenuates the toxic effects of 6-hydroxydopamine on free radical scavenging systems in rat brain. *Brain Res Bull.* 1992; 29(5):699-701.

56. Shalavadi MH, Chandrashekhar VM, Avinash SP, Sowmya C, Ramkishan A. Neuroprotective activity of *Stereospermum suaveolens* DC against 6-OHDA induced Parkinson's disease model. *Indian J Pharmacol.* 2012; 44(6):737-743.
57. LaManna JC, Chavez JC, Pichiule P. Structural and functional adaptation to hypoxia in the rat brain. *J Exp Biol.* 2004; 207(Pt 18):3163-3169.
58. Benderro GF, LaManna JC. Hypoxia-induced angiogenesis is delayed in aging mouse brain. *Brain Res.* 2011; 1389:50-60.
59. Schwarting R, Huston J. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Progress in Neurobiology.* 1996; 50(2-3):275-331
60. Park YG, Shin HS, Chang JW, Chung SS. The Significance of Apomorphine-Induced Rotational Behavior in Partial Lesioned Rat Parkinsonian Models with 6-hydroxydopamine. *Journal of Korean Neurosurgical Society.* 1996; 25(3): 483-492.
61. La Padula, Pablo Hugo. Adaptación del miocardio de rata a la hipoxia hipobárica crónica. Actividad mecánica y mecanismos celulares [tesis doctoral]. Argentina: Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 2010
62. Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol.* 1968;5(1):107-110.
63. Porter CC, Totaro JA, Stone CA. Effect of 6-hydroxydopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 1963; 140:308-316.
64. Tissue expression of NPY - Mouse brain - The Human Protein Atlas [Internet]. [citado 3 de enero de 2018]. Disponible en: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000122585-NPY/tissue/mouse+brain>
65. Zhang X, van den Pol AN. Hypothalamic arcuate nucleus tyrosine hydroxylase neurons play orexigenic role in energy homeostasis. *Nat Neurosci.* 2016; 19(10):1341-1347.

66. Borkar CD, Upadhya MA, Shelkar GP, Subhedar NK, Kokare DM. Neuropeptide Y system in accumbens shell mediates ethanol self-administration in posterior ventral tegmental area. *Addict Biol.* 2016; 21(4):766-775.
67. Abrahamson EE, Moore RY. The posterior hypothalamic area: chemoarchitecture and afferent connections. *Brain Res.* 2001; 889(1-2):1-22.
68. Luis J. Santín, José A. Aguirre, Sandra R., Azucena B., Rubén M. and Jorge L. Arias. Spatial memory and c-fos expression in supramammillary nucleus, anterior cingulate gyrus and entorhinal cortex. *Psicothema.* 2001; 13(2):214-221
69. Lewis MM, Du G, Kidacki M, Patel N, Shaffer ML, Mailman RB, et al. Higher iron in the red nucleus marks Parkinson's dyskinesia. *Neurobiol Aging.* 2013; 34(5):1497-1503.
70. Ackland GL, Noble R, Hanson MA. Red nucleus inhibits breathing during hypoxia in neonates. *Respir Physiol.* 1997; 110(2-3):251-260.
71. Waites BA, Ackland GL, Noble R, Hanson MA. Red nucleus lesions abolish the biphasic respiratory response to isocapnic hypoxia in decerebrate young rabbits. *J Physiol (Lond).* 1996; 495 (Pt 1):217-225
72. Wahlestedt C, Skagerberg G, Ekman R, Heilig M, Sundler F, Håkanson R. Neuropeptide Y (NPY) in the area of the hypothalamic paraventricular nucleus activates the pituitary-adrenocortical axis in the rat. *Brain Res.* 1987; 417(1):33-38.

ANEXOS

Figura 1: Guía de ruta	7
Figura 2: Aparato estereotáxico.....	8
Figura 3: Libro de coordenadas estereotáxica.....	9
Figura 4: Inyección de 6-hidroxidopamina en animal.....	9
Figura 5: Cámara hipobárica.....	10
Figura 6: monitoreo de cámara hipobárica.....	10
Figura 7: Test rotacional.....	11
Figura 8: Perfusión.....	12
Figura 9: Vibratomo.....	12
Figura 10: inmunohistoquímica Parkinson hemisferio izquierdo.....	20
Figura 11: inmunohistoquímica Parkinson hemisferio derecho.....	20
Figura 12: inmunohistoquímica Sham hemisferio izquierdo.....	21
Figura 13: inmunohistoquímica Sham hemisferio derecho.....	21
Figura 14: inmunohistoquímica a nivel de bregma -3.60 mm.....	28
Figura 14 Recuadro "a"	29
Figura 14 Recuadro "b"	30
Figura 14 Recuadro "c"	31
Figura 14 Recuadro "d"	32
Figura 15: inmunohistoquímica a nivel de bregma -3.80 mm.....	33
Figura 16: inmunohistoquímica a nivel de bregma -4.16 mm.....	34
Figura 17: inmunohistoquímica a nivel de bregma -4.30 mm.....	35
Figura 17 Recuadro "a"	36
Figura 17 Recuadro "b"	37

Figura 17 Recuadro “c”	38
Figura 17 Recuadro “d”	39
Figura 18: inmunohistoquímica a nivel de bregma -5.30 mm.....	40
Figura 19: inmunohistoquímica a nivel de bregma -5.80 mm.....	41
Figura 20: inmunohistoquímica a nivel de bregma -6.04 mm.....	42
Figura 20 Recuadro “a”	43
Figura 20 Recuadro “b”	44
Figura 20 Recuadro “c”	45
Figura 20 Recuadro “d”	46
Figura 21: inmunohistoquímica a nivel de hipocampo de Sham.....	48
Grafica 1: Niveles de hematocrito.....	16
Grafica 2: Test de rotación	18
Tabla 1: Densitometría óptica de Tiroxinahidroxilasa.....	22 - 23
Tabla 2: Test Shapiro-Wilk	24
Tabla 3: ANOVA.....	25
Tabla 4: Test Tukey	26
Tabla 5: Tabla resumen de neuronas inmunoreactivas para NPY.....	47

