

**TESIS EN OPCIÓN AL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**El factor de crecimiento nervioso en la neurodegeneración
y el tratamiento neurorestaurativo**

AUTOR: Lic. Lourdes del Carmen Lorigados Pedre

TUTOR: DrC. Jorge A. Bergado Rosado

**CENTRO INTERNACIONAL DE RESTAURACIÓN
NEUROLÓGICA**

2003

ÍNDICE

Relación de abreviaturas	2
<i>SÍNTESIS</i>	3
<i>INTRODUCCIÓN</i>	4
<i>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</i>	8
I. Factor de crecimiento nervioso	8
II. Enfermedades neurodegenerativas y envejecimiento	15
III. Técnicas neurorestaurativas	26
IV. Métodos de detección del NGF	31
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	33
I. Diseño experimental	33
II. Materiales	38
III. Métodos de lesión y técnicas neurorestaurativas en los modelos experimentales	42
IV. Técnicas neurorestaurativas en pacientes con EP y EA	45
V. Determinación de NGF por técnica de EIE y ensayo de actividad biológica	46
VI. Evaluación conductual	49
VII. Evaluación bioquímica	51
VIII. Evaluación morfológica	52
IX. Procesamiento estadístico	53
<i>RESULTADOS</i>	54
I. Detección de actividad biológica y cuantificación de β -NGFm	54
II. Disponibilidad del NGF en procesos neurodegenerativos	61
III. Efecto del tratamiento neurorestaurador sobre el contenido de NGF	71
<i>DISCUSIÓN</i>	80
I. Método de detección de actividad biológica y cuantificación del β -NGFm	80
II. Contenido de NGF en procesos neurodegenerativos clínicos y experimentales	83
III. Efectos del tratamiento neurorestaurador sobre el contenido de NGF	88
IV. Consideraciones sobre los niveles endógenos de NGF	92
<i>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</i>	95
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	97
I. Referencias bibliográficas	97
II. Autobibliografía, Agradecimientos	115

RELACIÓN DE ABREVIATURAS

6-OHDA: 6-hidroxidopamina
AP: anteroposterior
AQ: ácido quinolínico
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
ASB: albúmina sérica bovina
BDNF: factor de crecimiento derivado del cerebro
DE: desviación estándar
DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DV: dorsoventral
EA: enfermedad de Alzheimer
EH: enfermedad de Huntington
EIE: ensayo inmunoenzimático
EP: enfermedad de Parkinson
GABA: ácido gamma-aminobutírico
GFAP: proteína fibrilar glial ácida
HPLC-rp: cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa
HVA: ácido homovanílico
i m: intramuscular
i p: intraperitoneal
ICV: intracerebroventricular
LCR: líquido cefalorraquídeo
ML: mediolateral
MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NGF: factor de crecimiento nervioso
NT: neurotrofina
STF: solución tampón de fosfato
SDS: sodio dodecilsulfato
SN: sistema nervioso
SNC: sistema nervioso central
SNP: sistema nervioso periférico
 β -NGFm: fracción β del factor de crecimiento nervioso murino
STT: solución tampón de tris
TH: tirosina hidroxilasa
Trk: quinasa tirosínica o quinasa relacionada con la tropomiosina

SÍNTESIS

La hipótesis neurotrófica atribuye a los factores neurotróficos, entre ellos el factor de crecimiento nervioso, una acción principal en la supervivencia de las neuronas. La disponibilidad de estos factores resulta imprescindible para mantener la vida y expresión fenotípica neuronal. El propósito del presente trabajo fue evaluar el contenido del factor de crecimiento nervioso en modelos experimentales de neurodegeneración y en enfermedades neurodegenerativas entre ellas la enfermedad de Alzheimer, Parkinson y Huntington, así como, evaluar el efecto que sobre el contenido de dicho factor neurotrófico tienen el trasplante y la terapia trófica, aplicadas en diferentes paradigmas de neurodegeneración.

El contenido del factor de crecimiento nervioso en suero y en tejido nervioso fue medido por medio de un ensayo inmunoenzimático en la lesión nigral, estriatal, colinérgica y en animales viejos. De igual forma fue cuantificado en pacientes con enfermedad de Parkinson, Huntington y Alzheimer. En todos estos casos fue evaluada además, la afectación que produce en el contenido del factor de crecimiento nervioso la aplicación de técnicas neurorestaurativas como el trasplante neural y la terapia neurotrófica intracerebroventricular.

El ensayo de actividad biológica para el factor de crecimiento nervioso al ser aplicado a las muestras de suero humano normales evidenció la presencia de sustancias inhibitoras de la actividad biológica de este factor. De igual forma, el ensayo inmunoenzimático empleado para cuantificar el factor de crecimiento nervioso fue específico para el estudio de los niveles de esta neurotrofina en las muestras de suero humano y de monos, no así, para la detección de otras neurotrofinas como la Neurotrofina-3 y el factor de crecimiento derivado del cerebro.

Los resultados de este trabajo describen por primera vez la disminución en el contenido del factor de crecimiento nervioso en las enfermedades de Parkinson y Huntington y evidencian que los procesos neurodegenerativos se acompañan de cambios en el contenido del factor de crecimiento nervioso y que estos cambios varían de acuerdo al estadio de la enfermedad y no dependen, al menos para la enfermedad de Parkinson, del tratamiento medicamentoso. Los niveles del factor de crecimiento nervioso son modificados por el uso de técnicas neurorestaurativas, produciéndose un incremento de este factor en aquellos paradigmas en que se aplica de forma combinada el trasplante y la terapia trófica.

INTRODUCCION

Los últimos 20 años han sido históricamente importantes en el desarrollo del conocimiento sobre el Sistema Nervioso Central (SNC), en especial, en el entendimiento de la etiopatogenia de las enfermedades neurodegenerativas y en la búsqueda de nuevas vías terapéuticas para su tratamiento.

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por un síndrome clínico definido, etiología, en la mayoría de los casos aún desconocida, tienen como factor de riesgo las edades avanzadas y se manifiestan con un curso progresivo y crónico (Krogsgaard-Larsen, 1993). El marcador patológico común para estos trastornos es la pérdida de grupos de neuronas específicas, por ejemplo: la degeneración de las neuronas dopaminérgicas nigrales es un factor clave en la enfermedad de Parkinson (Collier and Sortwell, 1999); en la enfermedad de Alzheimer, lo es la pérdida degenerativa de neuronas septohipocampales, serotoninérgicas y corticales (Siegel and Chauhan, 2000) y en la enfermedad de Huntington, la muerte de las neuronas gabaérgicas de proyección del estriado (Emerich et al. 1997).

Las neurotrofinas son proteínas que promueven la diferenciación, crecimiento y supervivencia de muchas poblaciones de neuronas periféricas y del SNC durante el desarrollo y la vida adulta (Korsching et al. 1985; Lewin and Barde, 1996; Orike et al. 2001; Whittemore et al. 1986). El Factor de Crecimiento Nervioso (del inglés: *nerve growth factor*, NGF), es el miembro más conocido y estudiado de dicha familia, compuesta además, por el Factor de Crecimiento Derivado del Cerebro y las Neurotrofinas 3, 4/5, 6 y 7 (Lai et al. 1998; Nilsson et al. 1998). En las últimas décadas se han realizado avances significativos en el conocimiento del papel biológico de estos factores, su caracterización molecular y regulación, así como sus mecanismos de señalización; sin embargo, poco se conoce sobre el papel que juegan los factores neurotróficos en las enfermedades neurodegenerativas.

Los principales modelos experimentales que mimetizan los procesos neurodegenerativos en humanos han sido desarrollados en roedores y monos; en especial, la lesión nigral utilizando las neurotoxinas 6-hidroxidopamina y 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina reproducen las principales características de la enfermedad de Parkinson, mientras que la lesión de la vía septohipocampal y el envejecimiento cerebral con déficit cognitivo modela los trastornos de memoria observados en la enfermedad de Alzheimer. De igual forma, la lesión del estriado con ácido quinolínico es un buen biomodelo de la enfermedad de Huntington (Gu, Yu and Perez-Polo, 1998a; Kordower, Isacson and Emerich, 1999). En estos biomodelos, se han probado

múltiples técnicas terapéuticas neurorestaurativas y/o neurotróficas. Entre estas se encuentra el trasplante, la terapia trófica o la combinación de ambas. Los hallazgos de las evaluaciones de dichos tratamientos en modelos experimentales de neurodegeneración sugieren efectos beneficiosos, así como la participación en estos procesos de mecanismos bioquímicos relacionados con el NGF (Mandel et al. 1999; Menei et al. 2000).

Ya desde 1951 Levi-Montalcini propuso la Hipótesis Neurotrófica al plantear que la supervivencia neuronal específica es dependiente y regulada por factores neurotróficos sintetizados en cantidades limitadas por las áreas blanco (Levi-Montalcini and Hamburger, 1951). A pesar de que esta hipótesis se basa en estudios del Sistema Nervioso durante el desarrollo, la función de las neurotrofinas en el Sistema Nervioso adulto y su potencial disfunción en el envejecimiento y en las enfermedades neurodegenerativas ha comenzado a ser de gran interés en el campo de las Neurociencias actuales. La Hipótesis Neurotrófica supone la posibilidad de que la degeneración de poblaciones neuronales específicas en el envejecimiento y en los procesos patológicos, sea consecuencia de la pérdida del acceso a los factores neurotróficos (Appel, 1981). Más tarde, Hefti planteó que el NGF exógeno puede ser usado para prevenir o disminuir la atrofia relacionada con la enfermedad de Alzheimer ya que el contenido de NGF endógeno por neuronas colinérgicas centrales puede ser afectada por una variedad de mecanismos y el más obvio parece ser la pérdida del NGF de las áreas blanco (Hefti, Hartikka and Knusel, 1989).

Investigaciones dirigidas a la búsqueda de nuevos tratamientos para las enfermedades neurodegenerativas como las de Alzheimer, Parkinson y Huntington ocupan en la actualidad a un número creciente de instituciones científicas. Entre los posibles tratamientos se evalúan los factores neurotróficos, entre ellos el NGF con probada acción sobre afecciones del SNC y se desarrollan técnicas de trasplante experimental con vistas a ampliar la información sobre su utilidad real.

El desarrollo de investigaciones que nos permitan conocer el papel del NGF en la etiopatogenia de las enfermedades neurodegenerativas, en especial, la posibilidad de dilucidar si se producen cambios en los niveles endógenos de NGF y si estos cambios son consecuencia de la neurodegeneración que se produce en estas enfermedades o, contrario a esto, son la causa de la enfermedad propiamente dicha, es uno de los aspectos que en la actualidad son ampliamente investigados.

HIPÓTESIS

Los procesos neurodegenerativos se acompañan de cambios en el contenido de NGF endógeno. Los tratamientos neurorestaurativos (trasplante o terapia trófica) modifican los niveles de NGF y pueden influir sobre el curso de la enfermedad.

OBJETIVOS

1. Evaluar los cambios en los niveles de NGF en procesos neurodegenerativos en humanos.
2. Evaluar los cambios en los niveles de NGF en modelos experimentales de neurodegeneración.
3. Evaluar la influencia de técnicas neurorestaurativas sobre el contenido de NGF en la neurodegeneración clínica y experimental.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar un método inmunoenzimático específico y sensible para medir niveles de NGF en tejidos y suero. Detectar la actividad biológica del NGF presente en suero humano.
2. Medir los niveles de NGF en muestras de suero de pacientes con enfermedad de Alzheimer, Parkinson y Huntington.
3. Evaluar los efectos del daño dopaminérgico, la lesión estriatal y el daño colinérgico, sobre los niveles de NGF como modelos animales de las enfermedades citadas en el objetivo anterior.
4. Evaluar los efectos del tratamiento neurorestaurador (trasplante y terapia trófica) sobre los niveles de NGF.
5. Evaluar la influencia de la edad sobre el contenido de NGF.

NOVEDAD CIENTÍFICA E IMPORTANCIA TEÓRICA Y PRÁCTICA

Si bien la temática de esta tesis constituye un punto de análisis de múltiples grupos de trabajo en el campo de las neurociencias actuales, se debe destacar, que para las enfermedades de Parkinson y Huntington los hallazgos obtenidos en relación con el comportamiento del NGF en dichas entidades (tanto en biomodelos como en pacientes) y las modificaciones que se aprecian después de los tratamientos neurorestauradores reportados en este trabajo, son descritos por primera vez en la literatura internacional, lo cual representa la principal **novedad científica** del mismo.

Otro resultado novedoso de la presente tesis lo constituye el desarrollo de métodos de detección (ensayo de actividad biológica) y cuantificación (ensayo inmunoenzimático) de la molécula de NGF por primera vez aplicados en nuestro país. Estos métodos permitieron evaluar el contenido de NGF en diferentes muestras biológicas.

La tesis tiene interés desde el punto de vista económico; 1 mg de NGF murino tiene un precio superior a los 1000,00 USD en el mercado internacional y su costo de producción en nuestras condiciones (según el procedimiento establecido en nuestro centro) es muy inferior (aproximadamente 80,00 USD). Es interesante destacar que hasta el momento han sido utilizados 15 mg de NGF murino en las diversas investigaciones descritas en esta tesis; entre ellas la utilización de este factor como estándar de los métodos de detección y cuantificación empleados.

Desde el punto de vista social, las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson y Huntington tienen cada vez una incidencia mayor, sobre todo, en aquellos países en que la expectativa de vida es alta. Las conclusiones de estos estudios amplían los conocimientos en el campo de la utilidad del NGF como factor protector en los modelos animales de lesión septohipocampal y estriatal. El NGF provoca además, una mejora funcional del cerebro envejecido.

Los resultados que forman parte de este trabajo han sido objeto de 12 publicaciones en revistas internacionales y han sido presentados en 26 eventos científicos internacionales.

Estos resultados constituyen parte integrante del Logro Científico Nacional otorgado por la Academia de Ciencias de Cuba en el año 1998 al trabajo denominado "Obtención y caracterización de la fracción β del factor de crecimiento nervioso".

Estos datos también conformaron dos ponencias una Destacada y otra Relevante en el XIII Forum de Ciencia y Técnica a nivel Municipal y de Centro respectivamente.

Este documento está constituido por 8 secciones: Introducción, Revisión Bibliográfica, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones y Recomendaciones, Referencias Bibliográficas y Autobiografía. Consta de 117 páginas, 33 figuras y 10 tablas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I. FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO

Durante el desarrollo del sistema nervioso (SN) de los vertebrados se produce un exceso de neuronas que proyectan sus axones hacia el mismo blanco (neuronal o no). Las poblaciones celulares inervadas producen cantidades limitadas de ciertas moléculas proteicas (neurotrofinas, NT) las cuales permiten la supervivencia de una fracción de las neuronas: aquellas que lograron captar y transportar retrógradamente un número suficiente de estas proteínas (Landreth, 1999; Meyer and Rasmussen, 1999). Este proceso asegura que las células blanco sean inervadas por el número y tipo correctos de fibras nerviosas (Fig. 1). Además de fijar la supervivencia, las NTs están implicadas en la proliferación, diferenciación y crecimiento axónico de las neuronas del SN en desarrollo (Korsching et al. 1985). Sin embargo, el efecto neurotrófico no es un fenómeno limitado a los estadios embrionarios. Las neuronas del organismo adulto demandan para conservar su funcionamiento de un suministro estable de NTs (Whittemore et al. 1986).

El Factor de Crecimiento Nervioso (del inglés: *Nerve Growth Factor*, NGF) es un miembro de la familia de las NTs que está compuesta además por el Factor de Crecimiento Derivado del Cerebro (del inglés: *Brain Derived Neurotrophic Factor*, BDNF), la Neurotrofina 3 (NT-3), la Neurotrofina 4/5 (NT 4/5) la Neurotrofina 6 (NT-6) y la Neurotrofina 7 (NT-7), siendo esta última la NT más recientemente descrita (Lai et al. 1998; Nilsson et al. 1998; Serrano-Sanchez and Diaz-Armesto, 1998). El NGF fue descubierto a través de una serie de experimentos conducidos por Rita Levi-Montalcini, Viktor Hamburger y Stanley Cohen, que culminaron con el aislamiento de la proteína y la producción del primer antisuero anti-NGF (Levi-Montalcini and Hamburger, 1951).

Estructura del NGF

El análisis de la secuencia de nucleótidos del gen para el NGF de diferentes especies ha mostrado que ésta proteína está altamente conservada en la escala filogenética (McKay, Purcell and Carew, 1999). La estructura primaria del NGF murino (NGFm) es muy similar a la del humano; sólo 12, de 118 aminoácidos, son diferentes (Barde, 1989).

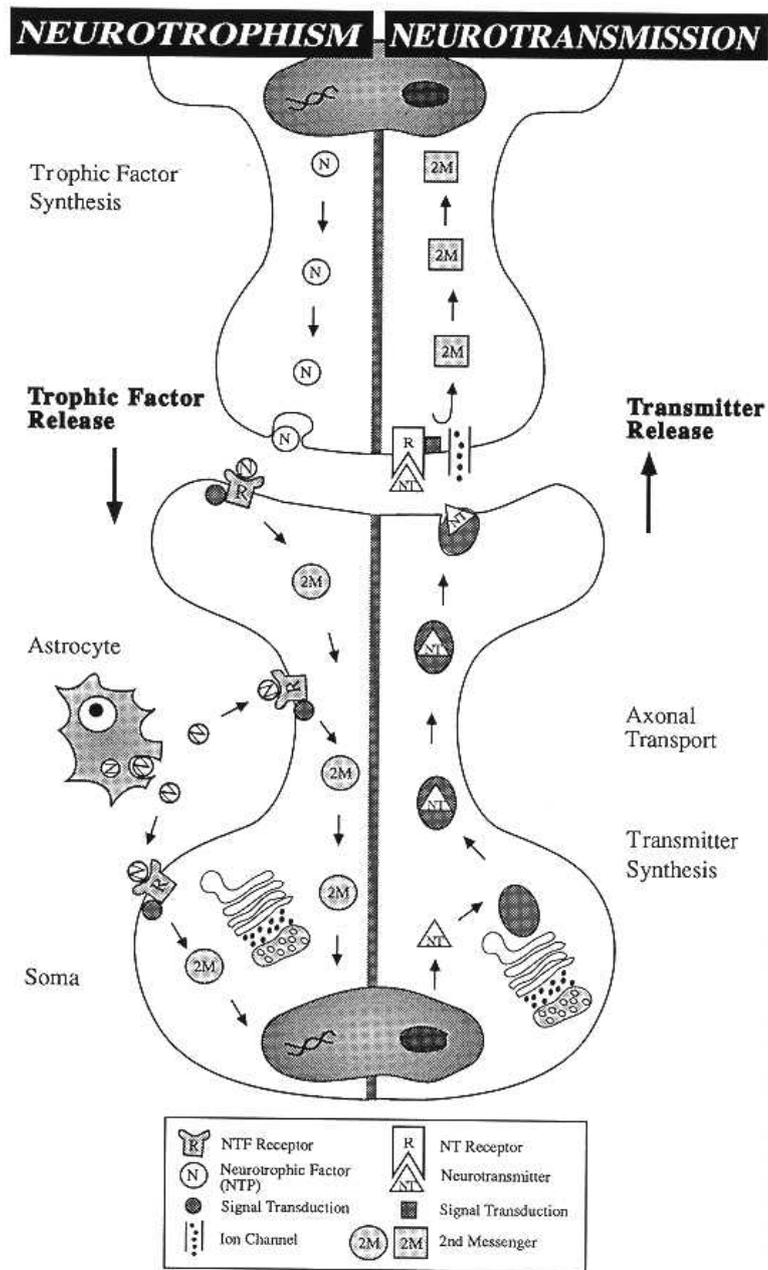


Figura 1. Efectos de los factores neurotróficos (FNT). Los FNT son sintetizados en neuronas blanco, liberados y captados por receptores específicos sobre las proyecciones de las neuronas. A través de la activación de segundos mensajeros, se produce la regulación de los procesos celulares específicos de crecimiento neuronal y supervivencia. Los FNT pueden ser también secretados por los astrocitos. Por otra parte, los neurotransmisores secretados influyen en la función de las neuronas blanco.

El NGF se ha aislado y purificado a partir de la glándula submaxilar de ratón, que constituye la fuente natural más abundante de esta proteína (Angeletti and Bradshaw, 1971). Esta proteína está constituida por un complejo pentamérico con dos subunidades α , una subunidad β y dos γ todas asociadas no covalentemente. La subunidad β (β -NGFm), que es la responsable de la actividad biológica del NGF, es un homodímero de 118 aminoácidos y 26.5 kDa. La proteína comienza en la porción amino terminal con serina y termina con arginina en la porción carboxilo terminal (Fig. 2). Cada cadena del homodímero presenta tres puentes disulfuros intracatenarios y se asocia con la otra cadena entre sí a través de interacciones no covalentes (Angeletti and Bradshaw, 1971).

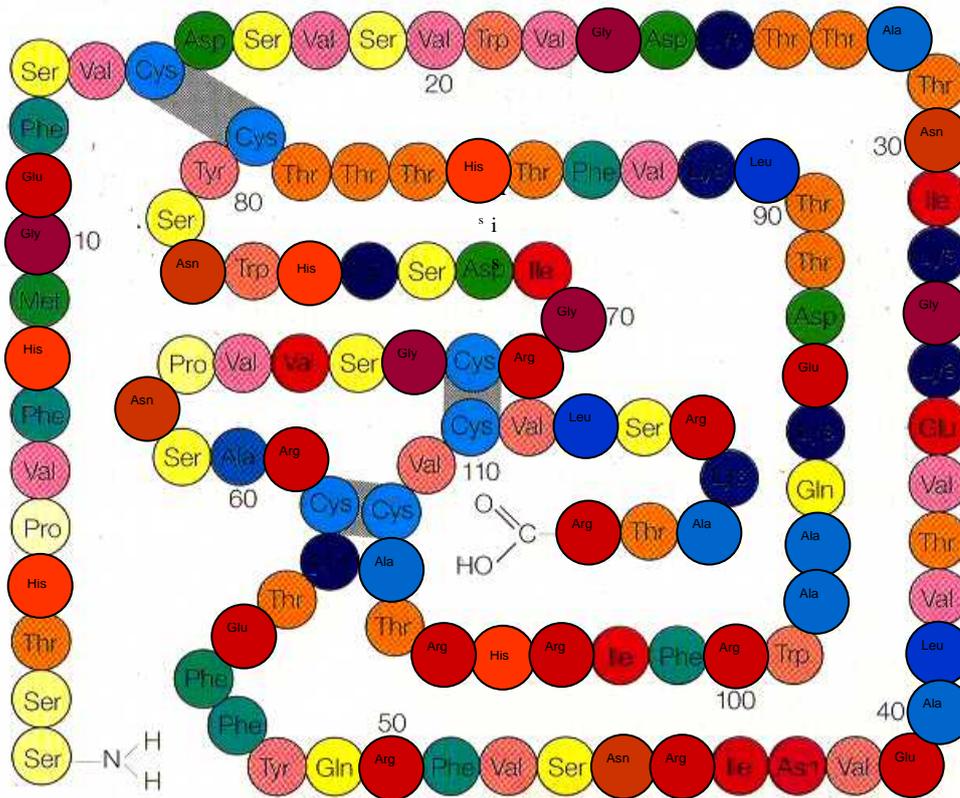


Fig. 2. Secuencia aminoacídica del β -NGFm.

Se ha reportado que las subunidades α y γ pudieran estar vinculadas con la regulación de los procesos de liberación y degradación del β -NGFm y brindar protección contra la acción de proteasas (Longo, Woo and Mobley, 1989).

Existen dos metodologías generales para el aislamiento de β -NGFm: la primera a partir del complejo pentamérico (Bocchini and Angeletti, 1969; Varon et al. 1972), y la segunda, a partir del homogenizado de glándula submaxilar sin previa separación del complejo (Mobley, Schenker and Shooter, 1976). La utilización de esta última metodología ha reportado como fuentes fundamentales de contaminación la renina y las gammaglobulinas murinas y modificaciones en los extremos de la proteína tales como: la pérdida de la arginina en el extremo C-terminal y la pérdida de ocho aminoácidos en el extremo N-terminal. Estas modificaciones ocurren al azar en la población molecular purificada y no alteran la actividad biológica del producto (Longo, Woo and Mobley, 1989).

Receptores

Como otros factores de crecimiento, el NGF exhibe su efecto biológico después de interactuar con su receptor específico en la superficie de la célula. La estructura de los receptores está formada por tres dominios: extracelular, transmembrana e intracelular. La porción extracelular contiene los sitios de unión al ligando, mientras que el dominio intracelular contiene una unidad de señalización definida, una tirosina quinasa (Friedman and Greene, 1999).

En general, se han caracterizado dos tipos de receptores para las NTs, uno de baja afinidad denominado p75, que se expresa en neuronas y células gliales y que tiene entre sus principales funciones: la regulación de la apoptosis neuronal, el transporte retrógrado de NTs, la cooperación con los receptores de alta afinidad en la unión a las NTs y secuestro de las NTs circulantes (Barker, 1998; Barrett, 2000; Dobrowsky and Carter, 2000; Ebadi et al. 1997; Kaplan and Miller, 2000; MacPhee and Baker, 1999; Reynolds, Bartlett and Hendry, 2000; Springer and Kitzman, 1998).

El otro tipo de receptor, el de alta afinidad, pertenece a la familia tirosina quinasa (del inglés: *tropomyosin-related kinase*, Trk) y muestra una gran especificidad por los diversos miembros de la familia de las NTs. Son tres los genes que codifican la síntesis de los subtipos de receptores: TrkA, TrkB y TrkC. Los receptores TrkA enlazan al NGF y posiblemente a la NT-6 y a la NT-7, los TrkB al BDNF y a la NT 4/5 y los TrkC a la NT-3. A través de estos receptores es que ocurre, fundamentalmente, la transducción de la señal de las NTs (Froestl, 2000; Landreth, 1999).

La activación de los receptores Trk se produce después de la interacción con su ligando y la internalización del complejo receptor-ligando. Este complejo queda, entonces, en la pared de una vesícula cuyo lumen representa el compartimento extracelular y hacia cuyo exterior queda el dominio con actividad tirosina quinasa. Luego de la dimerización y autofosforilación en los residuos de tirosina, el receptor es capaz de activar por fosforilación o interacción alostérica a sus ligandos intracelulares (Lau and Huganir, 1999). La vesícula, llamada endosoma señalizante, es retrógradamente transportada al soma donde continúa generando segundos mensajeros que, de este modo, logran alcanzar el núcleo celular. La cadena de reacciones citosólicas y nucleares que estos mensajeros inician es responsable de los efectos moleculares a corto plazo (ej. aumentos en la expresión de factores de transcripción como c-fos y c-jun) y a largo plazo (ej. síntesis incrementada de neurofilamentos) de las neurotrofinas (Cruz-Aguado, 2001).

Distribución y actividad biológica del NGF

El clásico concepto de factores neurotróficos derivados del blanco, señales que actúan retrógradamente y regulan la supervivencia neuronal durante el desarrollo, fue primeramente establecido en el SN periférico (SNP), en particular, en las neuronas simpáticas (Lewin and Barde, 1996). Contrario a lo que ocurre en el SNP, el papel fundamental de los factores tróficos en el SNC es la regulación bioquímica y diferenciación morfológica, más que la regulación de la supervivencia y el desarrollo (Hefti, 1997b).

El NGF es expresado por las células gliales y neuronas del SNP. En el SNC es producido en condiciones fisiológicas mayoritariamente por las neuronas y se activa la síntesis glial en casos de agresiones al cerebro (Bresjanac and Antauer, 2000). La liberación de la proteína hacia el espacio extracelular se realiza por dos vías: constitutiva y regulada por la actividad neuronal. Esta última es dependiente del sodio extracelular y el calcio intracelular (Blochl and Thoenen, 1995).

Los niveles endógenos de NGF y su ácido ribonucleico mensajero (ARNm) aumentan durante el desarrollo del hipocampo comúnmente con la inervación de esta área por proyecciones colinérgicas del cerebro basal. Al mismo tiempo, el NGF, pero no el ARNm, aumenta en el septo, lo que sugiere un transporte retrógrado desde el sitio blanco (Whittemore et al. 1986). Los receptores de baja afinidad (p75) y su ARNm han sido identificados también en neuronas del cerebro anterior durante el desarrollo. Estos hallazgos son consistentes con el hecho de que el NGF es sintetizado en las áreas blanco y transportado retrógradamente a las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior (Korsching and Thoenen, 1987).

Los receptores TrkA se localizan mayoritariamente en las neuronas sensoriales (noci- y termoceptivas) y simpáticas del SNP, así como en las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior y el estriado. Neuronas del hipocampo, el tálamo y el tallo cerebral expresan el TrkA, pero en menor grado. Estos receptores se distribuyen homogéneamente en los somas y prolongaciones de las neuronas (Toma et al. 1997).

El papel fisiológico del NGF durante el desarrollo ha sido demostrado mediante el bloqueo de las neuronas colinérgicas de rata con anticuerpos anti-NGF (Vantini et al. 1989). Funcionalmente el NGF tiene múltiples y variados efectos en el SNC o fuera del mismo. En el SN, el NGF tiene una amplia gama de actividades muy bien documentadas, incluyendo el bloqueo de la muerte natural de neuronas sensoriales y simpáticas en desarrollo, el restablecimiento funcional de neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior después de la axotomía, la inducción de proliferación y diferenciación de células cromafines adrenales adultas y un apoyo autocrino a neuronas granulares cerebelares durante la ontogenia (Castellanos-Ortega, Cruz-Aguado and Martinez-Marti, 1999).

Los efectos del NGF sobre poblaciones no neuronales comienzan a ser apreciados. De particular interés es el efecto del NGF sobre la hematopoyesis y el Sistema Inmune. Se ha demostrado que la expresión de NGF puede ser estimulada por citoquinas, las hormonas tiroideas, esteroides, el factor de necrosis tumoral, proteasas y por el estrés (Ebadi et al. 1997; Micera et al. 1999; Micera, Vigneti and Aloe, 1998; Pan et al. 1997; Ebadi et al. 1997).

El NGF derivado de la microglia (células inmunes residentes en el SNC) puede funcionar como una molécula de señal entre el Sistema Inmune y el SN, directamente sustentando la supervivencia neuronal y/o indirectamente protegiendo la neurona al antagonizar efectos neurotóxicos. Se ha comprobado que la señal inflamatoria induce la expresión de NGF por la microglia como un primer mecanismo de protección contra un daño (Heese, Hock and Otten, 1998).

Hipótesis Neurotrófica y NGF en la neurodegeneración

La hipótesis neurotrófica establece que la supervivencia de los distintos grupos de neuronas durante el desarrollo depende del acceso de estas células a los factores neurotróficos que, actuando a través de receptores específicos, facilitan la supervivencia de las neuronas y favorecen su diferenciación, desarrollo e inervación del órgano diana. Cada grupo de neuronas responde de forma selectiva a uno o varios factores tróficos, en función de los receptores expresados en su membrana neuronal (García-Yébenes, 1997).

La hipótesis neurotrófica atribuye a los factores tróficos una acción principal en la supervivencia de las neuronas. De acuerdo con esta concepción, los factores neurotróficos producidos por el blanco son captados por las terminales presinápticas y transportados retrógradamente por las neuronas. El suministro continuo de un factor neurotrófico específico resulta imprescindible para mantener la vida y el fenotipo de las neuronas (Siegel and Chauhan, 2000). Partiendo de esta hipótesis, se ha planteado que la pérdida de un apoyo trófico endógeno derivado del blanco de poblaciones neuronales específicas puede causar las características neurodegenerativas de la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Alzheimer (EA) y otras enfermedades neurodegenerativas (Connor and Dragunow, 1998; Bradford et al. 1999). Este concepto ha reafirmado la importancia de examinar los patrones de cambios polipeptídicos en el ARNm de diferentes NTs y sus receptores; así como, los niveles de NTs en condiciones normales y patológicas. En las enfermedades neurodegenerativas es posible que cambios en la regulación de factores neurotróficos específicos o sus receptores sean críticos en el patrón de degeneración neural (Aguado et al. 1998). Estos factores pueden ser regulados diferencialmente en neuronas y células gliales y en diferentes subpoblaciones neuronales. También los factores tróficos pueden ser sujetos a cambios en la síntesis local o en el transporte hacia o por el tejido blanco. Entonces, son necesarios datos específicos de la célula, tanto de las regiones de degeneración como de las neuronas blanco en el cerebro humano, para generar una hipótesis probada de un único papel de los factores neurotróficos en estas enfermedades (Ibañez, 1998).

La posibilidad que las enfermedades neurodegenerativas sean el resultado de un reducido apoyo trófico fue por primera vez formalmente propuesto por Appel (Appel, 1981). En su trabajo, él sugiere que una posible causa de la degeneración neuronal en la EA, la EP y la esclerosis lateral amiotrófica es el reducido apoyo trófico desde la corteza, el estriado y el músculo esquelético, respectivamente. En otros artículos Hefti plantea que el NGF exógeno puede ser usado para prevenir o disminuir la atrofia del cerebro basal anterior relacionada con la EA (Hefti, Hartikka and Knusel, 1989).

La disponibilidad de NGF endógeno para las neuronas colinérgicas centrales puede ser afectada por una variedad de mecanismos y el más obvio es la pérdida del NGF de las áreas blanco. El primer reporte orientado hacia esta posibilidad midió niveles de ARNm para el NGF en 5 pacientes con EA y 5 controles (Goedert et al. 1986). Sin embargo, la disminución encontrada en los pacientes fue de un 20-25% y no mostró significación estadística. La posibilidad de que el nivel total de ARNm del NGF sea estable en la EA puede reflejar un

incremento relativo a nivel celular (Kordower, Gash and Bothwell, 1989) considerando, por ejemplo, la marcada atrofia hipocámpal y la pérdida neuronal que también ocurre en la EA (Davies et al. 1992). A pesar de que en estos momentos se afirma que los niveles de ARNm del NGF aumentan después de un trauma o enfermedad aún se desconoce sobre la fuente celular del mismo; para el caso específico de la EA, caracterizada por una extensa gliosis, pudieran ser las células gliales la fuente de los niveles totales de ARNm del NGF observados. En especial, en la EA y en los modelos experimentales desarrollados para el estudio de esta entidad, en contraste con la hipótesis original sobre el supuesto papel del NGF en la EA (Appel, 1981) los niveles de esta proteína no se reducen e incluso se plantea que están aumentados (Fahnestock et al. 1996; Hellweg et al. 1998b; Hock et al. 2000a; Hock et al. 2000b; Hock et al. 2000c). Roy detectó además la presencia de anticuerpos anti-NGF en pacientes con EA (Roy et al. 1988) aspecto que reviste gran interés y que podría ayudar a definir el significado real del NGF en esta enfermedad.

II. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS Y ENVEJECIMIENTO

Los trastornos neurodegenerativos se caracterizan por la pérdida progresiva de poblaciones neuronales específicas en diferentes regiones del SNC. La causa principal de estas enfermedades aún no se ha precisado. Diversos factores pueden jugar un papel importante en su etiología, incluyendo la formación de radicales libres, mecanismos autoinmunes y el papel de los aminoácidos excitatorios que pueden causar procesos de daño neuronal hasta la muerte (Krogsgaard-Larsen, 1993). Estos mecanismos no son autoexcluyentes, sino que pueden actuar simultáneamente y potenciarse uno al otro.

La muerte celular puede ocurrir por dos vías fundamentales, necrosis y apoptosis, con características morfobioquímicas diferentes. La apoptosis se caracteriza por su carácter programado, la ausencia de hinchazón y lisis celular y la necesidad de activación transcripcional. Este proceso está determinado por la activación/expresión de genes que codifican la síntesis de las llamadas proteínas suicidas. Morfológicamente, se presentan cambios nucleares degenerativos como condensación y fragmentación de la cromatina, picnosis y pérdida de la integridad hasta la desintegración. La apoptosis es un proceso organizado, inocuo para las células adyacentes e involucrado en la eliminación de las células "indeseadas" como parte de la homeostasis de los organismos pluricelulares (Hengartner, 2000; Thatté and Dahanukar, 1997; Herrero, 1997).

En este trabajo abordaremos tres enfermedades neurodegenerativas: la EP, la enfermedad de Huntington (EH) y la EA.

ENFERMEDAD DE PARKINSON

La EP es un síndrome neurodegenerativo que afecta primariamente a las neuronas productoras de dopamina de la sustancia negra, causando pobreza y lentitud en los movimientos, inestabilidad en la marcha y postura y temblor de reposo. Si bien los síntomas de la enfermedad pueden ser manejados por algún tiempo con determinadas drogas, el síndrome propiamente dicho es progresivo y la eficacia de las drogas va disminuyendo con el tiempo (Collier and Sortwell, 1999; Pascual, Berciano and Pazos, 1997; Stoessl, 1999). Los síntomas clínicos aparecen cuando ya existe entre un 70-80% de reducción de los niveles de dopamina en el estriado (Dunnett and Bjorklund, 1999).

La etiología y los mecanismos patogénicos de la EP son desconocidos. Se ha sugerido que la causa de la EP es multifactorial, interviniendo en la misma diversos factores genéticos y ambientales y el envejecimiento (Jiménez, 1997). Sin embargo, no existen datos suficientes que apoyen alguno de estos factores como único responsable. Los posibles mecanismos patogénicos supuestamente implicados en la EP (Jiménez, 1997) son:

- Estrés oxidativo
- Alteraciones de la función mitocondrial
- Excitotoxicidad
- Déficit de proteínas ligadoras de calcio
- Déficit de factores tróficos
- Acción de citoquinas

La gran mayoría de los casos de EP son idiopáticos, no obstante, diferentes daños cerebrales pueden ocasionar parkinsonismo, como: infecciones, toxinas, agentes farmacológicos y traumas de cráneo (Emgard, 2001). También se han descrito formas hereditarias de la EP (Goldberg and Lansbury, 2000). Los genes α -sinucleína y Parkin se han asociado con la forma familiar de la EP (Hattori et al. 2000), la mutación del gen Parkin es autosómica recesiva y se piensa que es responsable de algunos tipos de EP de aparición temprana (Shimizu et al. 2000) mientras que las mutaciones del gen de la α -sinucleína están relacionadas con formas dominantes de EP familiar (Goldberg and Lansbury, 2000).

La terapia estándar para la EP es la administración oral de una combinación de levodopa (L-dopa) y carbidopa. La L-dopa es el aminoácido precursor de la dopamina, la carbidopa impide la conversión de L-dopa a dopamina en el tejido periférico. La conversión de L-dopa a

dopamina en el cerebro, particularmente en el estriado, provoca una mejoría inicial de los pacientes. Con el uso prolongado de estas drogas comienzan a producirse efectos adversos y puede llegar a perderse la eficacia terapéutica de las mismas, todo lo cual permite aseverar que el suplemento exógeno de dopamina sin que se estabilice o promueva la regeneración de la población de neuronas dopaminérgicas dañadas, sigue siendo una solución temporal e inadecuada del problema (Kurth et al. 1997; Martínez, 1997; Olanow and Tatton, 1999; Vela, Linazasoro and Obeso, 1997).

Varias evidencias sugieren que la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la EP provoca alteraciones en el funcionamiento de los núcleos grises de la base. Los núcleos de la base requieren para su funcionamiento del equilibrio entre los distintos sistemas de neurotransmisores que en ellos interactúan, garantizándose de esta forma un perfecto procesamiento de la información en los circuitos que enlazan la corteza cerebral, los núcleos de la base y el tálamo (Fig. 3). Estos núcleos son agrupaciones de cuerpos neuronales situados en la base de los hemisferios cerebrales e incluyen: el estriado (caudado y putamen), el globo pálido, la sustancia negra y el núcleo subtalámico (Escobar and Pimienta, 1998).

Los núcleos de la base están situados debajo de la corteza cerebral y entre las fibras córticofugales, sitio ideal para interactuar o actuar en conjunción con la corteza cerebral. Dentro de este grupo, el estriado juega un papel fundamental debido a que en él convergen numerosas vías glutamatérgicas procedentes de todas las áreas funcionales de la corteza cerebral (fundamentalmente de la sensorimotora, asociativa y límbica). También recibe terminales axónicas glutamatérgicas procedentes del tálamo y dopaminérgicas de la sustancia negra parte compacta. En los primates, el estriado se divide morfofuncionalmente en caudado y putamen. El blanco principal de la aferencia que recibe el estriado son las neuronas espinosas de talla media. Estas neuronas integran la información y la conducen a las áreas inervadas por el estriado: el globo pálido, externo e interno, y la sustancia negra parte reticulada, que son los núcleos de salida de los núcleos de la base (Rodríguez, 1997).

Las neuronas espinosas de talla media constituyen aproximadamente el 95% del total de neuronas estriatales. Su neurotransmisor principal es el ácido γ -aminobutírico (GABA) y se dividen a su vez en dos poblaciones según el neuropéptido cotransmisor que coexpresan: encefalina o sustancia P/ dinorfina. Las neuronas que contienen GABA y encefalina proyectan sus terminales hacia el globo pálido externo mientras que las que contienen GABA y sustancia P/ dinorfina proyectan sus terminales hacia el globo pálido interno y la sustancia negra parte reticulada (Sian, 1999).

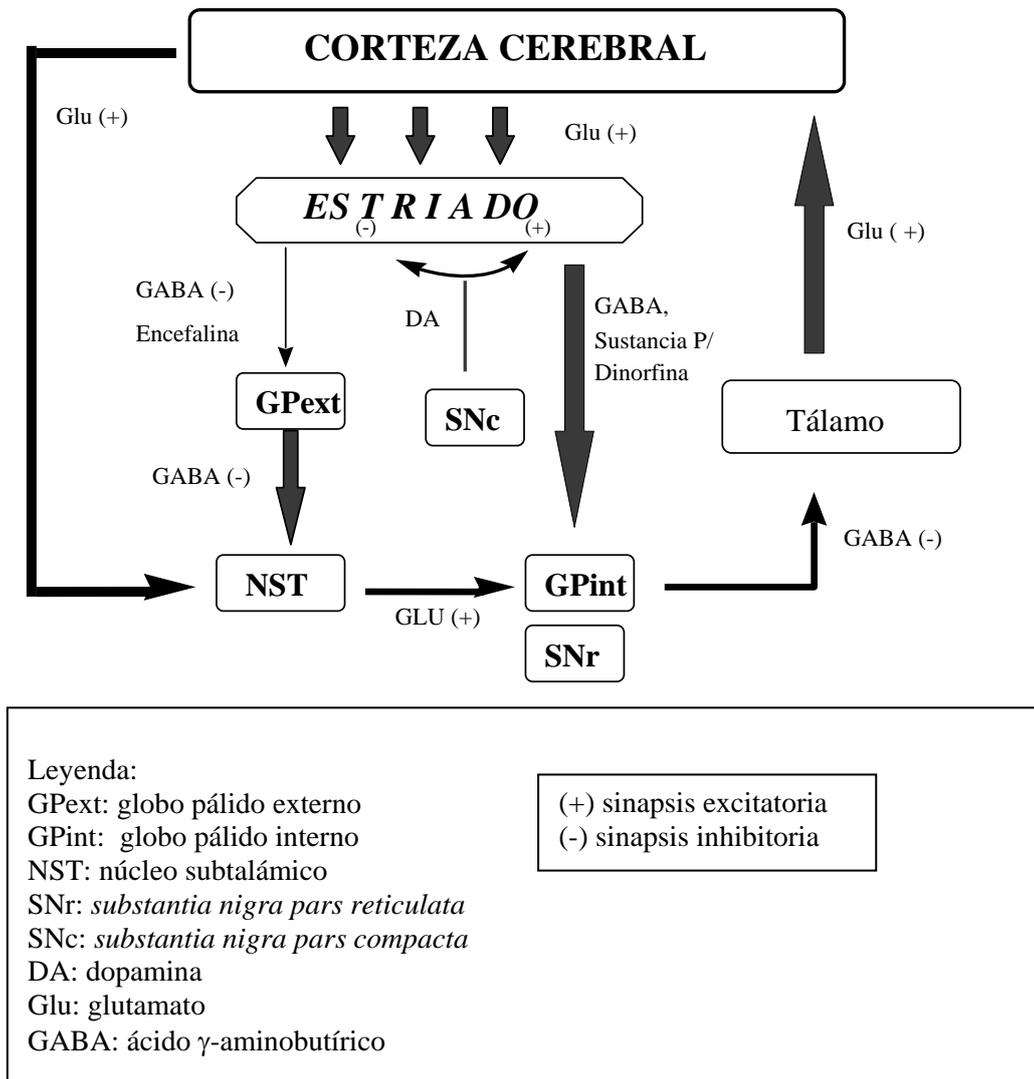


Figura 3. Circuito motor de los ganglios basales.

Modelos experimentales de EP

Todos los modelos experimentales desarrollados para la EP implican un daño de la sustancia negra o de los axones de la vía nigro-estriatal con el objetivo de lograr una disminución drástica de la dopamina estriatal. Los métodos primarios consistieron en dañar el sistema nigro-estriatal ya sea por transección quirúrgica de los axones nigrales, por la infusión de 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) próximo al sistema dopaminérgico o por la administración de la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) o sus metabolitos tóxicos (1-metil-4-fenilpiridinio, MPP+) (Tabla 1).

Tabla 1: Características y limitaciones de los biomodelos de enfermedad de Parkinson (EP).

Modelo experimental de EP	Características	Limitaciones
Transección nigroestriatal (ratas)	<ul style="list-style-type: none"> • depleción de dopamina estriatal • evaluación conductual 	<ul style="list-style-type: none"> • daño no específico • lesión aguda • no relación con la etiopatología de la EP • conducta no-parkinsoniana
6-OHDA (ratas)	<ul style="list-style-type: none"> • depleción de dopamina estriatal • lesión nigral específica • daño gradual de la sustancia negra • evaluación conductual cuantificable 	<ul style="list-style-type: none"> • lesión aguda • relación desconocida con la etiopatología de la EP • conducta no-parkinsoniana
MPTP (ratón)	<ul style="list-style-type: none"> • disminución bilateral de la dopamina estriatal • lesión nigral específica • daño gradual de la sustancia negra • evaluación conductual cuantificable 	<ul style="list-style-type: none"> • lesión aguda • sensibilidad variable • recuperación espontánea • relación desconocida con la etiopatología de la EP
MPTP (monos)	<ul style="list-style-type: none"> • depleción dopamina estriatal. • lesión nigral específica • daño gradual de la sustancia negra • evaluación conductual cuantificable • conducta parkinsoniana • especie más cercanamente relacionada 	<ul style="list-style-type: none"> • lesión aguda • sensibilidad variable • recuperación espontánea • relación desconocida con la etiopatología de la EP

El biomodelo de EP utilizado más frecuentemente en roedores es el de la inyección de la neurotoxina 6-OHDA. A bajas concentraciones en el cerebro, la 6-OHDA es una toxina específica que es activamente secuestrada por las neuronas dopaminérgicas (Alvarez et al. 1998; Blanco et al. 2000; Bowenkamp, Lapchak and Hoffer, 1996; López and Brera, 1997; Winkler et al. 2000). Lo más frecuente es que esta neurotoxina sea utilizada para provocar una degeneración severa de la sustancia negra de uno de los hemisferios cerebrales, mientras que el otro hemisferio permanece con la sustancia negra intacta. Una ventaja de este modelo unilateral de lesión nigral es que se produce un síndrome motor asimétrico y una conducta rotacional cuantificable en respuesta a la administración de drogas que provocan la liberación de dopamina o directamente activan los receptores para la dopamina (D-anfetamina y apomorfina) (Collier and Sortwell, 1999; Ungerstedt and Arbuthnott, 1970). Entre las principales ventajas de este modelo está su relativa especificidad para lesionar neuronas dopaminérgicas y la facilidad de medir conductualmente el grado de la lesión, todo lo cual, le confiere atributos que lo hacen el modelo más universalmente utilizado.

No obstante, el modelo animal más completo de EP es el provocado por la neurotoxina MPTP. Este producto fue descubierto como un contaminante de un narcótico sintético que se vio producía signos clínicos de EP en jóvenes adictos (Heikkila, Hess and Duvoisin, 1984). Cuando el MPTP se administra en monos, se observa una sensibilidad a la toxina similar a la observada en humanos. Estos monos rápidamente muestran signos conductuales de EP, mimetizan el patrón de degeneración nigral y de depleción de dopamina estriatal y responden al tratamiento con L-dopa/carbidopa de manera similar a los enfermos (Barker and Dunnett, 1999; Collier and Sortwell, 1999; Przedborski et al. 2001). Este modelo es uno de los de mayor valor al reproducir el patrón de neurodegeneración y los síntomas conductuales observados en la EP (Herrero, 1997).

La lesión con MPTP en monos se puede realizar por dos vías: inyección intramuscular e infusión vía intracarótida. Este último caso resulta en una lesión predominantemente unilateral de la vía dopaminérgica y con signos motores unilaterales, menos agudos que los causados por la lesión sistémica, de ahí, que en este caso se pueda trabajar con un animal menos debilitado (Collier and Sortwell, 1999).

ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

La EH es otra enfermedad neurodegenerativa con un patrón de herencia autosómico dominante, resultante de un defecto genético en el brazo corto del cromosoma 4. Las primeras manifestaciones de la enfermedad ocurren entre los 35 y 45 años de edad. Clínicamente esta enfermedad es caracterizada por movimientos coreiformes involuntarios, cambios psiquiátricos, conductuales y demencia. La aparición de los síntomas está relacionada con la muerte de las neuronas de proyección gabaérgicas espinosas de talla media que expresan encefalina, ubicadas en el núcleo caudado y putamen (Kordower, Isacson and Emerich, 1999).

El defecto genético del cromosoma 4 resulta en un incremento en el número de copias del trinucleótido CAG que codifica para la glutamina (más de 39 repeticiones de CAG se requieren para manifestar la enfermedad). Este gen codifica para una proteína de 348 KDa llamada Huntingtina. Esta proteína se expresa en igual medida en tejidos del SNC y SNP, tanto en forma normal (no mutada) como anormal. Su función es hasta el momento desconocida (Conrad and Kandel, 2000; Sian et al. 1999), no obstante se conoce que el NGF disminuye su expresión en el cultivo de neuronas estriatales (Haque and Isacson, 2000).

Neuroquímicamente, el mayor defecto involucra la pérdida de neuronas que contienen GABA, las cuales proveen inervación inhibitoria al globo pálido y a la sustancia negra parte reticulada (Kordower, Isacson and Emerich, 1999).

En la EH, la presencia de discinecias con anterioridad al desarrollo de síntomas parkinsonianos, se ha vinculado al hecho de que el proceso degenerativo en las neuronas estriatales se inicia en la subpoblación GABA-encefalinérgica, lo cual conduce a una hiperactividad de la vía globo pálido lateral-núcleo subtalámico y por tanto, a una inhibición del núcleo subtalámico y a un descenso en la actividad del globo pálido medial.

Modelo experimental de EH

A partir del hallazgo de que la muerte neuronal en la EH puede estar relacionada con un proceso excitotóxico endógeno (Albin and Greenamyre, 1992), se llegó a la conclusión de que la administración intraestriatal de aminoácidos excitotóxicos podría modelar esta enfermedad (Coyle and Schwarcz, 1976). En especial, la lesión con ácido quinolínico (AQ) en el estriado destruye preferentemente las neuronas gabaérgicas espinosas de talla media, patrón de degeneración observado en la EH (Block and Schwartz, 1997; Bresjanac and Antauer, 2000; Haik et al. 2000; Menei et al. 2000; Schulz et al. 2000). La lesión excitotóxica en el estriado también imita los cambios motores y cognitivos presentes en la EH, todo lo cual hace que este sea un biomodelo ampliamente utilizado (Emerich et al. 1997; Haik et al. 2000). En la figura 4 se muestra el mecanismo de acción excitotóxico del ácido quinolínico.

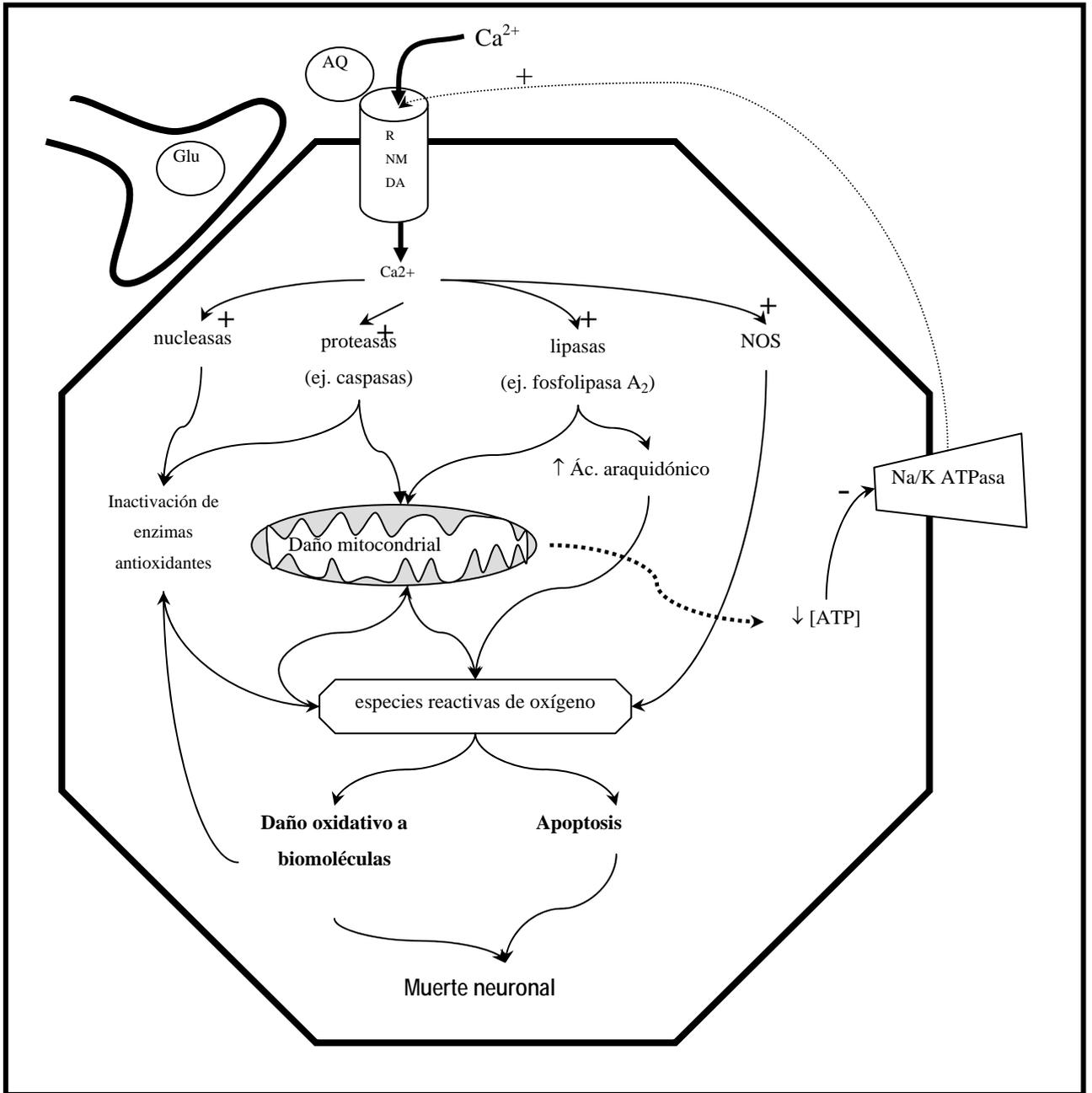


Figura 4. Mecanismo de acción excitotóxica del ácido quinolínico (AQ) sobre una neurona gabaérgica estriatal. La entrada masiva de calcio a la célula a través del receptor N-metil-D aspartato (NMDA) persistentemente activo provoca la activación de enzimas líticas y de la óxido nítrico sintasa (NOS). El daño mitocondrial consecuente es uno de los factores para el incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno que conducen a la muerte neuronal debido al daño a las biomoléculas y a la activación de programas apoptóticos. El déficit energético contribuye a la perpetuación del proceso degenerativo por favorecer la despolarización de la membrana y así mantener el estado activo del receptor NMDA. Esto hace sensible a la célula a la aferencia glutamatérgica normal procedente de la corteza cerebral.

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La EA es un trastorno neurodegenerativo del SNC relacionado con la edad, se caracteriza por un deterioro cognitivo global, irreversible y mantenido. La enfermedad puede seguir un curso lento o fulminante y tiende a afectar a los individuos entre los 60 a 70 años de edad o más tarde, aunque existen manifestaciones tempranas. Afecta a más del 0.5% de la población, con una prevalencia entre 9 y 10% para mayores de 65 años (Fletcher, 1997; Harwood et al. 2000). Esta enfermedad tiene una forma genética y otra esporádica. Aún en la actualidad, a pesar de los numerosos grupos que investigan sobre este trastorno, el diagnóstico se realiza por exclusión clínica y neuropatológica y de forma definitiva postmortem, por la acumulación de depósitos extracelulares de β amiloide, una proteína de 4.2 KDa relativamente insoluble. Neuropatológicamente se presenta una pérdida neuronal en varias áreas corticales, reforzada en el lóbulo temporal y la corteza entorrinal y en el complejo colinérgico del cerebro basal anterior. Todo esto conlleva a la interrupción de las principales vías aferentes y eferentes del hipocampo, lo que explica en parte el déficit cognitivo observado en esta enfermedad (Bigl and Schliebs, 1998; Bu et al. 1998; Price, 2000; Selkoe and Lansbury, 1999).

Dentro de las teorías más discutidas en la actualidad sobre el origen de la EA, se encuentran la teoría inflamatoria, según la cual, la enfermedad es resultado del daño del parénquima por una reacción glial inflamatoria y la teoría neurotóxica, donde se plantea que la enfermedad es resultado del daño por agentes neurotóxicos. Se acepta que la EA sería el resultado de la suma de ambas y que tiene carácter multifactorial (ZonaMedica, 2000).

Modelos experimentales de EA

En las últimas décadas se han desarrollado diversos modelos experimentales para estudiar los efectos del daño sobre neuronas colinérgicas (Tabla. 2) (Gu, Yu and Perez-Polo, 1998b).

Tabla 2. Modelos animales de lesión colinérgica.

Modelo	Especie	Areas cerebrales involucradas
Sección septohipocampal (Fimbria-fórnix)	Rata y monos	Septo medial-hipocampo
Lesión núcleo basal magnocelular (NBM)	Rata	NBM-corteza
Envejecimiento	Rata y monos	Cerebro basal anterior colinérgico
Inyección de toxinas	Ratas	Septo medial

Entre los modelos experimentales de daño a neuronas colinérgicas centrales, el de la lesión septohipocampal es el más ampliamente utilizado. Este modelo induce cambios fenotípicos en las neuronas colinérgicas que recapitulan aspectos de la patología de la EA. El efecto se provoca por la transección de los axones de las neuronas colinérgicas en la fimbria-fórnix. Las neuronas colinérgicas axotomizadas tres días después de la lesión pierden su fenotipo normal, así como la capacidad de expresión de ciertos receptores (incluyendo p75) y de enzimas relacionadas con la neurotransmisión. En dos semanas, las células entran en un proceso de degeneración irreversible con rasgos apoptóticos (Koliatsos, 1996).

ENVEJECIMIENTO

El proceso de envejecimiento del SNC es un interesante campo en las Neurociencias. Las perturbaciones naturales en la biología y función del cerebro son consideradas por muchos como un modelo animal factible de ser utilizado en la investigación experimental. En general, la complejidad de este modelo brinda una mayor cercanía a los procesos patológicos humanos.

El envejecimiento normal consiste en cambios graduales en la estructura del organismo, acaecidos por el transcurrir de los años y no a causa de procesos patológicos o accidentales. El envejecimiento patológico es el deterioro físico y mental por el acúmulo sucesivo de daños tanto primarios como secundarios a procesos vasculares, infecciosos o tumorales (Albert, 1997).

El envejecimiento del SNC tiene como indicador el deterioro intelectual y mnésico (Cullum et al. 2000). Los cambios en el tejido nervioso vinculados con la edad resultan en muerte y atrofia neuronal, acumulación de lipofucsina y en hiperreactividad astrocitaria; también se produce aumento de sustancia amiloide perivascular y aparición de ovillos neurofibrilares en ciertas zonas (ZonaMedica, 2000). A continuación se mencionan las hipótesis actuales que explican el envejecimiento del tejido nervioso (ZonaMedica, 2000):

- Apoptosis
- Autocanibalismo neuronal: las neuronas colinérgicas usan la colina para la síntesis de su neurotransmisor específico, la acetilcolina, pero además toda neurona la usa para la síntesis del fosfolípido de membrana fosfatidilcolina, que se incorpora a dicha estructura. Cuando una persona envejece el sistema de transporte bidireccional se reduce marcadamente. Así las neuronas colinérgicas centrales resultan vulnerables con el correr del tiempo al déficit de colina que se establece por la reducción de capacidad de transporte y la mala alimentación del anciano. Frente a la demanda de su neurotransmisor acetilcolina, las neuronas recurren a la

fosfatidilcolina de la membrana para suplir la falta de colina, dañando la arquitectura y funcionalismo normal de las membranas, pudiendo conducir al daño neuronal definitivo.

- Acumulación de pigmentos: algunas neuronas sintetizan pigmentos relacionados con el metabolismo del neurotransmisor que utilizan. Otras acumulan lipofucsina debido al envejecimiento. Su papel lesivo se debe al efecto de masa en el interior de la célula, provocando el deterioro neuronal. Fragmentos proteásicos de la proteína β -amiloide generados mediante mecanismos desconocidos, se acumulan en el espacio extracelular precipitando en forma de ovillos neurofibrilares. Tales ovillos en número inadecuado, desencadenan reacciones inflamatorio-gliales que culminan en atrofia y muerte.
- Excitotoxicidad: se trata del daño ocasionado por sobreestimulación del glutamato, un neurotransmisor excitatorio que se acumula en el espacio intersináptico tras la anoxia tisular. Ejerce sus efectos a través de los receptores NMDA (canal iónico para el Na^+ y el Ca^{2+}). El aumento de Ca^{2+} libre intracelular dispara los procesos energéticos, altera el citoesqueleto, daña las mitocondrias y activa proteasas intracelulares. Con todo ello, se produce la muerte celular.
- Déficit de NGF: el NGF posee la capacidad de aumentar la supervivencia y la regeneración de las neuronas colinérgicas y por ello resulta importante considerar su déficit como un factor agregado al daño neuronal por envejecimiento o por procesos patológicos.
- Atrofia neuronal: La atrofia neuronal se evidencia con una disminución del tamaño celular y del árbol dendrítico. Como esto ocurre en las enfermedades degenerativas (ejemplo: Alzheimer) se ha especulado que la atrofia o pérdida colinérgica central asociada a la edad, sería responsable de la declinación en las funciones intelectuales y cognitivas de la vejez. Sin embargo, la atrofia puede confundir la interpretación histopatológica del tejido nervioso, ya que los núcleos y células pequeñas pueden pasar por células gliales y por ende sobrestimar la muerte neuronal. Asimismo, una neurona atrófica no necesariamente es afuncional, sino que sus cambios pueden reflejar mecanismos adaptativos. Atrofia no significaría necesariamente pérdida funcional, y el grado de desaparición neuronal puede no ser el correcto. De no mediar circunstancias patológicas agregadas, las neuronas restantes son capaces de suplir las que faltan. Por ello la “discapacidad intelectual debida a la edad” revierte en gran parte por acción del entrenamiento.

Algunas ratas viejas y especialmente los monos representan aproximaciones a la declinación cognitiva asociada al envejecimiento humano y la EA. Los monos viejos en particular, recapitulan algunos aspectos conductuales, neuropatológicos y moleculares del envejecimiento humano (Koliatsos, 1996). En monos viejos se ha descrito la presencia de placas seniles (evidencia de envejecimiento y EA en humanos) al igual que en otros animales viejos como: oso polar, perro y orangután (Koliatsos, 1996).

Por otra parte, existen evidencias de que roedores viejos muestran un deterioro en la memoria espacial (Henriksson et al. 1992). En las ratas viejas, entre un 40-75 % muestran deterioro de su desempeño en el laberinto acuático de Morris, lo que sugiere, que la edad cronológica *per se* es un método impreciso de agrupar los animales para estudiar procesos de envejecimiento. A partir de estos hallazgos, se hizo imprescindible la evaluación conductual de las ratas viejas con el objetivo de seleccionar aquellos animales que realmente presentan deterioro cognitivo que simula el desarrollado de la EA. Estudios en este campo, sugieren que estas variaciones en la conducta de aprendizaje espacial en ratas viejas podría reflejar una disfunción en el sistema colinérgico, lo que es consistente con la hipótesis colinérgica de que la pérdida de memoria está asociada al trastorno neurodegenerativo.

III. TECNICAS NEURORRESTAURATIVAS

Las terapias basadas en la restauración de la población de células dañadas por medio del implante de suspensiones celulares capaces de integrarse al SNC, así como el suministro de factores neurotróficos o la combinación de ambos métodos son en la actualidad aspectos ampliamente investigados y en los cuales existen promisorios resultados.

Trasplante neural o neurotrasplante

El desarrollo de biomodelos que simulan algunos aspectos de trastornos tales como la EP, EA y EH ha facilitado un sistema *in vivo* para estudiar los beneficios y posibilidades de los injertos derivados de diferentes fuentes. Tanto el tejido donante fetal como el adulto son fuentes en continuo estudio en la actualidad. Adicionalmente, las líneas celulares y las células modificadas genéticamente se están valorando como posible material para los injertos en el SN. El trasplante en SNC de mamíferos no es un procedimiento reciente, en las décadas pasadas se realizaron numerosas investigaciones y aplicaciones clínicas en este campo. Inicialmente, el trasplante en el SNC fué una importante herramienta para el estudio del desarrollo neural, la regeneración y la degeneración. Sin embargo, en un corto periodo de tiempo, se vió que el trasplante de tejido nervioso fetal podría aliviar el déficit neural. Los primeros experimentos

realizados en roedores, confirmaron que el injerto neural podría alterar parámetros motores, sensoriales, cognitivos y neuroendocrinos, siendo estos experimentos la base de la aplicación clínica de los trasplantes neurales (Bakay, 1990; Björklund and Stenevi, 1985).

Los trasplantes neurales son realizados fundamentalmente mediante suspensiones celulares obtenidas por disociación enzimática del tejido. Las suspensiones celulares tienen la ventaja de que son fácilmente inyectadas estereotácticamente en el sitio del injerto y son rápidamente insertadas en el tejido huésped, pueden sobrevivir sin un aporte vascular especial y representan una vía menos agresiva para el hospedero (Cuétara, Castillo and Garcia, 1997; Kaminski, Hansson and Brundin, 1999; Schierle et al. 1999).

A pesar de que la experimentación en animales se ha interesado por varias enfermedades potencialmente susceptibles de ser tratadas con trasplantes, como por ejemplo: la demencia, la epilepsia y la EH, los mayores avances se han producido en la EP. En este contexto, es de particular interés señalar que la EP es quizás la única enfermedad neurodegenerativa que responde a la terapia del reemplazamiento del neurotransmisor deficiente, la dopamina. Por tanto, por analogía, el implante de células capaces de aportar dopamina al estriado, de forma fisiológica, es capaz de revertir las disfunciones del sistema (López and Brera, 1997). Esta, fue una de las razones que condujeron a que la aplicación del trasplante en SNC fuera inicialmente realizado en pacientes con EP.

El neurotrasplante en pacientes con EP comenzó en 1982 con los trabajos de Eric Olof Backlund (Backlund et al. 1985). El injerto de tejido mesencefálico fetal colocado en el estriado de ratas lesionadas unilateralmente corregía las anormalidades conductuales observadas en estos animales a través de la reinervación anatómica del injerto. Además, existía la sugerencia de que también las células cromafines de medula adrenal podrían proveer similares resultados (Freed, Morihisa and Spoor, 1981). El primer intento clínico se realizó en dos pacientes afectados severamente con EP que respondían a la L-dopa pero tenían severas discinesias. Sin embargo, 6 meses después del injerto de médula suprarrenal en el caudado, no se observó variación en los síntomas.

Basados en el hecho de que la pérdida de dopamina es mayor en el putamen que en el caudado y en otras evidencias que sugerían que el putamen es más importante en la actividad motora, Backlund y sus colegas intentaron el injerto en el putamen de otros dos pacientes con síntomas menos severos que en el ejemplo anterior (Lindvall et al. 1987). Se observó, en este caso, una mejoría de los síntomas que no persistió en el tiempo. Subsecuentemente se demostró que aunque el tejido adrenal neonatal era efectivo en el modelo de rata, el tejido adulto no lo era (Freed, 1983). En este punto, las investigaciones clínicas cesaron y se iniciaron investigaciones básicas del efecto del NGF en la promoción y supervivencia de la médula adrenal adulta (Olson et al. 1991).

A pesar de los resultados clínicos obtenidos por Backlund y colaboradores, en 1987 aparecen los primeros reportes de Madrazo. Estos últimos utilizan una microcirugía transcortical intraventricular e injertan médula adrenal en la cabeza del caudado con lo que obtienen una mejoría significativa de los síntomas parkinsonianos en dos pacientes (Madrazo et al. 1987). Madrazo atribuye el éxito al implante intracerebroventricular (ICV) que había sido demostrado con anterioridad, en modelos animales, ser superior al intraparenquimal (Freed, Cannon-Spoor and Krauthamer, 1986). Estos resultados fueron el inicio de un amplio grupo de investigaciones clínicas en múltiples países que conllevaron a una casuística mundial de relevancia en la aplicación de este tipo de terapéutica (López-Lozano, Bravo and Abascal, 1992; Pezzoli, Motti and Zecchinelli, 1990).

Otros aspectos evaluados del neurotrasplante se relacionan con la edad gestacional adecuada, los sitios de implantes, el uso de múltiples fetos para un implante y de múltiples sitios blancos del injerto (Freed et al. 1992), el uso de inmunosupresores, el uso de células crioconservadas para el implante, la utilización de otras fuentes celulares (células precursoras, células modificadas genéticamente) y la combinación del trasplante con terapia neurotrófica (Brundin et al. 2000; Chun, Son and Son, 2000; Dunnett et al. 1997; Siegel and Chauhan, 2000; Zurn et al. 1998).

Si bien es cierto que los trasplantes inducen una recuperación funcional, en la actualidad se conoce que la recuperación es mediada por diversos mecanismos, alguno de los cuales son inespecíficos. La Tabla 3 muestra los posibles mecanismos del trasplante en SNC (Dunnett et al. 1997).

Tabla 3. Mecanismos potenciales de la función de los trasplantes.

	Descripción
No-específico	Efecto negativo del tamaño de la lesión Efecto placebo Efecto neurológico positivo de la cirugía
Farmacológico	Secreción de neurotransmisores y neurohormonas por el injerto
Trófico	Liberación de moléculas tróficas que estimulan regeneración en el hospedero El injerto provee un apoyo trófico a neuronas del hospedero
Injertos-puente	El injerto provee un sustrato celular para la regeneración de los axones del hospedero
Reinervación	El injerto provee reinervación sináptica y reactivación tónica del cerebro huésped
Reconstrucción	Establece conexiones de entrada y salida que restauran la funcionalidad de los circuitos neuronales

Muchos de los eventos vinculados a los efectos del neurotrasplante como técnica restaurativa en las enfermedades neurodegenerativas han sido caracterizados. Sin embargo, no se describen trabajos que evalúen si estos efectos causan cambios en los niveles de NGF.

TERAPIA NEUROTRÓFICA

La capacidad de los factores neurotróficos para prevenir la atrofia y muerte neuronal durante el desarrollo y la vida adulta, así como sus propiedades neuroprotectoras, explican el interés que tienen estas proteínas (entre ellas el NGF) como potenciales agentes terapéuticos para las enfermedades neurodegenerativas y en el daño agudo del SN. La capacidad de los factores neurotróficos de promover la integridad y supervivencia de las neuronas entre otras funciones (Tabla 4) y la posibilidad de efectividad de la hipótesis neurotrófica (Appel, 1981; García-Yébenes, 1997; Phillips et al. 1991), sitúan a las NTs como candidatos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Aguado et al. 1998; Collier and Sortwell, 1999; Hefti, 1997a; Hefti, 1997b; Jönhagen, 2000; Sramek and Cutler, 1999).

Tabla 4. Funciones de los factores neurotróficos.

Características generales de los factores neurotróficos:	
Inducen:	diferenciación neuronal, crecimiento neuronal
Mantienen:	función normal
Regulan:	síntesis de neurotransmisores y destino celular
Aumentan:	supervivencia de una población neuronal en situaciones de muerte celular: necrosis y apoptosis
Protegen:	contra lesiones agudas y crónicas

Los factores neurotróficos han sido, durante más de una década, la gran esperanza para encontrar un tratamiento efectivo que combatiera las devastadoras consecuencias de las enfermedades neurodegenerativas. Su uso, avalado por experiencias en modelos animales, se ha propuesto para el tratamiento de algunas enfermedades, entre otras: la EA (Bergado et al. 1997; Bergado et al. 1998; Dragunow et al. 1997; Ferrer et al. 1999), la EP (Collier and Sortwell, 1999; Walton et al. 1999), la esclerosis lateral amiotrófica (Junger and Varon, 1997) y la EH (Kordower, Isacson and Emerich, 1999).

Hasta el momento, ha tenido especial atención el uso potencial del NGF en la EA (Hefti, 1997b; Windisch, Hutter-Paier and Gschanes, 1999). En monos y en humanos, el NGF ha sido crónicamente infundido en el cerebro con la ayuda de bombas osmóticas (Baez et al. 1999; Cruz-Aguado et al. 1999; Olson et al. 1992). Los estudios iniciales en ratas revelan la rápida distribución del NGF en el sistema ventricular y limitada penetración en el parénquima cerebral (Venero, Hefti and Knusel, 1996), esta distribución es compatible con la cinética de difusión de las proteínas (Pardridge, 1991).

Se han realizado tres ensayos en pacientes a los cuales se les ha infundido NGF en el cerebro. El NGF, en el primer estudio, fue infundido en el putamen de un paciente con Parkinson con el objetivo de apoyar el injerto de tejido de médula adrenal (Olson et al. 1991). En la segunda investigación, el NGF fue infundido ICV durante tres meses en un paciente con EA con lo que se logró una mejoría en las pruebas neurofisiológicas de memoria verbal episódica (Olson et al. 1992). El tercer estudio se realizó por medio de la infusión ICV en tres pacientes con EA, el tratamiento fue diferente para cada caso en cuanto a dosis y tiempo de infusión y los resultados mostraron desde el punto de vista imagenológico un incremento del flujo sanguíneo cerebral, de los receptores nicotínicos y del metabolismo de la glucosa y electroencefalográficamente un incremento de la relación de ondas alpha/theta (Jönhagen et al. 1998).

Es importante tener en cuenta que cualquier terapia neurotrófica en la EA u otra enfermedad neurodegenerativa debe ser más efectiva en estadios tempranos, cuando una gran población neuronal puede aún servir como sustrato para la acción de las NTs (Backman et al. 1996; Bergado et al. 1998; Castellanos-Ortega, Cruz-Aguado and Martinez-Marti, 1999).

El tratamiento cerebral con factores neurotróficos presenta el complejo problema de la naturaleza proteica de estos factores, que le confiere la incapacidad de atravesar la barrera hematoencefálica en condiciones normales. Esta característica establece la necesidad de buscar vías alternativas para poder aplicar intracerebralmente o por otros métodos los factores neurotróficos con vistas a la utilización de estos factores como agentes terapéuticos en enfermedades del SNC.

Son muchas las alternativas que se llevan a cabo para solucionar las dificultades con la administración central de NGF, entre ellas se destacan los implantes de liberación lenta que contienen la proteína activa embebida en polímeros biodegradables, otra posibilidad es la modificación de la molécula de NGF para que pueda atravesar la barrera hematoencefálica y por último, la terapia celular y génica (Alexi, Venero and Hefti, 1997; Blesch, Grill and Tuszynski, 1998; Chen et al. 1998; Grill, Blesch and Tuszynski, 1997; Menei et al. 2000; Nakao et al. 2000; Smith et al. 1999; Wyman et al. 1999; Yanagisawa, 2000).

IV. MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL NGF

Desde el descubrimiento del NGF se desarrolló un método de detección basado en la actividad biológica del NGF que posibilitó medir la capacidad de esta proteína de promover el crecimiento de neuritas en neuronas de ganglio dorsal o simpático del embrión de pollo (Ebendal, 1989). Posteriormente, se empleó este método de forma semicuantitativa utilizando una curva estándar de NGFm que permitió evaluar la presencia de determinados factores inhibidores de la actividad biológica del NGF presente en el suero de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (Ebendal, 1989).

La sensibilidad requerida en un ensayo para poder cuantificar NGF en SNC y periférico es extremadamente alta, debido fundamentalmente a los bajos niveles de NGF en estos tejidos (2ng/g de peso húmedo) (Korsching and Thoenen, 1983). Los ensayos inmunoenzimáticos (EIE) estiman que los niveles de NGF en el hipocampo de ratas están entre 1- 2 ng/g de peso húmedo y entre 0.3-0.5 ng/g en la corteza. Las áreas cerebrales que contienen los somas de neuronas colinérgicas (septo, banda diagonal de Broca, núcleo basal de Meynert) contienen alrededor de 0.4-0.7 ng/g. En contraste, el estriado e hipotálamo muestran bajos niveles de NGF (0.1-0.2 ng/g tejido) y de su ARNm. Es importante notar que previo al desarrollo de los EIE se utilizaban radioinmunoensayos que mostraban valores de NGF sobre-estimados en muchos tejidos (Ebendal, 1989).

Hasta el momento, los EIE desarrollados para detectar niveles de NGF muestran a su vez disímiles grados de sensibilidad (Korsching and Thoenen, 1983; Lärkfors and Ebendal, 1987; Weskamp and Otten, 1987); siendo uno de los más sensibles y específicos el que utiliza el anticuerpo monoclonal 27/21 que es capaz de bloquear la actividad del NGFm y el NGF recombinante humano (Söderström et al. 1990).

Para el establecimiento de este EIE que detecta NGF se partió del conocimiento previo del análisis de secuencia de nucleótidos del gen del NGF de diferentes especies y del conocimiento de que la estructura primaria del NGFm es muy similar a la del humano. La homología entre la secuencia aminoacídica del NGF de ratón y el de otras especies explica la presencia de actividad inmunológica cruzada entre anticuerpos contra NGFm y NGF de otras especies (Ebendal, Larhammar and Persson, 1986; Söderström et al. 1990; Whittemore et al. 1988).

MATERIALES Y MÉTODOS

I. DISEÑO EXPERIMENTAL

El trabajo está constituido por 11 estudios agrupados en tres líneas fundamentales: 1. Detección de actividad biológica y cuantificación del β -NGFm, 2. Cambios en los niveles de NGF endógeno en procesos neurodegenerativos y 3. Comportamiento de los niveles de NGF frente a tratamientos neurorestaurativo (Fig. 5).

1. Detección de actividad biológica y cuantificación del β -NGFm

Estudio 1. Ensayo de actividad biológica del β -NGF

Estudio 2. Ensayo inmunoenzimático para la cuantificación del β -NGFm

2. Cambios en los niveles de NGF endógeno en procesos neurodegenerativos

Estudio 3. NGF en enfermedades neurodegenerativas

Grupos a estudiar:

- a) Pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA, n=13).
- b) Pacientes con enfermedad de Parkinson (EP, n=38).
- c) Pacientes con enfermedad de Huntington (EH, n=6).
- d) Controles normales (CN, n=16).

Estudio 4. Relación entre el NGF, el deterioro neurodegenerativo y el tratamiento con L-dopa en la EP

Grupos a estudiar:

- a) Pacientes con EP en estadio I-II de la enfermedad según escala de Hoehn y Yahr (G I-II, n=17).
- b) Pacientes con EP en estadio III-IV de la enfermedad según escala de Hoehn y Yahr (G III-IV, n=21).
- c) Pacientes con EP con tratamiento con L-dopa (L-dopa, n=27).
- d) Pacientes con EP sin tratamiento con L-dopa (sin L-dopa, n=11).
- e) Controles normales (n=16, los mismos del estudio anterior).

Estudio 5. NGF en modelos experimentales de neurodegeneración

Grupos a estudiar:

- a) Monos con lesión nigral con MPTP (MPTP, n=4).
- b) Ratas con lesión nigral con 6-OHDA (6-OHDA, n=11).
- c) Ratas con lesión estriatal con ácido quinolínico (AQ, n=8).
- d) Ratas con lesión septohipocampal (SH, n=4).
- e) Ratas viejas con deterioro cognitivo (DC, n=5).
- f) Ratas viejas sin deterioro cognitivo (sin DC, n=6).
- g) Ratas control (n=28).
- h) Monos control (n=10).

Estudio 6. NGF y envejecimiento

Grupos a estudiar:

- a) Ratas jóvenes (2-4 meses de edad, n=28).
- b) Ratas viejas (20-22 meses de edad, n=24).
- c) Monos jóvenes-adultos (7-15 años de edad, n=69).
- d) Monos viejos (>20 años de edad, n=25).
- e) Controles normales humanos con edades entre 20 y 30 años (n=59).
- f) Controles normales humanos con edades entre 31 y 40 años (n=49).
- g) Controles normales humanos con edades entre 41 y 60 años (n=49).

3. Comportamiento de los niveles de NGF frente a tratamientos neurorestaurativo

Estudio 7. Terapia neurorestaurativa en la EP

Grupos a estudiar:

- a) Ratas con lesión nigral y trasplante de células mesencefálicas fetales en estriado (Str, n=24).
- b) Ratas con lesión nigral y trasplante de células mesencefálicas fetales en núcleo subtalámico (NST, n=14).
- c) Ratas con lesión nigral y trasplante de células mesencefálicas fetales en sustancia negra reticulada (SNr, n=11).

- d) Ratas con lesión nigral y trasplante de células mesencefálicas fetales en Str y NST simultáneamente (Str+NST, n=6).
- e) Ratas con lesión nigral y trasplante de células mesencefálicas fetales en Str y SNr simultáneamente (Str+SNr, n=5).
- f) Ratas con lesión nigral (6-OHDA, n=11).
- g) Pacientes con EP neurotrasplantados (n=7).
- h) Paciente con EP con autotrasplante de células cromafines e infusión ICV de NGF (n=1).

Estudio 8. Terapia neurotrófica en la EA

- a) Paciente con EA e infusión ICV de NGF (n=1).

Estudio 9. Terapia neurotrófica en modelo experimental de EH

Grupos a estudiar:

- a) Ratas con lesión estriatal con AQ e infusión con NGF simultáneamente (AQ+NGF, n=8).
- b) Ratas con lesión estriatal e infusión de NGF 48 horas después de la lesión (AQ→NGF, n=10).
- c) Ratas con infusión de NGF y a las 48 horas lesión estriatal (NGF→AQ, n=9).
- d) Ratas con lesión estriatal (AQ, n=8).

Estudio 10. Terapia neurotrófica en lesión septohipocampal

Grupos a estudiar:

- a) Ratas con lesión septohipocampal y tratamiento con NGF (*gel foam*) (SH+NGF, n=4).
- b) Ratas con lesión septohipocampal (SH, n=4).

Estudio 11. Terapia neurotrófica y trasplante en envejecimiento cerebral

Grupos a estudiar:

- a) Ratas viejas con déficit cognitivo e infusión ICV de NGF (DC+NGF, n=9).

- b) Ratas viejas con déficit cognitivo y trasplante de células fetales septales (DC+T, n=9).
- c) Ratas viejas con trastorno cognitivo con trasplante de células fetales septales e infundidas con NGF (DC+T+NGF, n=5).
- d) Ratas viejas con déficit cognitivo no infundidas (DC, n=5).
- e) Mono joven con infusión de NGF (n=1).
- f) Mono viejo con infusión de NGF (n=1).
- g) Monos jóvenes-adultos (joven-adulto, n=64).
- h) Monos viejos (viejo, n=25).

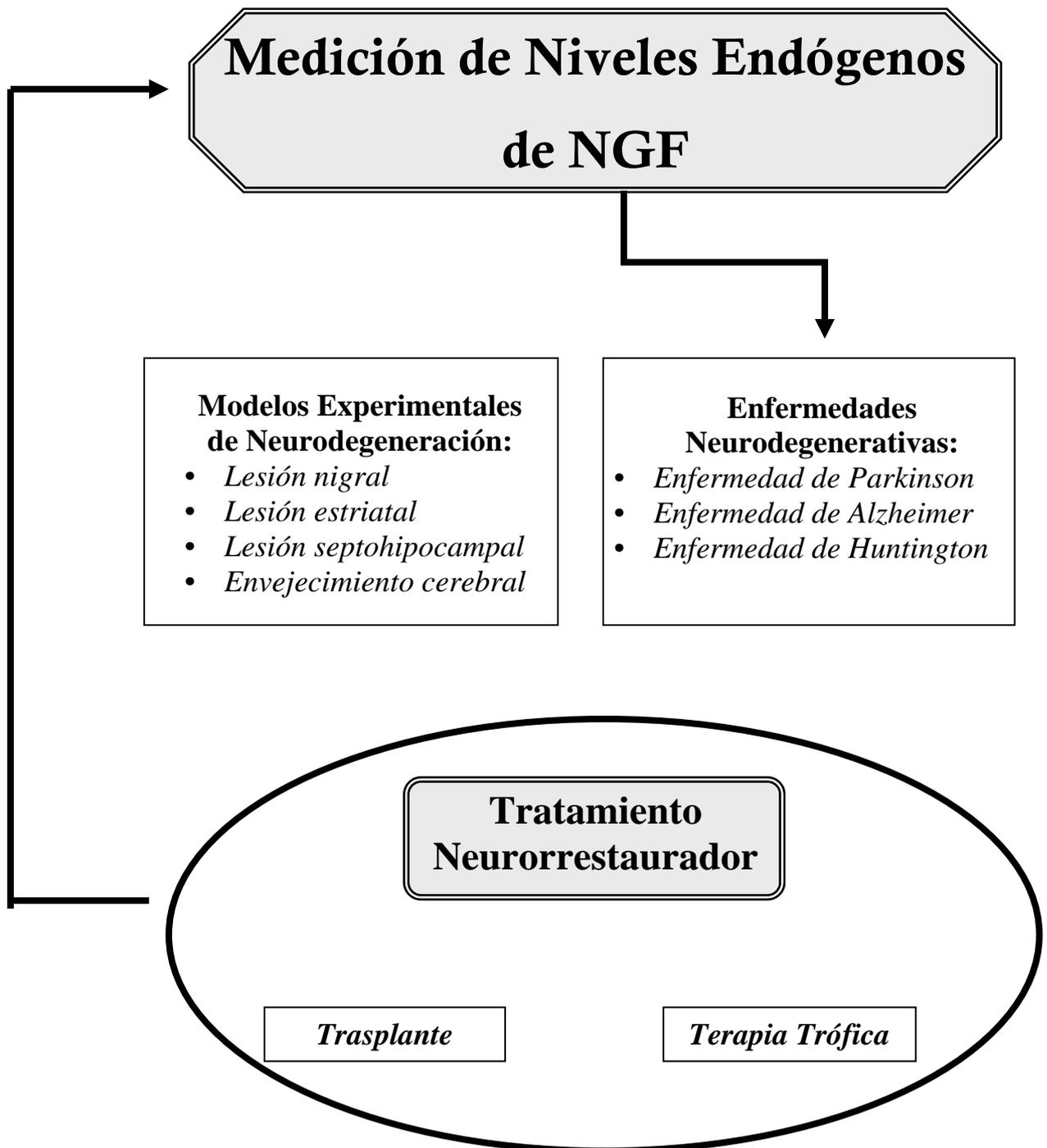


Figura 5. Síntesis del diseño experimental.

II. MATERIALES

1. β -NGFm

El β -NGFm fue purificado a partir de glándula submaxilar de ratón Balb/c macho adulto (CENPALAB, Cuba), según el método de Mobley modificado por Ebendal (Ebendal et al. 1984; Mobley, Schenker and Shooter, 1976). La concentración del β -NGFm obtenido se determinó mediante su coeficiente de extinción a 280 nm ($K=1.6 \text{ ml mg}^{-1}$). En la Fig. 6 se muestra el diagrama de flujo del método de purificación.

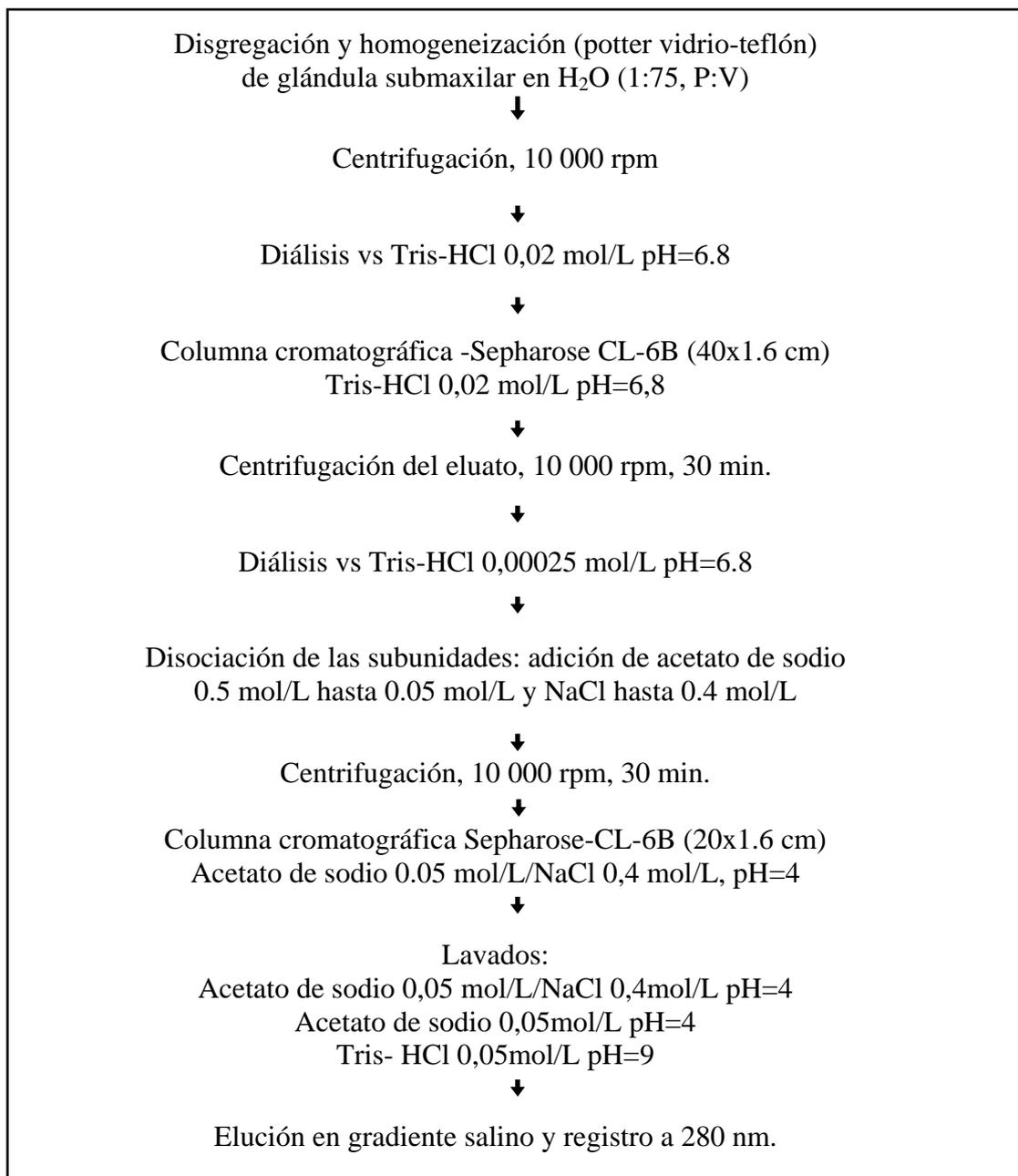


Figura 6. Diagrama de flujo del proceso de purificación del β -NGFm. Método: Cromatografía de intercambio iónico.

Ensayo de actividad biológica del β -NGFm

Cadenas de 2-3 ganglios simpáticos de embriones de pollo White Leghorn (Cenpalab, Cuba) de 9 días fueron colocadas en placas de cultivo e incubadas (37°C, atmósfera saturada húmeda y 5 % de CO₂) con una mezcla de colágeno, medio Eagle (BME 10 x), NaHCO₃, L-glutamina, suero de ternera fetal 1% y diferentes diluciones del β -NGFm. El crecimiento neurítico alrededor del ganglio se evaluó a las 48 horas por examen directo en un microscopio estereoscópico (Wild, Suiza) analizando la densidad, grosor y tamaño de las fibras. Se utilizó una escala semicuantitativa para determinar la unidad de actividad biológica (UB), donde 0 UB representan la ausencia total de fibras y 1 UB representa un halo denso, circular de fibras (Ebendal, 1989).

Ensayo inmunoenzimático (EIE) para β -NGFm

Para el EIE se utilizaron placas negras de 96 pocillos (Dinatech, Microfluor, USA) las cuales se recubrieron con el anticuerpo monoclonal 27/21 anti β -NGF murino (Boehringer Mannheim, Alemania) diluido en buffer carbonato 0.05 mol/L pH 9.6. A su vez se recubrieron pocillos controles con inmunoglobulina G normal de ratón. A la placa, después de ser incubada durante la noche en cámara húmeda a temperatura ambiente, se le añadió albúmina sérica bovina (ASB) diluida al 1% en este mismo buffer. Se lavó con Tris 0.002 mol/L, NaCl 0.5 mol/L pH 7.3-7.5 (solución tampón de tris, STT) al que se le adicionó Tween 20 0.5% y MgCl₂ 2nmol/L y se aplicaron las muestras diluidas volumen a volumen en STT con Tween 20 0.5% y ASB 0.2%. Las muestras se incubaron durante la noche en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se utilizaron como estándar muestras de β -NGF de ratón (Sigma, USA) diluidas en el mismo buffer de las muestras (100,10,1,0.1, 0.01,0.001 ng/mL). Las placas fueron lavadas extensamente en STT y se les adicionó el anticuerpo monoclonal 27/21 conjugado con β -galactosidasa, 1:200 en STT con Tween 20 0.05%, ASB 1% y MgCl₂ 2nmol/L. Después de incubar las placas a 37° C, fueron lavadas y finalmente la reacción de la enzima se produjo añadiendo metilumberiferil- β -galactósido 0.2nmol/L (MUG). La acumulación de metilumbeliferona ($\lambda_{\text{excitación}}$ 365nm y $\lambda_{\text{emisión}}$ 450 nm) se siguió por un fluorímetro para placas de 96 pocillos (Fluoroskan, Labsystem, Finlandia). Los valores de fondo dados por el recubrimiento de inmunoglobulina G normal de ratón se sustrajeron a cada lectura y el resultado se expresó en actividad de la enzima (fmol MUG por minuto).

3. Reactivos

En todos los estudios se empleó agua desionizada (conductividad < 1.0 μ S) y destilada. La Tabla 5 muestra los reactivos utilizados y su procedencia.

Tabla 5. Datos de los reactivos utilizados: firma comercial, ciudad y país.

Reactivo	Firma	Ciudad	País
Acetato de sodio	Sigma	St. Luis, MO	USA
Ácido quinolínico	Sigma	St. Luis, MO	USA
Albúmina de suero bovino	Sigma	St. Luis, MO	USA
Anti tirosina hidroxilasa (TH)	Dako	California	USA
Anticuerpo monoclonal 27/21 anti- β -NGFm	Boehringer Mannheim	Mannheim	Alemania
Anticuerpo monoclonal 27/21 anti- β -NGFm conjugado con β -galactosidasa	Boehringer Mannheim	Mannheim	Alemania
Antisuero anti-conejo conjugado peroxidasa	Promega	Wisconsin	USA
Antisuero policlonal anti-NGF	Sigma	St. Luis, MO	USA
Aprotinina	Sigma	St. Luis, MO	USA
BDNF	Boehringer Mannheim	Mannheim	Alemania
Complejo esptreptavidina-biotina-peroxidasa (ABC-HRP)	Dako	California	USA
Diaminobenzidina (DAB)	Dako	California	USA
DPX	Dako	California	USA
Fluoruro de fenilmetilosulfonilo	Sigma	St. Luis, MO	USA
Hidrato de cloral	Merck	Darmstadt	Alemania
Inmunoglobulina G normal de ratón	Boehringer Mannheim	Mannheim	Alemania
Isopentano	BDH	Poole	Reino Unido
Ketamina	Sigma	St. Luis, MO	USA
L-Glutamina	Sigma	St. Luis, MO	USA
Medio Eagle's	GIBCO	Scotland	Reino Unido
Metabisulfito de sodio	Baker Analysed	C México	México
Metilumbeliferil- β -D-galactosido	Sigma	St. Luis, MO	USA
MgCl ₂ .6H ₂ O	BDH	Poole	Reino Unido
MgSO ₄ .7H ₂ O	Merck	Darmstadt	Alemania
MnSO ₄	Sigma	St. Luis, MO	USA
Na ₂ CO ₃	BDH	Poole	Reino Unido
NaCl	Merck	Darmstadt	Alemania
NaH ₂ PO ₄	BDH	Poole	Reino Unido
NaHCO ₃	Merck	Darmstadt	Alemania
NaN ₃	BDH	Poole	Reino Unido
Neurotrofina-3	Boehringer Mannheim	Mannheim	Alemania
Sacarosa	Sigma	St. Luis, MO	USA
Sal disódica del ácido Etilendiaminotetracético (EDTA)	BDH	Poole	Reino Unido
Suero fetal de ternera	Sigma	St. Luis, MO	USA
Suero fetal de ternera	Dako	California	USA
Tris	Merck	Darmstadt	Alemania
Triton X-100	Sigma	St. Luis, MO	USA
Tween 20	BDH	Poole	Reino Unido
Xilol	Sigma	St. Luis, MO	USA

4. Criterio de selección de los pacientes

- **Pacientes con EA:** Las manifestaciones clínicas estaban dadas por pérdida de la memoria, fallo intelectual con deterioro cognitivo, trastornos de conducta y alteraciones de la personalidad. La selección se realizó de acuerdo al criterio del Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos, de Comunicación y Cerebrovasculares y la Asociación para la Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Relacionados de los EEUU (NINCDS/ADRDA). Este criterio fija tres grados: EA posible, cuando los pacientes tienen déficit cognitivo de evolución lenta y progresiva sin disturbios de la conciencia y ausencia de trastornos vasculares, metabólicos o tóxicos del SNC; EA probable, los pacientes presentan los síntomas de la EA posible con un claro empeoramiento de la memoria, antecedentes familiares de EA y edad de comienzo entre 40-90 años; EA definitiva, pacientes con EA probable, cuando mueren, en la autopsia se encuentran los elementos característicos de la enfermedad (Mckhann et al. 1984).

En este estudio todos los pacientes con EA evaluados tenían diagnóstico de EA probable.

- **Pacientes con EP:** De acuerdo al diagnóstico clínico, presencia de temblor, bradiquinesia, rigidez y pérdida de reflejos posturales, se seleccionaron pacientes grado I, II, III y IV según la escala de Hoehn y Yahr (Hoehn and Yahr, 1967, ver Anexo 1).

Los pacientes con EP estudiados se agruparon atendiendo al grado de la enfermedad y al tratamiento con L-dopa según se puede apreciar en la Tabla 6.

Tabla 6: Pacientes con EP agrupados de acuerdo al grado de la enfermedad (según la escala de Hoehn y Yahr).

Grado	N	edad media (años)	Tiempo evolución (media, años)
I-II	17	52	2.66
III-IV	21	56.12	9.06

El tratamiento de los pacientes con EP en estadios I y II que no tomaban L-dopa (n=9) consistió fundamentalmente en el uso de amantadina en 7 de los 9 pacientes y bromocriptina a dosis bajas (5mg/día) en el resto de los casos. Ningún paciente en estadios I y II tomaba anticolinérgicos o L-deprenilo, un paciente tomaba amitriptilina (12.5mg en la noche) y un paciente diazepam (5mg en la noche). Ningún caso tomaba neurolépticos o sustancias afines a los receptores D2.

Los pacientes en estadios III y IV de la EP, excepto 2, todos tomaban L-dopa a una dosis diaria promedio de 820.8mg tomadas en 4-6 subdosis diarias. El tiempo medio de uso de la L-dopa fue de 5.3 años con un mínimo de 3 años y un máximo de 9 años.

Los dos pacientes que no tomaban L-dopa se apoyaban con triexifenidilo (1 caso) y amantadina (1 caso).

- **Pacientes con EH:** De acuerdo al diagnóstico clínico, análisis genético familiar, movimientos coreicos o coreoatetósicos y alteraciones tipo demencia.

Aspectos éticos:

La toma de las muestras de fluidos corporales a los pacientes a evaluar se realizó contando con el consentimiento dado por los pacientes a los responsables del ensayo clínico e informado según el Anexo 2.

III. MÉTODOS DE LESIÓN Y TÉCNICAS NEURORRESTAURATIVAS EN MODELOS EXPERIMENTALES

Fueron empleadas 114 ratas Sprague-Dawley de dos grupos etáreos: jóvenes (2 meses de edad) con un peso corporal de $272 \pm 34,4$ g (media \pm desviación estándar, DE) al inicio del experimento y viejas (20 meses de edad) con un peso corporal de 511 ± 46 g (media \pm DE) y 79 ratas Wistar con peso entre 225 ± 25 g. Todos los animales eran machos y procedían del Cenpalab (La Habana, Cuba).

Las ratas Wistar fueron utilizadas en los grupos experimentales de lesión nigral y las Sprague-Dawley en los de envejecimiento cerebral, lesión septohipocampal y lesión estriatal.

Las ratas fueron mantenidas en cajas translúcidas con un ambiente de humedad (55 ± 5 %) y temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) controlada y ciclos de luz / oscuridad de 12 horas. El alimento y el agua estuvieron disponibles *ad libitum*.

Se utilizaron 98 monos pertenecientes a dos géneros dentro de la Familia *Cercopitécidos*: *Macaca* (*M. arctoides*, *M. irus* y *M. mulata*) y *Papio* (*P. hamadryas*), procedentes del Cenpalab (La Habana, Cuba) agrupados atendiendo a la edad en jóvenes-adultos (7-15 años, n=69) y viejos (>20 años, n=25). Del total de monos, 4 (*M. arctoide*) fueron seleccionados para ser lesionados con MPTP.

Durante los experimentos con animales se respetaron los principios establecidos por el Consejo Internacional para la Ciencia de los Animales de Laboratorio.

A. Lesión nigral y trasplante de células mesencefálicas fetales en diferentes núcleos de la base

Las ratas fueron anestesiadas con hidrato de cloral 7% (6 ml/Kg de peso, intraperitoneal, ip) e inyectadas estereotácticamente (David Kopf Instruments, USA) en sustancia negra parte compacta derecha en las coordenadas anteroposterior (AP): -4.4 mm, medio lateral (ML): +1.2 mm, dorsoventral (DV): -7.8 mm (Paxinos and Watson, 1986) con 6-OHDA (8 μ g/3 μ L de solución salina con ácido ascórbico 0.2 mg/mL, velocidad de flujo de 1 μ L/min) por medio de una jeringuilla Hamilton.

Se utilizaron suspensiones de células fetales de mesencéfalo ventral para el trasplante en diferentes núcleos (estriado, sustancia negra parte reticulada y núcleo subtalámico). Las coordenadas estereotácticas utilizadas para el trasplante en los diferentes núcleos y la concentración y volumen celular se muestran en la Tabla 7. La inyección se realizó con una jeringuilla Hamilton. Un mes y medio después del trasplante los animales fueron sacrificados.

Tabla 7. Datos del microtrasplante de tejido en los diferentes núcleos (estriado, Str; sustancia negra reticulada Snr; núcleo subtalámico, NST). Coordenadas estereotácticas (mm), concentración de la suspensión celular y volumen inyectado. Tr: trayectoria

	Estriado	NST	SNr
Coordenadas	Tr1: AP=1.7 L= 2.2 V2=4.0 V1=5.5	Tr1: AP=-3.8 L=2.1 V=-8.2	Tr1: AP=-4.8 L=2.4 V=8.2
Estereotácticas	Tr2: AP=1.1 L=2.4 V2=4.0 V1=5.0	Tr2: AP=-3.8 L=2.1 V2=-8.0 V1=-8.1	Tr2: AP=-5.3 L=2.4 V2=8.0 V1=8.2
	Tr3: AP=0.4 L=3.0 V2=4.0 V1=5.4		Tr3: AP=-5.8 L=2.0 V2=7.9 V1=8.3
	Tr4: AP=-0.3 L=3.4 V=4.5		
	Tr5: AP=-0.8 L=4.0 V=5.0		
	Concentración y volumen celular inyectado	1.5x10 ⁵ células/ μ μ L Volumen/ depósito: 250nl Volumen total: 2 μ L 37 500cel/depósito Cantidad total: 300 000 células	3X10 ⁵ células/ μ μ L Volumen/ depósito: 200nl Volumen total: 1 μ L 60 000 cel/depósito Cantidad total: 300 000 células

B. Lesión estriatal y tratamiento neurotrófico

Los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral 7% (6 ml/Kg de peso corporal, ip) y colocados en el marco estereotáctico (David Kopf, USA). La lesión se realizó mediante la inyección (1 μ L/ min) en el estriado derecho de AQ (225nmol/ 2 μ L en solución salina al 0,9%, pH = 7.4) en las coordenadas AP = + 1,2 mm; mediolateral (ML) = + 2,8 mm; DV = - 5.0 (Paxinos and Watson, 1986).

El tratamiento neurotrófico (10 μ L de NGF 0.5 mg/mL disuelto en NaCl 0.9%, intraestriatal) siguió un proceder similar al anterior y se realizó 48 h antes (NGF→AQ), 48 h después (AQ→NGF) o inmediatamente después de la inyección con AQ (AQ+NGF).

Seis semanas después de la inyección los animales fueron sacrificados.

C. Déficit colinérgico y tratamiento neurotrófico

1) Lesión de la vía septohipocampal o lesión de fimbria fórnix: Las ratas fueron anestesiadas con una solución de Ketamina 9.4 mg mL⁻¹ / Diazepam 0.19 mg mL⁻¹ / atropina 0.01 mg mL⁻¹ en una dosis de 10 mL/kg de peso corporal (ip) y colocadas en un aparato estereotáctico (David Kopf, USA). En las coordenadas, con respecto a Bregma: AP = 1.3 mm; ML = 2.0 mm (Paxinos and Watson, 1986) se perforó una ventana y a través de la misma se transectó por aspiración la fimbria fórnix atravesando para ello la corteza parietal media y el cuerpo calloso bajo inspección visual con un microscopio estereoscópico.

Luego de completada la aspiración de la fimbria fórnix, se colocó un fragmento (4 x 4 x 6 mm, 1 mg) de esponja estéril biodegradable (Gelaspon, Germed, Alemania) embebido en 25 μ L de NaCl 0.9% conteniendo 15 μ g de NGF. Al concluir la operación, la piel fue suturada y tratada con timerosal 0.1 % y nitrofurazona 0.2 %. Los animales fueron sacrificados a los 15 días.

La transección efectiva de la fimbria fórnix fue verificada por inspección visual después del sacrificio.

2) Las ratas viejas con déficit cognitivo (véase Sección VI.1 de este capítulo) asignadas a los grupos tratados con NGF fueron anestesiadas con una solución de Ketamina 9.4 mg mL⁻¹ / Diazepam 0.19 mg mL⁻¹ / atropina 0.01 mg mL⁻¹ en una dosis de 10 mL/kg de peso corporal (ip) y colocadas en un aparato estereotáctico (David Kopf, USA). A cada rata le fue implantada subcutáneamente entre las escápulas una bomba miniosmótica (Alzet 2001, USA) con una capacidad de 240 μ L y una velocidad de infusión de 0.5 μ L/hora que se conectó mediante un tubo de policloruro de vinilo con una cánula de infusión de acero

inoxidable. La cánula, implantada en una perforación del cráneo, se fijó a éste con acrílico dental y su extremo inferior se dirigió al ventrículo lateral derecho en las siguientes coordenadas con respecto a Bregma: AP=-0.8 mm, ML=1.4 mm, DV=-4.0 mm. Las minibombas se llenaron con 17 μg de β -NGFm disuelto en NaCl 0.9%. A los 14 días de la cirugía, las ratas fueron anestesiadas y la minibomba fué reemplazada por otra que permaneció allí por otros 14 días. Las ratas fueron sacrificadas 5 semanas después de iniciado el tratamiento.

D. Envejecimiento cerebral y técnica restaurativa

Trasplante de suspensión de células septales: Las ratas fueron anestesiadas con una solución de Ketamina 9.4 mg mL⁻¹ / Diazepam 0.19 mg mL⁻¹ / atropina 0.01 mg mL⁻¹ en una dosis de 10 mL/kg de peso corporal (ip) y colocadas en un aparato estereotáctico (David Kopf, USA). Se inyectó una suspensión de células septales fetales de 3 μL (35 000 cel./ μL) a 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ en tres localizaciones diferentes del hipocampo, para lo cual se utilizó una jeringuilla Hamilton.

El grupo experimental que recibió trasplante de suspensión de células septales e infusión ICV de NGF siguió este mismo proceder y a continuación se le implantó la bomba miniosmótica (véase esta misma Sección, acápite C). Los animales fueron sacrificados a las 5 semanas de iniciado el tratamiento.

IV. TÉCNICAS RESTAURATIVAS EN PACIENTES CON EP Y EA

Neurotrasplante de células mesencefálicas fetales humanas en la EP

La disección del tejido mesencefálico humano se realizó a embriones entre 8-10 semanas gestacionales y la disociación de las células se logró por medio de un método enzimático-mecánico. El implante de la suspensión de células mesencefálicas (entre 1-3x10⁵ cél/ μL) se realizó en tres sitios: uno en caudado y dos en putamen a razón de 20 $\mu\text{L}/\text{implante}$ por medio de una técnica estereotáctica. Todos los pacientes estaban evaluados según la escala de Hoehn y Yahr como grado III-IV y tomaban L-dopa y Madopar como tratamiento antiparkinsoniano.

En estos pacientes se evaluó el estado funcional de la barrera hematoencefálica por medio del índice albúmina líquido cefalorraquídeo suero (albúmina LCR / albúmina suero) y además se calculó el índice de la inmunoglobulina G (IgG) LCR/suero (Tibbling, Link and Ohman, 1977).

Cuantificación de IgG y albúmina en LCR y suero Para medir la concentración de IgG y albúmina se siguió la técnica de inmunodifusión radial simple y se emplearon placas y estándar comerciales (Behring, Alemania).

Autotrasplante de células cromafines e infusión de β -NGFm en un paciente con EP

El paciente recibió infusión de β -NGFm en putamen a una dosis diaria de 120 μ g durante 23 días como apoyo a un autoinjerto de médula adrenal en el putamen (Olson et al. 1991).

Infusión de β -NGFm en un paciente con EA

En este caso, el paciente recibió 75 μ g de β -NGFm por vía ICV durante 90 días (Olson et al. 1992).

V. DETERMINACIÓN DE NGF POR TÉCNICA DE EIE Y ENSAYO DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

1. Obtención de las muestras para el EIE

A. Suero

- a) **Humano:** Las muestras de sangre venosa de los pacientes y sujetos controles se tomaron por punción antecubital previa asepsia. La sangre se centrifugó a 1 500 rpm, 20° C, 10 min. Se extrajo el suero que fué conservado a -20° C hasta su uso.
- Se estudiaron muestras de suero de 157 sujetos supuestamente normales (59 del sexo femenino y 98 del sexo masculino) procedentes del Banco de Sangre de Marianao y trabajadores del Centro Internacional de Restauración Neurológica. Estos sujetos no tenían enfermedades neurológicas, endocrinas o inmunológicas ni antecedentes familiares de las mismas y no tomaban (en el momento del estudio) ningún medicamento.
- Se estudiaron muestras de suero de pacientes con enfermedades neurológicas: EA, EP y EH. En la Tabla 8 se muestran la edad media de los grupos de pacientes y la cantidad de pacientes estudiados por enfermedad.

Tabla 8. Grupos de pacientes con enfermedades neurológicas estudiados.

Enfermedad	n	Edad media (años)
Enfermedad de Alzheimer	13*	65
Enfermedad de Parkinson	44**	52
Enfermedad de Huntington	6	57

* Del total de pacientes con EA estudiados, uno recibió infusión ICV de β -NGFm. En este caso las muestras de sangre fueron tomadas antes y 90 días después del tratamiento.

** Del total de pacientes con EP estudiados, un grupo (n=7) que se encontraba en estadios avanzados de la enfermedad (Grado III-IV según la escala de Hoehn y Yahr) recibió neurotrasplante de células mesencefálicas fetales humanas. En estos pacientes las muestras de sangre fueron tomadas antes del trasplante y después a la semana, 1^{er}, 2^{do}, 3^{er}, 4^{to}, 5^{to} y 6^{to} mes. De igual forma, uno de estos pacientes con EP fue autotrasplantado con células cromafines y a la vez recibió infusión ICV de β -NGFm, en este caso, la muestra fue tomada antes y a los 79 días después del tratamiento.

- b) **Monos:** Los animales fueron anestesiados con ketamina (25mg/Kg de peso, intramuscular) y la muestra de sangre fue obtenida por punción venosa, se centrifugó y se extrajo el suero. La muestra se conservó a -20° C hasta su uso.
- c) **Ratas:** Los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral 7% (6 mL/Kg de peso corporal) por inoculación ip, posteriormente fueron decapitados y la sangre obtenida se centrifugó, se extrajo el suero y se conservó a -20° C hasta su uso.
- d) **Suero fetal de carnero** (Sigma, USA).

B. Líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EP neurotrasplantados

A los 7 pacientes neurotrasplantados se les realizó una punción lumbar antes de recibir el tratamiento y en el 1ro, 2do, 4to y 6to mes después del trasplante.

C. Tejido cerebral de rata

Los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral 7% (6 mL/Kg de peso corporal, ip) y posteriormente fueron decapitados. Los cerebros fueron extraídos y lavados con NaCl 0.9 % frío y se disecaron las áreas cerebrales hipocampo, corteza frontal, estriado y septo. Los tejidos se congelaron, pesaron y conservaron a -70° C hasta su homegenización.

Homegenización del tejido cerebral de ratas: Las muestras de tejido fueron homegenizadas en un potter de vidrio-teflón en baño de hielo que contenía una solución de homegenización consistente en Tween 20 0.5% / albúmina de suero bovino 0.1% / EDTA 10 mmol/L / aprotinina 20 U/mL / fluoruro de fenilmetilosulfonilo 0.1 mmol/L en tampón Tris salino pH 7.4. Se aplicaron 20 golpes a 500 rpm (Homogenizador Bioblock Scientific) y se aisló la fracción citosólica por centrifugación a 2800 g (Jouan, Francia) durante 30 min.

Otras neurotrofinas evaluadas por el EIE: BDNF y NT-3 (donado por Prof. Ted Ebendal, Biomedical Center, Universidad de Uppsala, Suecia).

2. EIE aplicado a las muestras de suero humano

Para el estudio de las muestras de suero humano normal se utilizó el mismo EIE descrito anteriormente (Fig.7A) con la diferencia que se empleó como estándar el β -NGFm obtenido en nuestras condiciones y que se añadió un nuevo control de especificidad con el objetivo de demostrar la inmunodetección de NGF en las muestras de suero. Este paso control consistió en la adición de un exceso de anticuerpo monoclonal anti- β -NGF (concentración final 500ng/mL) a la muestra de suero, en pocillos paralelos (Fig. 7B). La concentración final de NGF en estas muestras fue finalmente calculada después de la sustracción del valor de los pocillos con IgG de ratón, el control negativo (pocillos con STT) y la lectura de los pocillos preincubados con anti- β -NGF 27/21.

Para el estudio de los niveles de NGF en muestras de tejido se utilizó este mismo ensayo sin la adición del paso de bloqueo con anti- β -NGF.

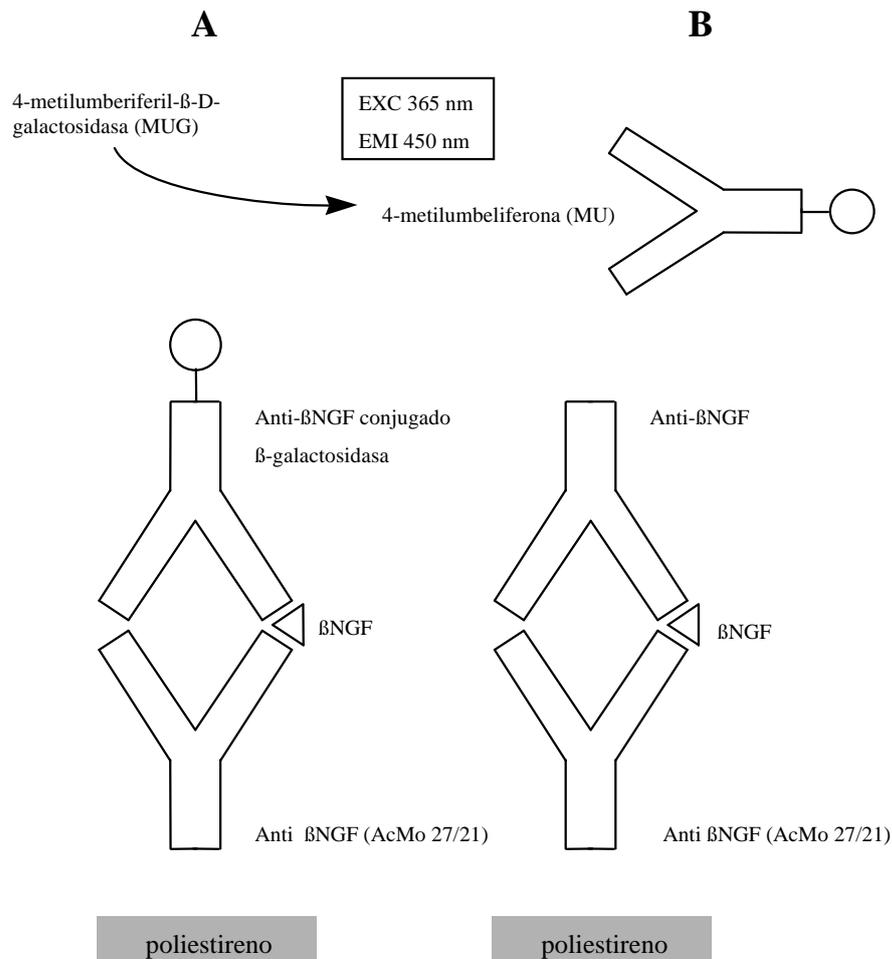


Figura 7: Ilustración esquemática del ensayo inmunoenzimático de doble sitio (A) y el paso de preincubación aplicado como control de especificidad (B).

3. Actividad biológica del NGF en suero

Se utilizó ganglio simpático de embrión de pollo (White Leghorn, Cenpalab, Cuba) para evaluar el efecto promotor de crecimiento nervioso del suero humano normal. El ganglio simpático fue embebido en una matriz de colágeno (Söderström et al. 1990). Para eliminar las sustancias de bajo peso molecular la muestra de suero normal fue concentrada por diálisis a presión (filtro Millipore PTGC, 10,000 MW, Sartorius, Alemania). Las muestras (suero dializado y no dializado) y varias diluciones de NGF (2,1,0.5, 0.25 ng/ml) fueron adicionadas sobre el gel de colágeno, se incubaron a 37° C y CO₂ 5% por 2 días. El crecimiento neurítico alrededor del ganglio se evaluó a las 48 h siguiendo el proceder descrito en el acápite: Ensayo de actividad biológica del β-NGFm.

VI. EVALUACIÓN CONDUCTUAL

Aprendizaje y memoria espacial (Laberinto acuático de Morris)

El laberinto acuático de Morris se utilizó para evaluar el desempeño conductual en varios de los modelos experimentales descritos como se puede apreciar en la Tabla 9.

Esta prueba consiste en la medición del tiempo que demoran los animales en localizar una plataforma transparente de 11 cm de diámetro sumergida 1 cm por debajo de la superficie del agua en una piscina circular de 1.5 m de diámetro y una altura de líquido de 40 cm. Pistas visuales rodean a la plataforma. Un bombillo incandescente de 60 W colocado 2 metros por encima del tanque ilumina la sala.

Tabla 9: Distribución del tipo de evaluación conductual por modelo experimental y la especie utilizada en cada uno de ellos.

Tipo de evaluación conductual	Tipo de lesión o modelo experimental	Especie animal
Aprendizaje y memoria espacial (Laberinto acuático de Morris)	Lesión Septohipocampal	Ratas
	Lesión estriatal (Ácido quinolínico)	Ratas
	Envejecimiento cerebral	Ratas
Asimetría motora	Lesión nigral (6-OHDA)	Ratas
Parkinsonismo (Escala de Kurlan)	Lesión nigral (MPTP)	Monos

La búsqueda de la plataforma por las ratas comenzó en cada intento desde una posición de la periferia del tanque seleccionada aleatoriamente entre cuatro posibles. Una vez encontrada la plataforma se le permitió al animal permanecer en ella durante 30 s antes del siguiente intento. Si transcurridos 60 s de nado no encontraba la plataforma, se le conducía a ella. El tiempo promedio consumido por los animales en localizar la plataforma durante el total de ensayos se definió como latencia de escape promedio.

La plataforma de escape se hizo visible, en los experimentos correspondientes, rodeándola de una cinta adhesiva oscura y haciéndola sobresalir 1 cm desde la superficie del agua.

Las ratas fueron sometidas de 4-8 intentos diarios durante 1-5 días en dependencia del experimento (Tabla 10).

Tabla 10. Esquemas de entrenamiento en el Laberinto acuático de Morris.

Experimento	Tiempo desde el tratamiento	Duración del ensayo (días)	# de intentos
Ácido quinolínico	2 semanas (de inyectado ácido quinolínico)	1	8
Envejecimiento	4 semanas (de iniciado el tratamiento)	5	36
Fimbria –Fórnix	1 semana	5	36

Aquellas ratas viejas con latencias de escape promedio superiores en 3 DE a la media de las latencias de escape promedio de un grupo de animales jóvenes se consideraron con déficit cognitivo. Las ratas con déficit cognitivo representan aproximadamente un 43 % de la población de animales viejos.

Prueba de Rotación inducida por D-anfetamina y apomorfina (asimetría motora)

Esta prueba conductual se realizó para seleccionar los animales que serán incluidos en los grupos experimentales de lesión nigral (ver Tabla 9). Cuatro semanas después de la lesión con 6-OHDA, los animales recibieron una inyección de D-anfetamina por vía intraperitoneal (5mg/kg de peso) y apomorfina por vía subcutánea (sc, 0.05 mg/kg de peso). El número de vueltas contadas durante 90 min. para la D-anfetamina y 45 min. para la apomorfina se evaluó en un Rotómetro automático (RotorCID, Cuba).

Solo fueron incluidas en el estudio las ratas que mostraron como promedio al menos, 7/min. rotaciones completas ipsilaterales (hacia el lado derecho, vueltas/min) después de D-anfetamina y una media de 3.3/min. rotaciones completas (360°) contralaterales (hacia el lado izquierdo, vueltas/min) después de administrar la apomorfina.

Escala de Kurlan

Cinco semanas después de la lesión con MPTP los monos fueron evaluados utilizando la escala para monos hemiparkinsonianos descrita por Kurlan en 1991 (Kurlan, Kim and Gash, 1991, ver Anexo 3). Los puntos que se analizaron son los siguientes: expresión facial, temblor de reposo y de acción, postura, marcha, bradicinesia, actividad espontánea, balance / coordinación, habilidad motora grosera (miembros superiores e inferiores, derecha e izquierda) y reacción de defensa.

VII. EVALUACIÓN BIOQUÍMICA

Obtención de las muestras

Al concluir los tratamientos y evaluaciones las ratas fueron anestesiadas (hidrato de cloral 7%, 6 mL/Kg de peso corporal, ip) y decapitadas. Sus cerebros fueron extraídos y lavados con NaCl 0.9 % frío y las áreas cerebrales estriado y sustancia negra fueron disecadas. Los tejidos se congelaron, pesaron y conservaron a -70 °C hasta su análisis.

Homogenización de las muestras

Las muestras fueron homogenizadas en un potter de vidrio teflón disueltas en 400µL de solución de homogenización que contuvo metabisulfito de sodio 4.4% en HClO₄ 0.1mol/L. Posteriormente se centrifugaron a 14 000 rpm durante 15min a 4°C. Se extrajo el sobrenadante utilizando una jeringuilla de 1ml con su aguja y se filtró por una membrana de poro 0.22µm. La muestra filtrada se conservó a -20°C o en un baño de hielo (si la determinación iba a realizarse de forma inmediata). Del vial que contenía la muestra ya filtrada se tomaron entre 5 y 50µL que constituyen el volumen que se inyectó en el sistema previamente equilibrado.

Cromatografía líquida de alta resolución con detector electroquímico

Los niveles de dopamina fueron determinados utilizando HPLC y detección electroquímica. El sistema de HPLC consistió en una bomba (Philips, PU 41000, USA) acoplada a un detector electroquímico (Amor Spark, Holanda). La separación de la dopamina y sus metabolitos se realizó a través de una columna Hypersil RP18 de 100x4.6mm y 5µm de tamaño de partícula (Supelco, Reino Unido). La fase móvil consistió en una mezcla de NaH₂PO₄ 0.1mol/L, EDTA (Na₂) 0.13mmol/L, ácido octanosulfónico 0.9mmol/L, y H₂O, con una velocidad de flujo de 1mL/min., un potencial de detección de 0.75V y una sensibilidad de 5nA.

VIII. EVALUACIÓN MORFOLÓGICA

Lesión nigral

Las ratas anestesiadas con hidrato de cloral 7% (6 ml/Kg de peso corporal, ip) fueron perfundidas transcardíacamente con 500 mL de NaCl 0.9% y 500 mL de una solución fijadora consistente en paraformaldehído 4% / glutaraldehído 0.1% / ácido pícrico 15% en fosfato de sodio 0.1 mol/L pH 7.4. A continuación los cerebros fueron extraídos, conservados en la solución fijadora por 1 h, lavados con fosfato de sodio 0.1 mol/L pH 7.4, crioprottegidos en sacarosa 7, 15 y 30% (24 h a cada concentración) y congelados en N₂ líquido.

Por medio de un criostato (Leitz-1780, Alemania) se obtuvieron las secciones histológicas (20 µm de grosor) a temperatura de corte de -20°C. Las secciones histológicas se recogieron en láminas portaobjetos previamente recubiertas con gelatina-alumbre de cromo.

Procesamiento inmunohistoquímico: Las láminas con las secciones histológicas para la visualización de las células inmunoreactivas a la tirosina hidroxilasa (TH+) fueron colocadas en solución tampón de fosfato (STF) tres veces durante 7 min. cada una, se incubaron durante 20 min. con solución de bloqueo y permeabilización (suero fetal de ternera 20%, Triton X-100 0.25% en STF), se recubrieron con el anticuerpo anti-TH (1:100, STF suero fetal de ternera 1%

y Triton X-100 0.25%) y se incubaron durante la noche a 4° C. Las láminas fueron lavadas en STF tres veces durante 7 min. e incubadas con el anticuerpo anti IgG de ratón biotinilado durante 1 h (1:500, STF suero fetal de ternera 1% y Triton X-100 0.25%). Después de tres lavados con STF durante 7 min., las láminas fueron incubadas durante 1 h con el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa de rábano, lavadas con STF y reveladas con peróxido de hidrógeno como sustrato de la enzima y tetrahidrocloruro de diaminobenzidina como cromógeno. Las secciones de tejido fueron deshidratadas utilizando una serie de alcoholes de concentraciones ascendentes, aclaradas en xilol y montadas en DPX.

Lesión estriatal

Se obtuvieron secciones coronales del estriado de 20 µm, que se lavaron con fosfato de sodio 0.1 mol/L pH 7.4 (3 veces x 10 min.). Las secciones se tiñeron con violeta de cresilo, para evaluar el grado de lesión y se sometieron al procedimiento para la detección inmunohistoquímica de la proteína fibrilar glial ácida (GFAP). Para esto, las rebanadas se trataron con suero fetal de ternera 2% / Tritón X100 0.2% en STF durante 30 min. y se incubaron durante la noche a 4°C con el antisuero policlonal anti-GFAP (1:1000) y luego con el anticuerpo anti-IgG de conejo (1:250) durante 1h a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones se sumergieron en el conjugado estreptavidina-biotina-peroxidasa (1:100) durante 1 h y la reacción se visualizó con H₂O₂ al 0.02% utilizando el cromógeno diaminobenzidina 0.05%. La reacción se detuvo con agua corriente y las láminas fueron secadas con alcoholes, montadas en portaobjetos y observadas al microscopio óptico (Leitz, Alemania).

IX. PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO

Los valores de NGF obtenidos en suero o tejido son mostrados como la media ± el error estándar de la media (EEM). Luego de verificar la distribución normal mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza por la prueba de Levene se utilizó la prueba *t* de Student para comparar las medias entre grupos. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple para determinar la existencia de diferencias significativas entre todos los grupos para la comparación de los niveles de NGF en diferentes grupos etáreos, las latencias de escape en el laberinto acuático de Morris para los grupos de lesión septohipocámpal y el número de cruces análogos en las ratas viejas con déficit cognitivo. Cuando las determinaciones resultaron significativas ($p < 0.05$) se compararon los grupos uno a uno mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan.

RESULTADOS

I. DETECCIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y CUANTIFICACIÓN DE β -NGF

Estudio 1: Ensayo de actividad biológica del β -NGF

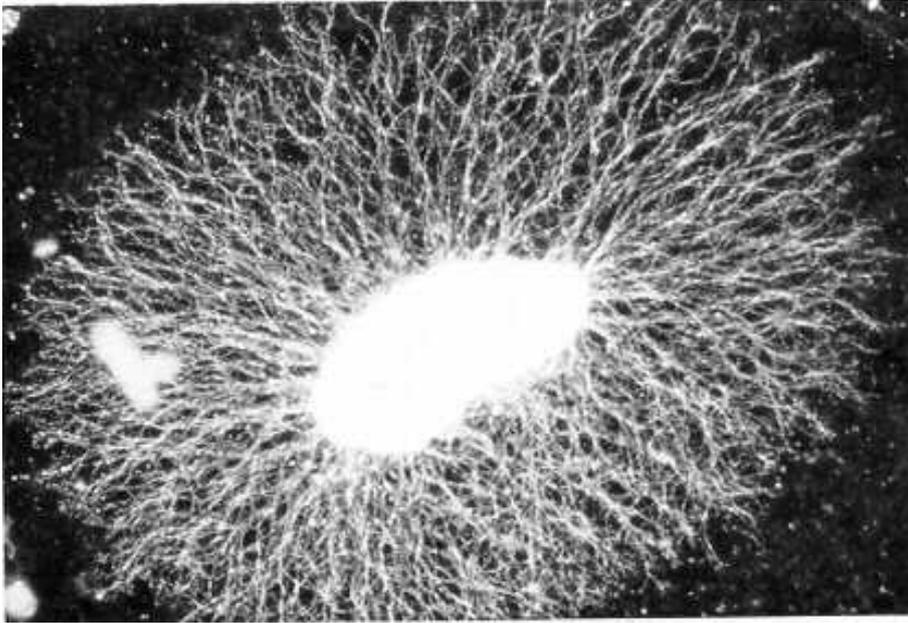
El ensayo de actividad biológica realizado al β -NGFm mostró como UB un rango de concentración de β -NGFm entre 1.5-3 ng/mL. La Figura 8A, muestra un cultivo de ganglio simpático de embrión de pollo embebido en gel de colágeno y medio de cultivo al cual se le añadió 1.5 ng/mL de β -NGFm. Se puede apreciar un halo denso de fibras nerviosas equivalente a una UB de β -NGF. La Figura 8B muestra un cultivo similar al anterior al cual no se le añadió β -NGFm.

Estudio 2: Ensayo inmunoenzimático para cuantificar β -NGF

La Figura 7 muestra un esquema del EIE utilizado en este estudio. La capacidad del EIE para detectar β -NGFm se muestra en la Figura 9 (símbolos llenos). El método se basa en la unión entre un anticuerpo anti- β -NGFm (27/21), el antígeno (β -NGFm obtenido en nuestras condiciones) y el anticuerpo anti- β -NGFm conjugado con β galactosidasa. El EIE es sensible a una concentración de β -NGFm entre 1-2 pg/mL aproximadamente.

Con el objetivo de validar la especificidad de la inmunoreactividad para el β -NGFm obtenida en el ensayo y partiendo del conocimiento de que en ensayos biológicos se necesitan 100 ng/mL de anticuerpo monoclonal 27/21 para bloquear 5 ng/mL de NGF (Soderstrom, 1991) se incubó el β -NGFm con un exceso de anticuerpo monoclonal 27/21 (500 ng/mL) (Fig. 9 símbolos abiertos). Este paso demostró la reducción de la señal observada en el EIE.

A



B

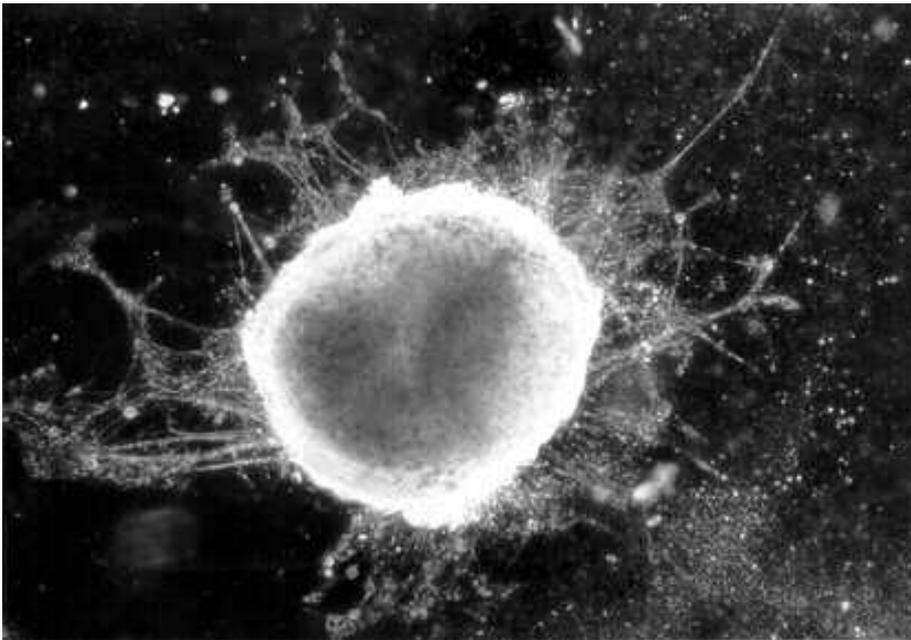


Figura 8. Microfotografía en campo oscuro mostrando ganglio simpático de embrión de pollo cultivado por dos días en gel de colágeno. A: Halo de fibras formado por la adición de 1.5 ng/ml de β -NGFm al gel equivalente a 1 Unidad Biológica de NGF. B: Ganglio cultivado sin β -NGFm.

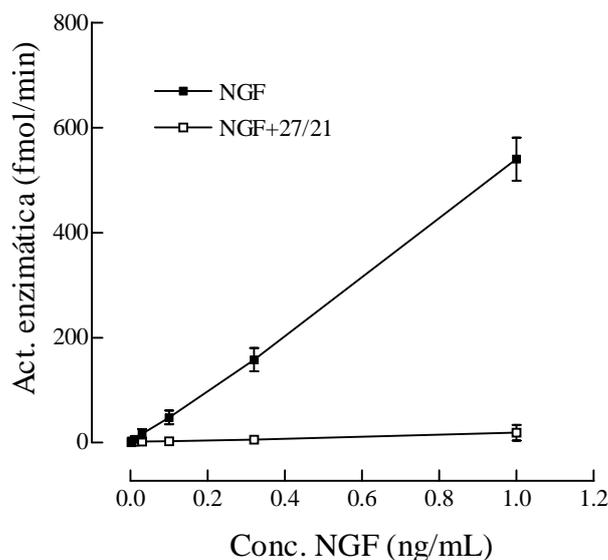


Figura 9. Curva dosis-respuesta para el β -NGFm obtenido en nuestras condiciones. Se evidencia una relación lineal cuando la actividad de la enzima es leída en las condiciones usadas. El límite de detección para el NGF está alrededor de los 2 pg/mL. Los símbolos abiertos muestran la curva obtenida después de la preincubación con un exceso de anticuerpo monoclonal 27/21 anti- β -NGFm (500 ng/mL). El resultado representa la media \pm el error estándar de la media (EEM) de tres determinaciones independientes. El EEM no es mostrado cuando es menos ancho que el símbolo.

Detección de NGF en suero humano

El próximo paso consistió en la demostración de la capacidad del EIE, descrito anteriormente, para cuantificar muestras de suero humano utilizando el anticuerpo anti- β -NGFm 27/21.

Al cuantificar NGF en muestras de suero humano normal por medio del EIE descrito anteriormente, se observó una señal dependiente de la concentración (Fig. 10A, símbolos llenos). Con el objetivo de distinguir entre la unión no específica al conjugado anticuerpo-NGF y la señal real de NGF presente en el suero humano se introdujo un paso de preincubación (Fig. 10A) de la muestra con un exceso del anticuerpo monoclonal 27/21 anti- β -NGFm (0.5 μ g/mL). Al usar esta estrategia, fue posible disminuir parcialmente la señal obtenida en el suero (Fig. 10A) lo que demuestra que existe β -NGFm inmunoreactivo en esta muestra.

Otras muestras de suero estudiadas: suero fetal de carnero y suero de monos

Una vez demostrada la inmunodetección de NGF en muestras de suero humano nos dimos a la tarea de comparar la efectividad del método con muestras de suero de otras especies y de esta forma fueron evaluados suero fetal de carnero y suero de monos. Las muestras de suero

humano y suero fetal de carnero se diluyeron seriadamente y cuantificaron por medio del EIE de doble sitio en condiciones similares a las descritas anteriormente. En contraste con el resultado del suero humano, no fue detectable NGF inmunoreactivo en las diferentes diluciones del suero fetal de carnero (Fig. 10B).

El suero de monos fue otra muestra que nos resulta de interés evaluar su detección por medio del EIE ya que es una especie animal muy utilizada en modelos experimentales de neurodegeneración y cercana al humano. La Figura 10 C (símbolos llenos) demuestra la detección de NGF en el suero de monos. La muestra de suero de mono, de igual forma que el suero humano, se preincubó (Fig. 10 C) con un exceso de anti-NGF (concentración final: 0.5 $\mu\text{g/mL}$). Se demostró la detección inmunológica de NGF en el suero de monos (Fig. 10 C símbolos abiertos).

En las muestras de monos se evaluó también el comportamiento de los niveles de NGF atendiendo al género, la especie y el sexo y se vió que al comparar los niveles séricos de NGF entre las especies de monos estudiadas del género *Macaca*: *M. arctoide* (0.101 ng/mL), *M. irus* (0.106 ng/mL) y *M. mulata* (0.191 ng/mL) no se observaron diferencias estadísticamente significativas. De igual forma, no se observaron variaciones entre los géneros *Macaca* (0.116 ng/mL) y *Papio* (0.171 ng/mL) y entre los sexos (masculino: 0.180 ng/mL y femenino: 0.100 ng/mL). Estos resultados permitieron unificar las muestras de los monos normales de diferentes géneros, especies y sexo (no mostrado).

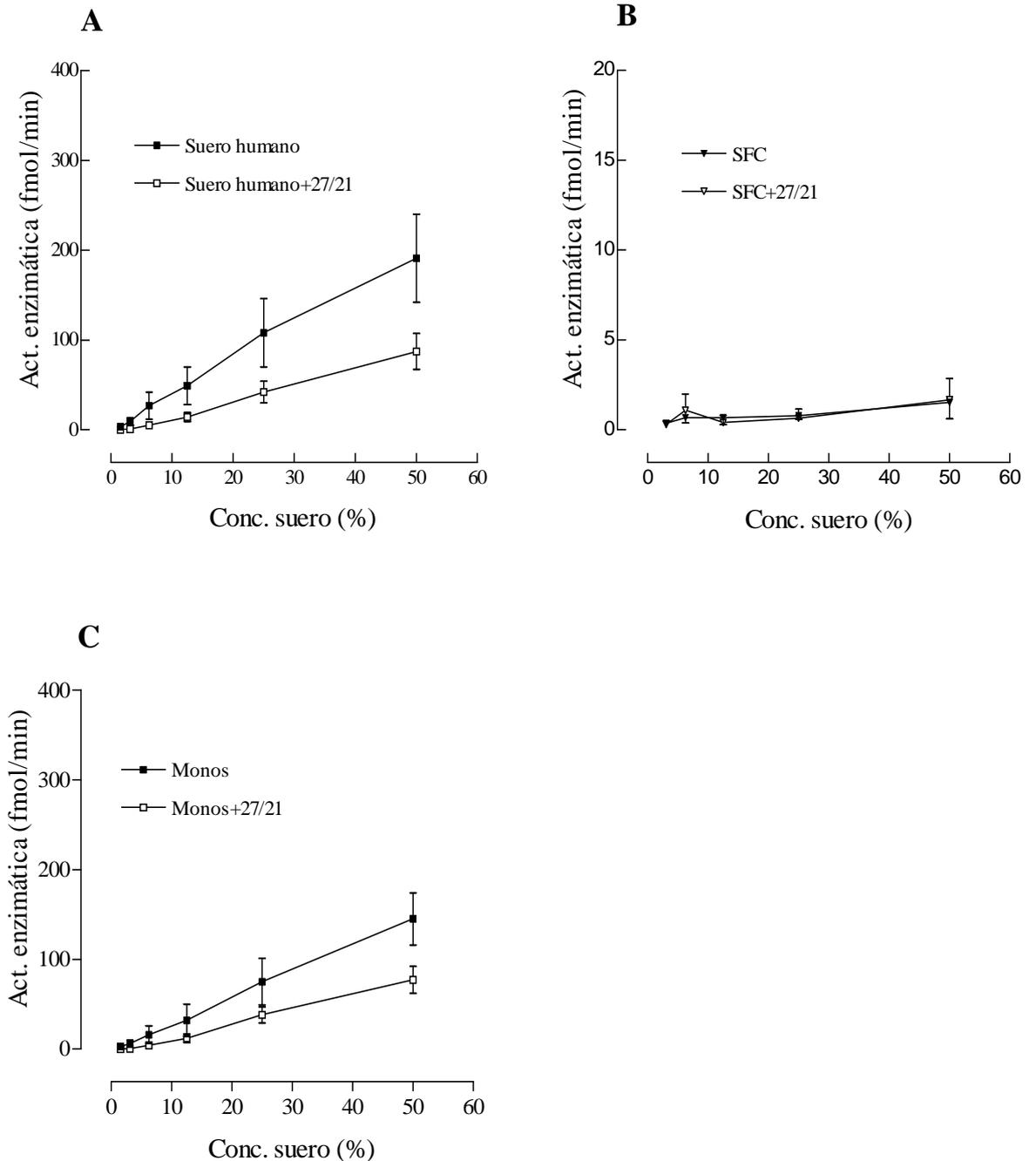


Figura 10. Resultado del ensayo inmunoenzimático aplicado a suero humano normal, suero fetal de carnero (SFC) y suero de monos. **A:** Lectura de la actividad de la enzima para suero humano usando condiciones normales y con el paso de preincubación que reduce la actividad de la enzima indicando la presencia de NGF en esta muestra. **B:** Como en A pero para SFC. No fue detectado NGF en el SFC. **C:** Como en A pero para suero de monos. Se detecta NGF en la muestra de monos. Notar la diferencia en las escalas para la actividad de la enzima en A y B. Se muestra la media \pm el error estándar de la media.

Evaluación de otras neurotrofinas por el EIE

Dada la similitud entre los diferentes miembros de la familia de las neurotrofinas, nos propusimos evaluar la posible reacción cruzada entre el anticuerpo monoclonal utilizado en el EIE y las neurotrofinas: BDNF y NT-3. En las condiciones descritas en este trabajo, el EIE no reconoce las otras neurotrofinas estudiadas (datos no mostrados).

Determinación de recobrado del β -NGFm adicionado al suero humano normal

Una concentración conocida de NGF (1 ng/mL) fue adicionada a diferentes concentraciones de suero humano con el objetivo de determinar el recobrado del EIE (Fig. 11). Se detectó un 80% de recobrado para la concentración más alta de suero utilizada (50%). Este estudio demuestra un recobrado constante del NGF adicionado a cada una de las diluciones estudiadas del suero humano. Al bloquear la inmunoreactividad por medio de la adición de un exceso de anti- β -NGFm al suero se evidenció una reducción efectiva de la actividad de la enzima en la muestra a la que se le añadió NGF (Fig. 11, símbolos abiertos).

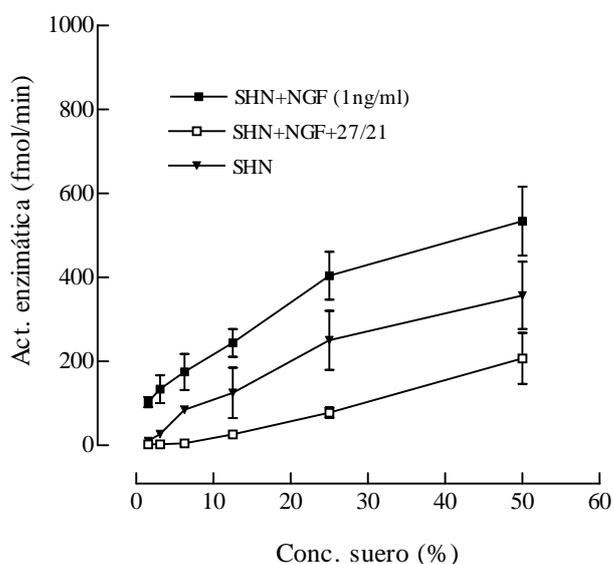


Figura 11. Demostración de la capacidad del ensayo para medir una concentración conocida de NGF (1ng/mL) adicionado al suero humano normal (SHN). Una muestra de SHN fue dividida y a una mitad se le añadió NGF (SHN+NGF). A la parte de la muestra que se le añadió NGF fue nuevamente dividida y una parte fue preincubada con anti- β -NGFm (500ng/mL) (SHN+NGF+27/21). Se muestra la media \pm el error estándar de la media.

Ensayo de actividad neurotrófica del NGF en el suero humano normal

En la búsqueda de la presencia de actividad biológica del NGF en el suero humano se desarrolló un ensayo de actividad biológica para estas muestras en ganglio simpático de embrión de pollo.

En la Fig. 12 se muestra el efecto tóxico del suero humano en un ensayo biológico realizado en ganglio simpático de embrión de pollo. Con el propósito de delimitar si el efecto tóxico lo provocan sustancias de bajo peso molecular presentes en el suero humano, se concentró el mismo por diálisis a presión y se evaluó la relación dosis respuesta entre el suero humano y el crecimiento neurítico en ganglio simpático. El resultado de esta evaluación se comparó con la respuesta obtenida con β -NGFm diluido en medio de cultivo (BME) (Fig. 12). El suero humano reduce la actividad del NGF, el suero no-dializado reduce el crecimiento de fibras en mayor medida que el suero dializado, resultados que reafirman el planteamiento de la existencia de factores inhibitorios del crecimiento neurítico en las muestras de suero humano.

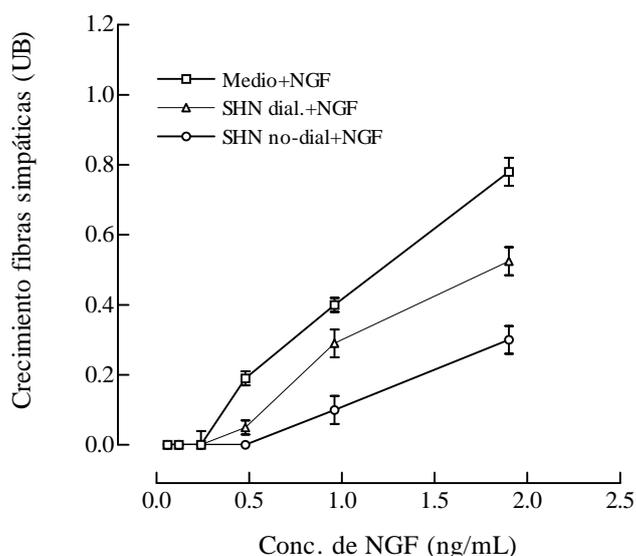


Figura 12. Crecimiento neurítico de ganglio simpático de embrión de pollo provocado por la adición de diferentes diluciones de suero humano normal (SHN) y NGF. La curva dosis – respuesta del dializado y el no dializado y el crecimiento neurítico del ganglio simpático fueron evaluados y comparados con la actividad del NGF diluido en medio de cultivo. El SHN reduce la actividad en ambos casos, aunque el SHN no-dializado reduce la actividad del NGF en un mayor grado que el SHN dializado. El crecimiento fue medido a las 48 horas. Se muestra en cada punto la media de 3 determinaciones \pm el error estándar de la media.

II. DISPONIBILIDAD DEL NGF EN PROCESOS NEURODEGENERATIVOS

Estudio 3. NGF en enfermedades neurológicas

El próximo paso fue determinar las concentraciones de NGF humano presentes en el suero de pacientes con diversas enfermedades neurológicas: EA, EP y EH (Fig. 13). En el suero de pacientes con EA no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de NGF al ser comparados con el grupo control, mientras que en la EP y en la EH se encontró una reducción en las concentraciones de NGF séricas en un 57% (EP) y 69% (EH) evidenciada en la diferencia ($p < 0.01$) entre el valor medio de los sujetos normales y los pacientes con EP y EH respectivamente.

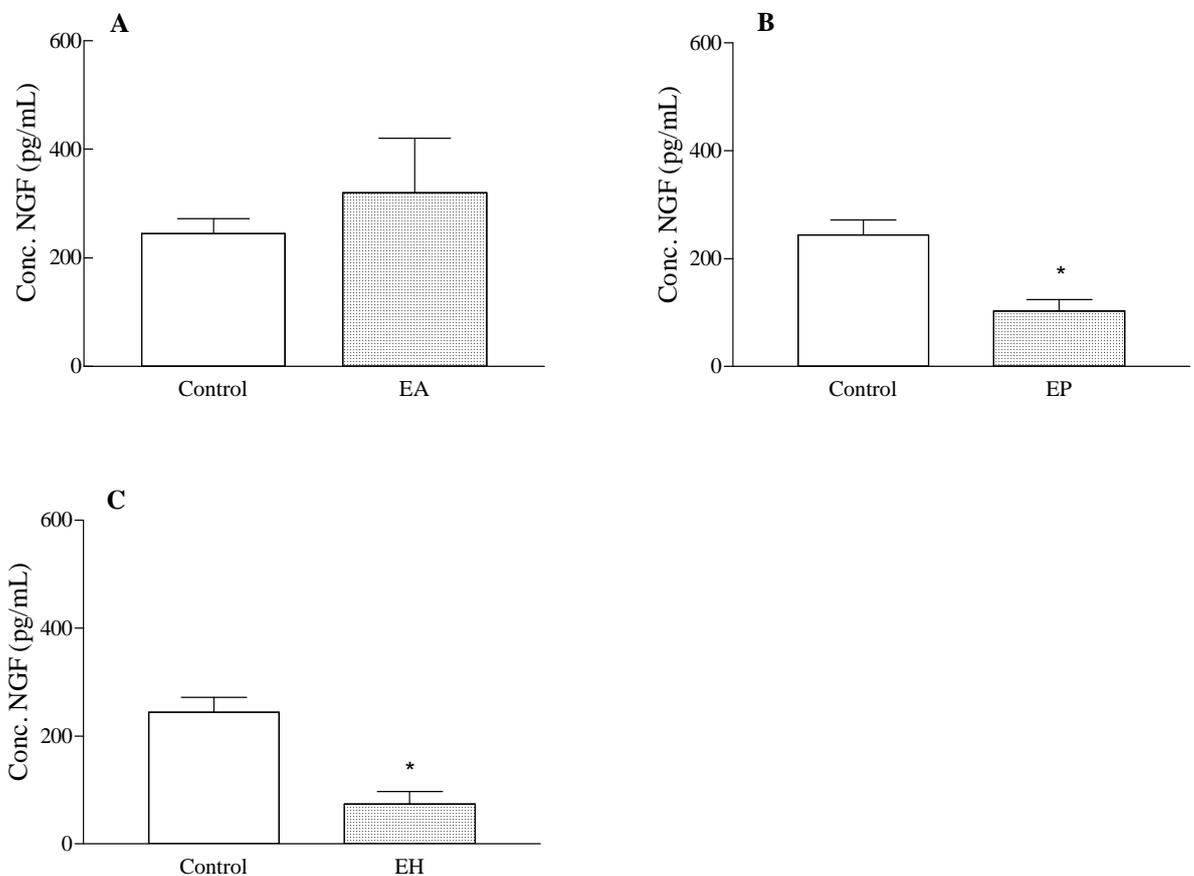


Figura 13. Comparación de los niveles de NGF en el suero de pacientes con diferentes enfermedades neurodegenerativas y el suero de sujetos control. A: Comparación entre los niveles de NGF en el suero de pacientes con Enfermedad de Alzheimer (EA, n=13) y del grupo control (n=49). B: como en A pero para la Enfermedad de Parkinson (EP, n=38). C: como en A pero para la Enfermedad de Huntington (EH, n=6). El suero de pacientes con EP y EH mostraron reducidos valores de NGF al ser comparados con el suero control. Se muestra la media \pm el error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó por la prueba *t* de Student (* $p < 0.01$).

Estudio 4. Relación entre el NGF, el deterioro neurodegenerativo y el tratamiento con L-dopa en la EP

Con el objetivo de analizar si el grado de deterioro producido por la EP tiene alguna influencia en los niveles de NGF, se agruparon los pacientes con EP atendiendo al estadio de la enfermedad según la escala de Hoehn y Yahr. De esta forma, se compararon los pacientes con EP evaluados como Grado I-II y los Grado III-IV (Fig. 14A). Los pacientes con Grado I-II de la enfermedad mostraron una reducción significativa ($p < 0.05$) de NGF (59 pg/mL, valor medio) cuando se compararon con el grupo de pacientes con Grado III-IV (146 pg/mL, valor medio). Al comparar estos dos grupos (Grado I-II y Grado III-IV) contra los valores de NGF del grupo control se pudo apreciar que en los pacientes con Grado I-II los valores de NGF son significativamente diferentes ($p < 0.01$) del grupo control (245 pg/mL, valor medio, Fig. 14B) no así, para los pacientes con Grado III-IV que no difieren estadísticamente de los controles (no mostrado). Este comportamiento sugiere que los niveles de NGF están reducidos en los estadios iniciales de la enfermedad y que aumentan con la progresión de la misma.

A pesar de que la L-Dopa es el agente terapéutico más efectivo en la EP poco se conoce de sus efectos sobre el metabolismo de los factores neurotróficos. Para evaluar el efecto que ejerce la L-dopa sobre el NGF en los pacientes con EP, evaluamos casos sin-L-dopa y casos tratados con L-dopa y se pudo apreciar que no existen diferencias entre estos grupos a pesar de que se observa una tendencia a valores mayores de NGF en el grupo que toma L-dopa (Fig. 14C).

Estudio 5. NGF en modelos experimentales de neurodegeneración

- ***Lesión nigral con MPTP***

Evaluación conductual Los monos fueron evaluados cinco semanas después de la lesión por medio de la escala para monos parkinsonianos descrita por Kurlan (Kurlan, Kim and Gash, 1991). Todos los animales cumplieron con los parámetros establecidos para ser considerados como bien lesionados.

Niveles de NGF No se evidenciaron diferencias significativas entre los niveles de NGF de monos lesionados con MPTP y no lesionados (Fig. 15).

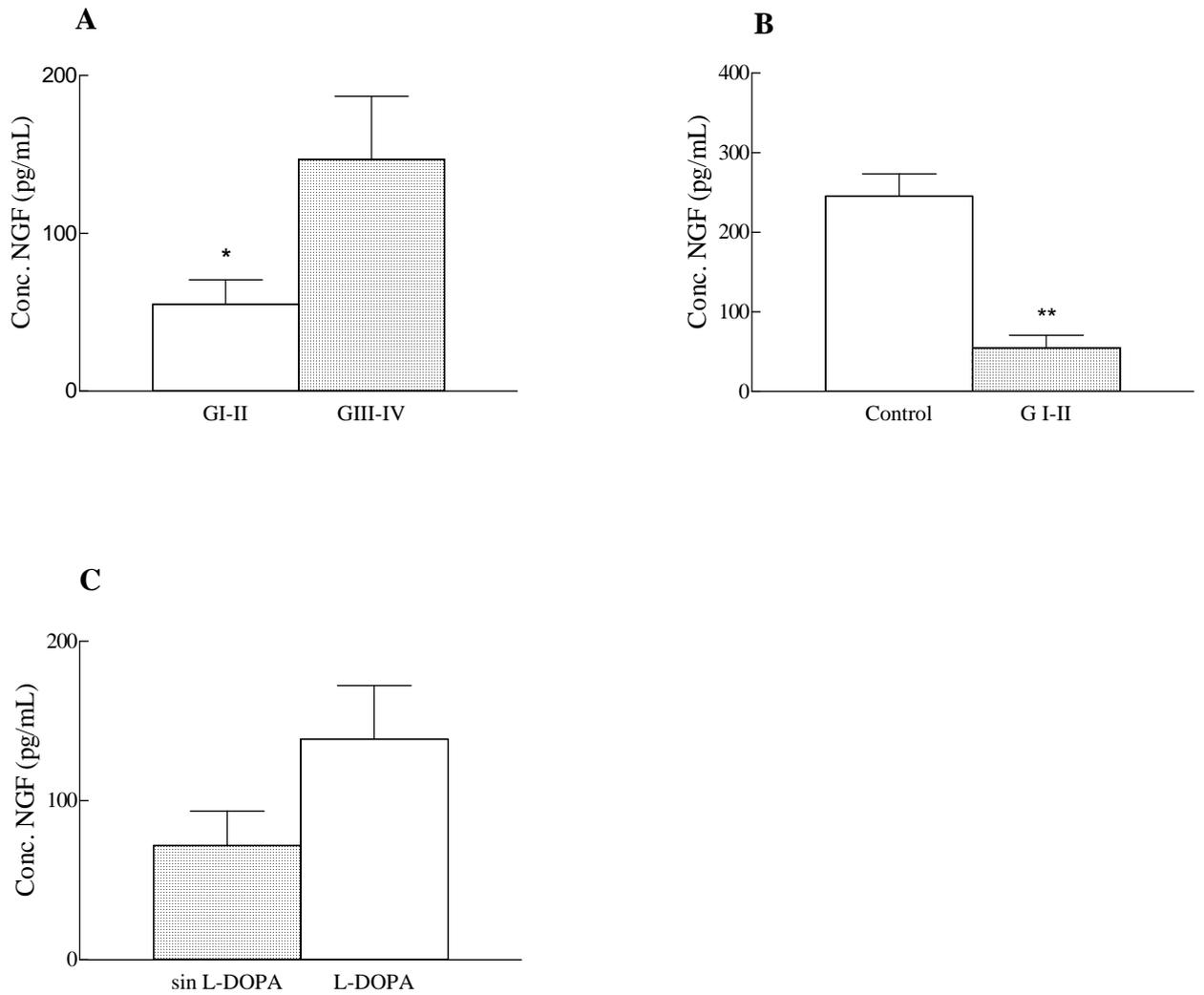


Figura 14. Niveles de NGF sérico en pacientes con enfermedad de Parkinson agrupados según el estadio de la enfermedad (GI-II y GIII-IV de la escala de Hoehn y Yahr) y de acuerdo al tratamiento con L-dopa (L-DOPA, n=27) y sin tratamiento (sin-L-DOPA, n=11). **A**: Comparación entre los niveles de NGF de pacientes en GI-II (n=17) y GIII-IV (n=21). **B**: Comparación de los niveles de NGF entre los diferentes grados de la enfermedad y el grupo control. **C**: Comparación entre las medias de los niveles de NGF y el tratamiento con L-dopa. El análisis estadístico se realizó por la prueba t de Student. * p<0.05 vs GIII-IV, **p<0.01 vs control.

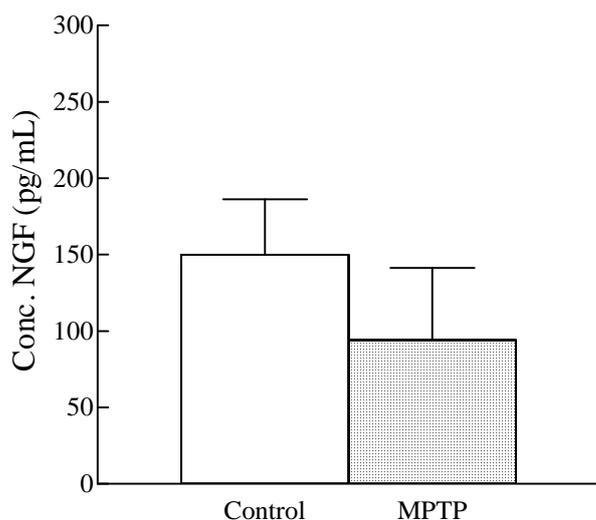


Figura 15: Niveles de NGF en suero de monos lesionados con MPTP (MPTP, n=4) y monos control (n=10). Se muestra la media \pm el error estándar de la media.

- **Lesión nigral con 6-OHDA**

Estudio conductual Al evaluar la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina y por apomorfina se observó que las ratas a las que se les inyectó la neurotoxina, no mostraron igual sensibilidad a esta. Entre un 70-80% de los animales mostraron actividad rotatoria inducida por agonistas dopaminérgicos acorde con nuestros criterios de inclusión (datos no mostrados).

Estudio bioquímico La lesión con 6-OHDA provocó una disminución de la concentración de dopamina en el estriado y la sustancia negra ipsilateral. La concentración de dopamina estriatal en el grupo de animales lesionados fue de 0.36 $\mu\text{g/g}$ de tejido, mientras que en la sustancia negra fue de 0.28 $\mu\text{g/g}$ de tejido, lo cual representa un 38.9% y un 47% del contenido de dopamina del estriado y la sustancia negra de los animales sanos respectivamente. Las concentraciones de 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido homovalínico (HVA) de los animales lesionados estuvieron por debajo del límite de cuantificación de la técnica tanto en el estriado como en la sustancia negra. En los controles sanos las concentraciones de DOPAC fueron de 1.35 ± 0.06 y 0.15 ± 0.10 y las de HVA de 0.57 ± 0.03 y 0.3 ± 0.4 en el estriado y la sustancia negra respectivamente.

Estudio morfológico La inyección estereotáctica con la neurotoxina 6-OHDA produjo la pérdida casi completa de las células dopaminérgicas TH+ en la sustancia negra parte compacta del hemisferio derecho, donde fue inyectada, y la desaparición de fibras inmunoreactivas en el cuerpo estriado, donde casi no se observaron células teñidas (Fig. 16).

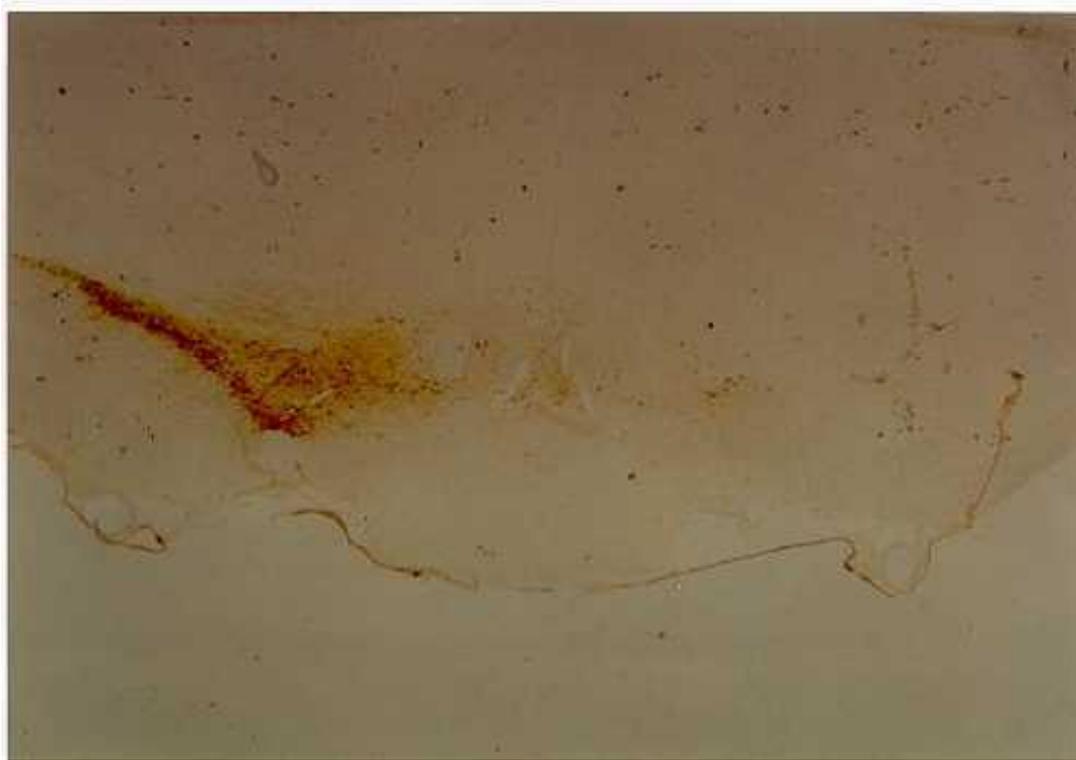


Figura 16: Microfotografías representativas de secciones de cerebros de ratas con la inmunotinción a la tirosina hidroxilasa luego de la lesión con 6-OHDA. Notar la ausencia de actividad en la región correspondiente a la Sustancia negra compacta en el hemisferio lesionado (flecha).

En resumen, los estudios conductuales, neuroanatómicos y bioquímicos de la lesión con 6-OHDA realizados en este trabajo evidenciaron una asimetría motora inducida por apomorfina y D-anfetamina; así como, la pérdida significativa de las células dopaminérgicas de la sustancia negra compacta evidenciada por una disminución en la inmunoreactividad a la TH del hemisferio lesionado y una disminución significativa de los niveles de dopamina en estriado y sustancia negra.

Niveles de NGF La lesión con 6-OHDA provocó una disminución de un 84% en los valores de NGF en el suero de ratas hemiparkinsonianas ($p < 0.01$) (Fig. 17). En este caso, a diferencia de los monos tratados con MPTP (Fig. 15) la disminución fue estadísticamente significativa (Fig. 17).

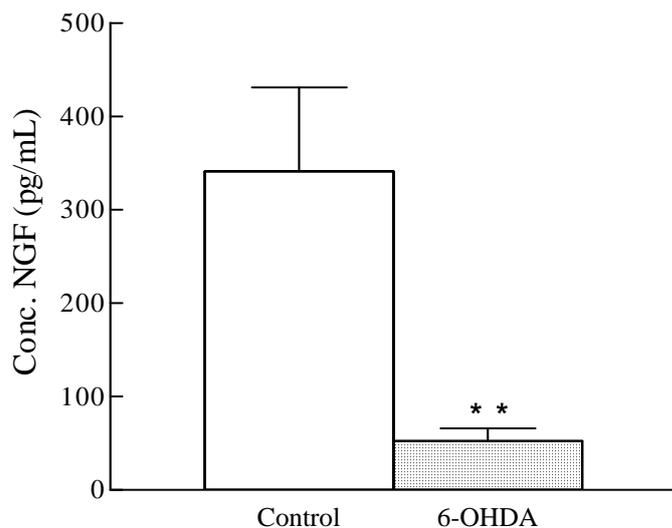


Figura 17. Niveles séricos de NGF de ratas hemiparkinsonianas (6-OHDA, n=11) y en el control (Control, n=28). Las ratas lesionadas tienen una reducción significativa de los niveles de NGF. Se muestra la media \pm el error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó por la prueba *t* de Student (** $p < 0.01$).

- ***Lesión estriatal con ácido quinolínico***

Estudio conductual Con el propósito de verificar la efectividad de la lesión se estudió su efecto sobre el aprendizaje y la memoria. En ese estudio, se evaluó el desempeño conductual en el laberinto acuático.

Las ratas lesionadas con AQ mostraron un deterioro en el desempeño cognitivo en el laberinto acuático al tener latencias de escape significativamente superiores ($p < 0.05$) a la de los animales normales, confirmando así la eficacia de la lesión.

Estudio morfológico Los estriados lesionados con AQ sufrieron pérdida de su parénquima evidenciado por la reducción en su volumen, que se acompañó de la dilatación del ventrículo adyacente (Fig. 18B). Por otra parte, se apreció cualitativamente un incremento en la inmunoreactividad a la proteína fibrilar glial ácida en el estriado lesionado con respecto al contralateral debido a la visible hipertrofia de los astrositos (Fig. 18A y B).

A



B

Figura 18. Microfotografías representativas de secciones coronales de cerebros de ratas con la tinción de Nissl y la inmunotinción a la proteína fibrilar ácida luego de la lesión con ácido quinolínico. **A:** Hemisferio intacto. **B:** Hemisferio lesionado una semana después de la lesión mostrando la dilatación del ventrículo derecho adyacente al estriado lesionado y la respuesta glial en esta área (aumento 20x).

Niveles de NGF: La inyección de AQ en el estriado derecho causó una disminución estadísticamente significativa de los niveles séricos de NGF cuando se compara con los animales del grupo control (Fig. 19).

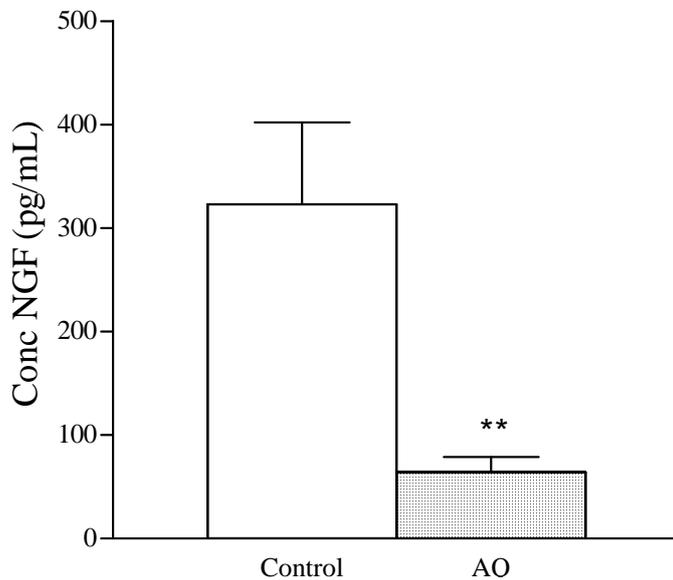


Figura 19. Niveles de NGF en ratas con lesión estriatal con ácido quinolínico (AQ). Comparación de los niveles séricos de NGF del grupo lesionado con AQ (n= 8) y control (n=28). Se muestra la media \pm el error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó por la prueba t de Student (**p<0.01).

- Lesión septohipocampal o Fimbria-Fórnix

Estudio conductual: Las ratas con lesión de la vía septohipocampal o fimbria-fórnix mostraron un deterioro en el desempeño cognitivo en el laberinto acuático al tener una disminución en el número de cruces análogos (p<0.05) cuando se comparan con el grupo control.

Niveles de NGF: En los animales lesionados por transección de la vía septohipocampal los niveles de NGF no difieren estadísticamente del grupo control (Fig. 20) a pesar de que se aprecia una tendencia a la disminución de los niveles séricos de NGF en este grupo.

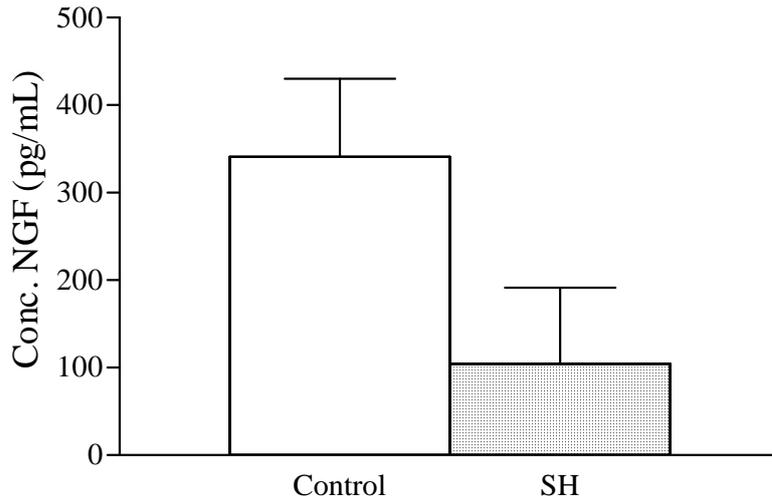


Figura 20. Niveles séricos de NGF en ratas con lesión septohipocampal (SH, n=4) y el grupo control (n=8). Se muestra la media \pm el error estándar de la media.

Envejecimiento cerebral

Evaluación conductual: Aquellas ratas viejas con latencias de escape promedio superiores a 3 DE a la media de las latencias de escape promedio de un grupo de animales jóvenes fueron consideradas con déficit cognitivo.

Niveles de NGF: El déficit cognitivo se asoció con una disminución de los niveles de NGF séricos lo cual se puede apreciar al comparar los niveles séricos de NGF en ratas viejas con déficit cognitivo y viejas sin déficit. Se observó una reducción significativa del NGF en las ratas con déficit ($p < 0.05$) (Fig. 21).

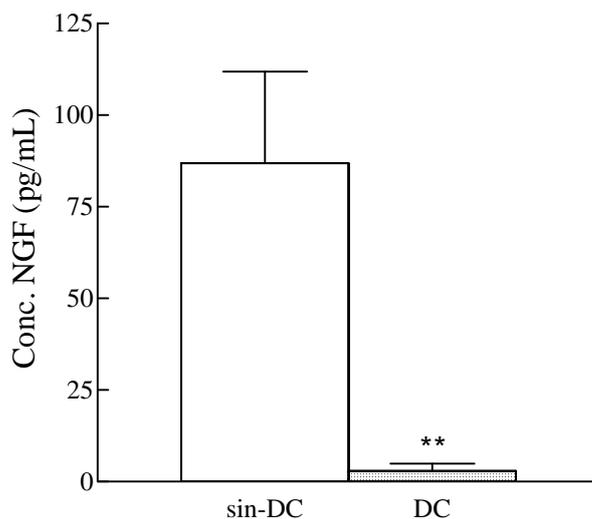


Figura 21. Niveles séricos de NGF y envejecimiento cerebral en ratas. Comparación de los niveles séricos de NGF entre un grupo de ratas viejas sin déficit cognitivo (sin-DC, n=6) y otro con déficit (DC, n= 5). Se muestra la media \pm el error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó por la prueba *t* de Student (** $p < 0.01$).

Estudio 6. NGF y envejecimiento

Con el propósito de determinar si en las especies estudiadas en este trabajo existen diferencias en el contenido de NGF asociadas al envejecimiento, se estudiaron muestras de suero de ratas, suero humano y suero de monos. Se observó un decremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en el suero de ratas viejas (Fig. 22A) y en el suero de monos viejos ($p < 0.01$, Fig. 22B) al ser comparados con el suero de animales jóvenes. Sin embargo, el suero humano normal no mostró diferencias en los niveles de NGF entre los diferentes grupos etáreos estudiados (Fig. 22C).

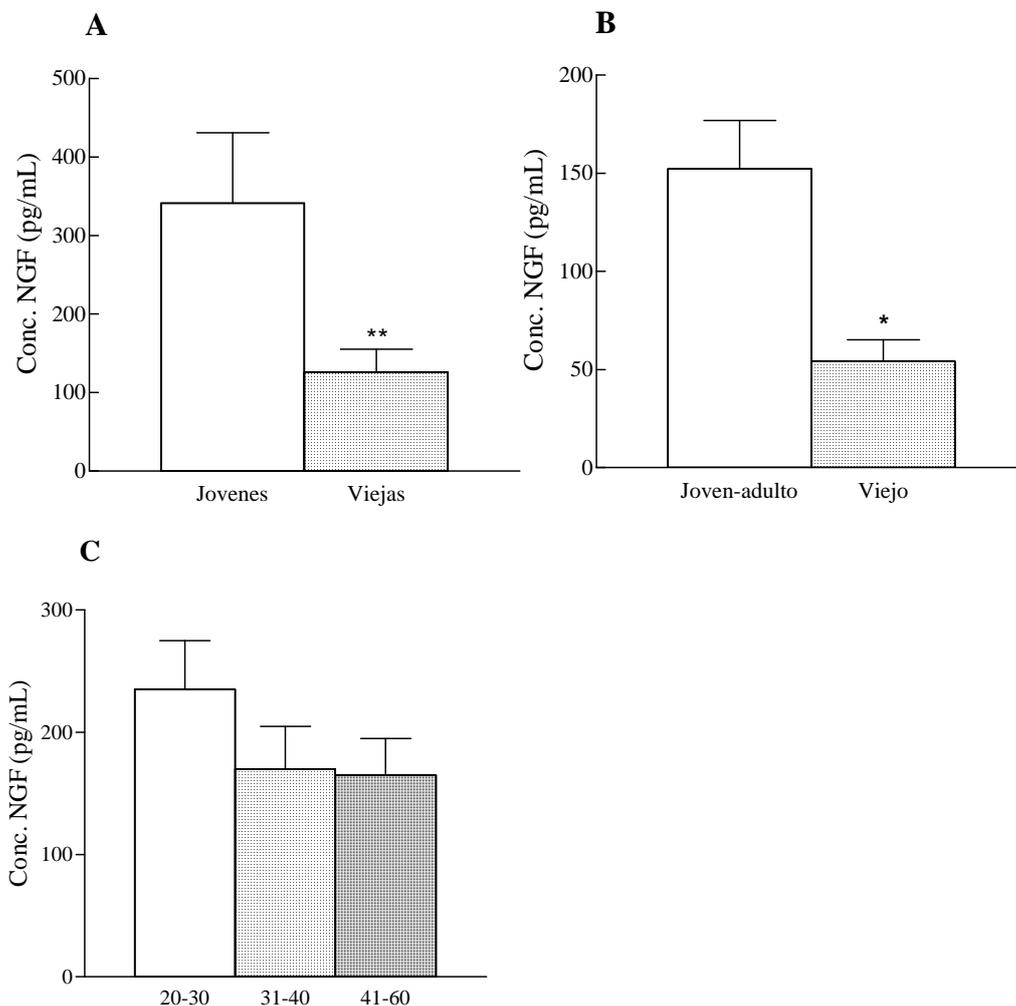


Figura 22. Niveles séricos de NGF en ratas, monos y humanos atendiendo a la edad. **A**: Cuantificación de NGF en suero de ratas jóvenes ($n=28$) y viejas ($n=24$). **B**: En el suero de monos se evaluaron dos grupos etáreos: jóvenes-adultos ($n=69$) y viejos ($n=25$). **C**: El suero humano no mostró diferencias al ser comparado los diferentes grupos etáreos, de 20 a 30 ($n=59$), de 31 a 40 ($n=49$), de 41 a 60 años ($n=49$). Se muestra la media \pm el error estándar de la media. El análisis estadístico para A y B se realizó por la prueba *t* de Student y para C por ANOVA y prueba de Duncan. ** $p < 0.01$ vs jóvenes, * $p < 0.01$ vs joven-adulto.

III. EFECTO DEL TRATAMIENTO NEURORRESTAURADOR SOBRE EL CONTENIDO DE NGF

Estudio 7. Terapia neurorestaurativa en la EP

Se evaluaron los cambios en los niveles de NGF ocurridos después de la aplicación de diferentes técnicas neurorestaurativas: microtrasplante de células mesencefálicas fetales en ratas lesionadas con 6-OHDA, neurotrasplante en pacientes con EP y autotrasplante de células cromafines e infusión ICV de β -NGFm simultáneamente.

- Microtrasplante de células mesencefálicas fetales en un modelo de lesión con 6-OHDA

En la Figura 23 se puede apreciar que la combinación del trasplante en estriado y núcleo subtalámico provocó un incremento en los valores séricos de NGF en suero ($p < 0.05$) al ser comparado con el grupo lesionado. De igual forma, se evidenció en los estudios conductuales (prueba de rotación inducida por D-anfetamina y apomorfina) que el mejor comportamiento lo mostraron aquellos grupos experimentales con microtrasplante en estriado o en combinación de este núcleo con núcleo subtalámico (no mostrado).

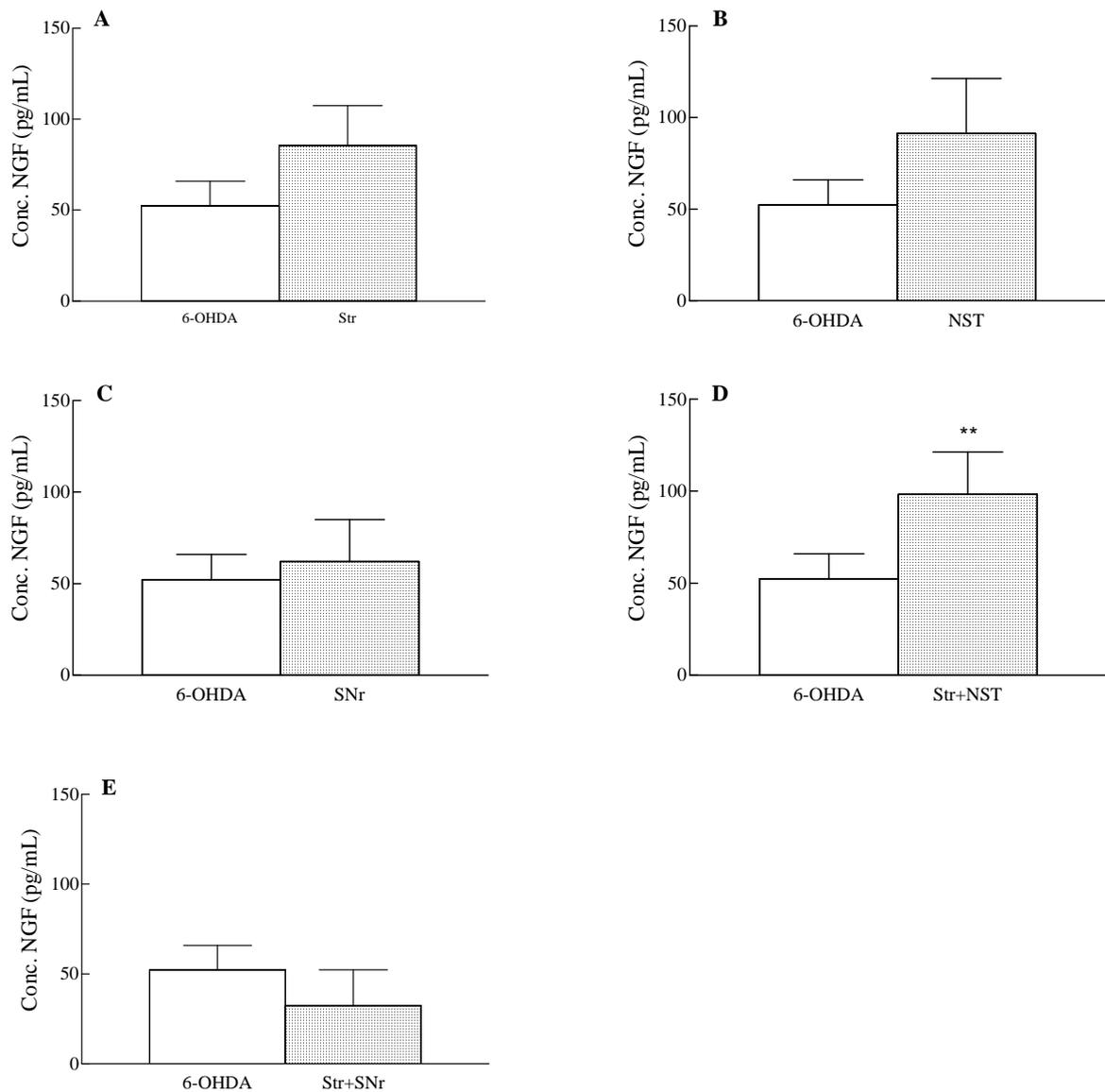


Figura 23. Niveles séricos de NGF en ratas hemiparkinsonianas trasplantadas en diferentes núcleos de la base. **A:** Se muestra la comparación entre las ratas lesionadas (6-OHDA, n=11) contra las ratas lesionadas y trasplantadas en estriado (Str, n=24). **B:** como en A pero el trasplante en núcleo subtalámico (NST, n=14). **C:** como en A pero el trasplante en sustancia negra reticulada (SNr, n=11). **D:** como en A pero el trasplante en Str y NST (Str+NST, n=6). **E:** como en A pero el trasplante en Str y SNr (Str+SNr, n=5). Se muestra la media \pm el error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó por la prueba *t* de Student. ** $p < 0.01$ vs 6-OHDA.

- Neurotrasplante de células mesencefálicas fetales en pacientes con EP

El estudio evolutivo de los niveles de NGF en el suero de pacientes con EP que recibieron trasplante de células mesencefálicas fetales mostró una discreta disminución de la concentración de NGF a la primera semana de evolución del trasplante, mientras que al tercer y sexto mes post-trasplante se observó un incremento significativo de NGF al ser comparado con el estudio pretratamiento (Fig. 24A).

En estos pacientes también se evaluaron los índices de IgG y albúmina con el objetivo de conocer el comportamiento del estado funcional de la barrera hematoencefálica. En la Figura 24B se muestra el comportamiento evolutivo de estos índices y se aprecia un aumento de los mismos en el primer mes de evolución del trasplante, en los meses siguientes (segundo, cuarto y quinto mes), existe una tendencia a valores cercanos a los del estudio pretrasplante aunque no se recuperan totalmente.

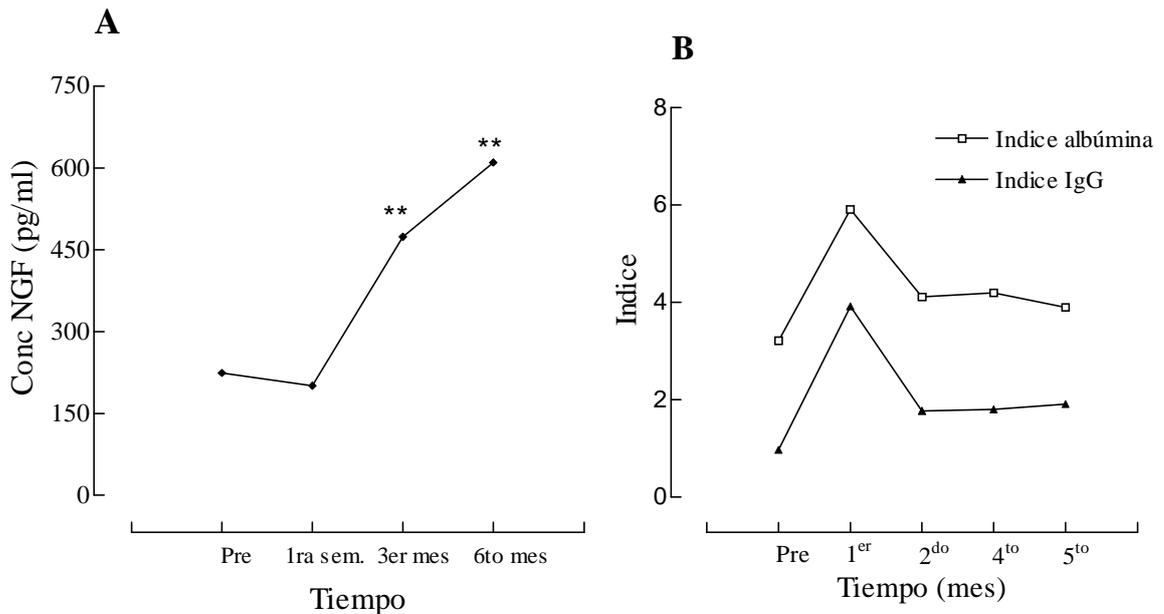


Figura 24. Comportamiento evolutivo de los niveles de NGF y los índices IgG y albúmina en pacientes con enfermedad de Parkinson (Grado III-IV según la escala de Hoehn y Yahr) neurotrasplantados con suspensión de células mesencefálicas fetales humanas. **A:** Cambios en los niveles de NGF. Se observa un incremento en la concentración de NGF al tercer y sexto mes de evolución del trasplante. El análisis estadístico fue realizado por la prueba de rangos de Wilcoxon, ** $p < 0.001$. **B:** Índices de IgG y albúmina.

- Autotrasplante de células cromafines e infusión de β -NGFm

En los niveles de NGF del paciente con EP que recibió infusión ICV de β -NGFm como apoyo al autotrasplante de células de médula adrenal se constató un incremento de NGF después de recibir el tratamiento cuando se compara con la concentración de NGF hallada antes del tratamiento (Fig. 25A). La mayor parte del valor de NGF detectado fue bloqueado cuando se utiliza un exceso del anticuerpo monoclonal 27/21 anti- β -NGFm en pocillos paralelos (Fig. 25B). La comparación entre los niveles de NGF pre y post-tratamiento indica un aumento del NGF a los 79 días de recibir el trasplante e infusión de NGF (Fig. 25A).

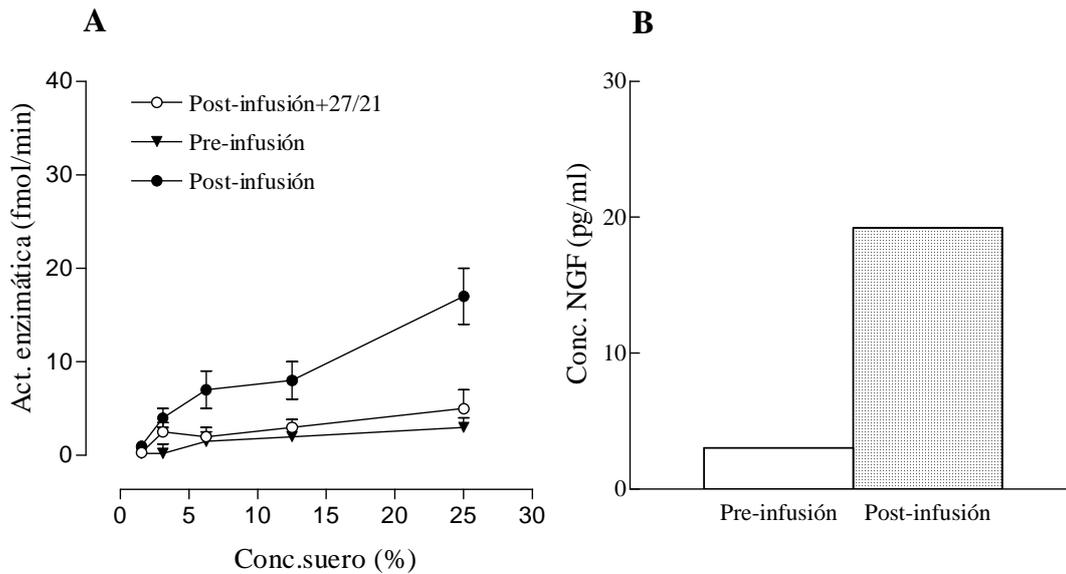


Figura 25. Cambios en los niveles de NGF en el suero de un paciente con enfermedad de Parkinson que recibió infusión de NGF como soporte del autoinjerto de células cromafines. Las muestras de suero fueron tomadas pre y post-infusión (79 días).

Estudio 8. Terapia neurotrófica en la EA

Se cuantificó en un paciente con EA los niveles de NGF antes y después de recibir infusión de β -NGFm por vía ICV y se observó que este tratamiento modifica los valores séricos de NGF mostrando una tendencia a valores superiores de NGF después de la infusión (90 días) (Fig. 26A y B).

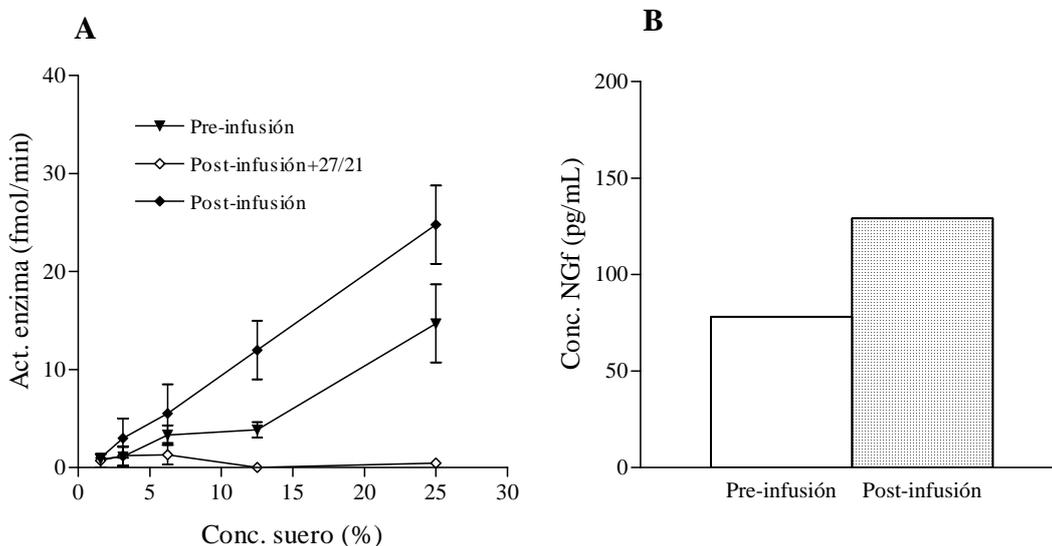


Figura 26. Cambios en los niveles de NGF en el suero de un paciente con enfermedad de Alzheimer que recibió infusión ICV de NGF. Las muestras de suero fueron tomadas pre y post-infusión (90 días). Se observa una tendencia a niveles más altos de NGF en la muestra post-infusión.

Estudio 9. Terapia neurotrófica en la lesión estriatal.

El estriado lesionado con ácido quinolínico no mostró cambios en el contenido estriatal de NGF al ser comparado con con el grupo control (no mostrado), sin embargo, en el grupo de ratas tratadas con NGF antes de la lesión se encontró un incremento estadísticamente significativo de un 81% ($p < 0.05$) en los valores de NGF en el estriado lesionado al ser comparado con el intacto (Fig. 27C). La Fig. 27A, B y C muestran la comparación de los niveles de NGF entre el estriado lesionado y el intacto de los grupos de ratas lesionadas con ácido quinolínico, lesionadas y después infundidas con NGF y infundidas durante la lesión con ácido quinolínico respectivamente. El grupo experimental que recibió dos días antes de la lesión una inyección de NGF mostró un desempeño conductual superior al de los otros grupos evaluados (Fig. 28), resultado que se evidenció por las latencias de escape menores en el laberinto acuático de Morris. Este resultado reafirma la importancia del tratamiento temprano con NGF con fines neuroprotectores.

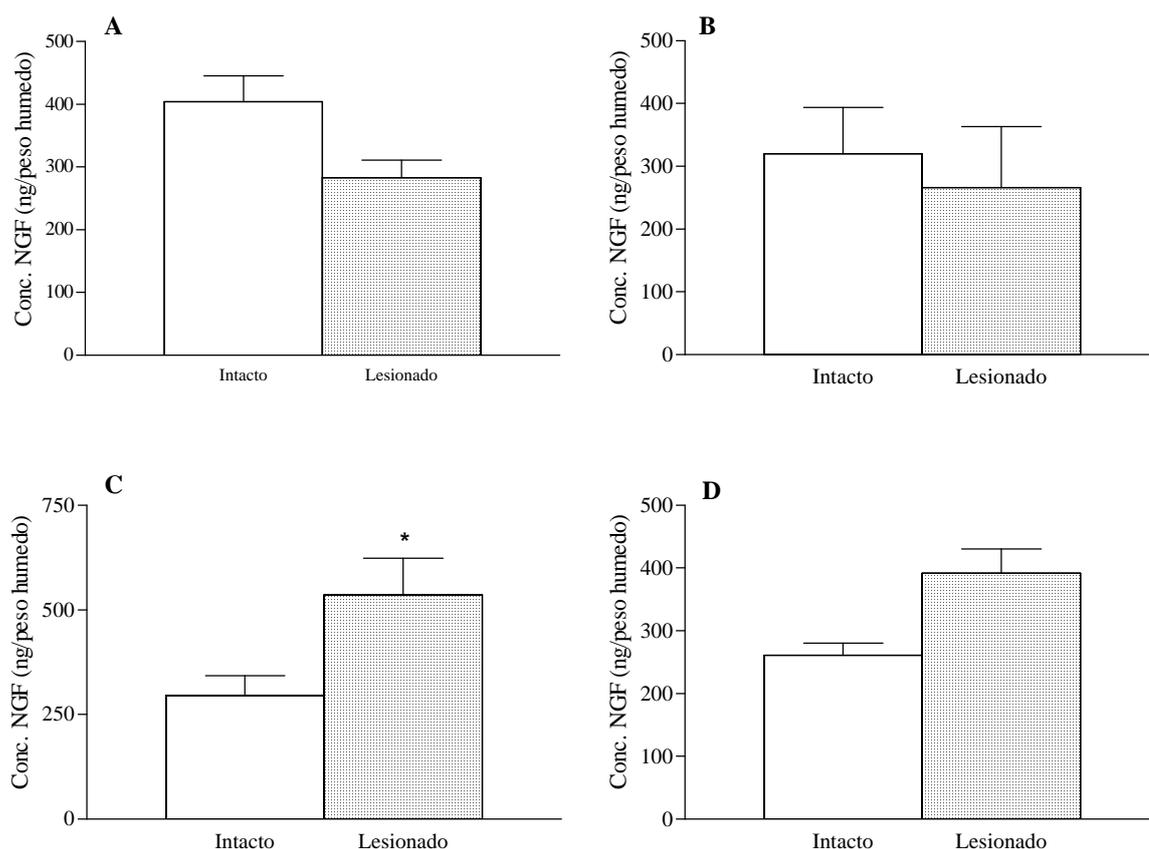


Figura 27. Comparación de los niveles de NGF entre el estriado lesionado y el intacto de ratas. A: ratas lesionadas con ácido quinolínico (AQ, $n = 8$). B: ratas lesionadas y tratadas con NGF después (AQ-NGF, $n = 10$). C: ratas tratadas con NGF antes de la lesión (NGF-AQ, $n = 9$). D: ratas tratadas con NGF durante la lesión (AQ+NGF, $n = 8$). Se muestra la media \pm el error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó por medio de la prueba t de Student. * $p < 0.05$.

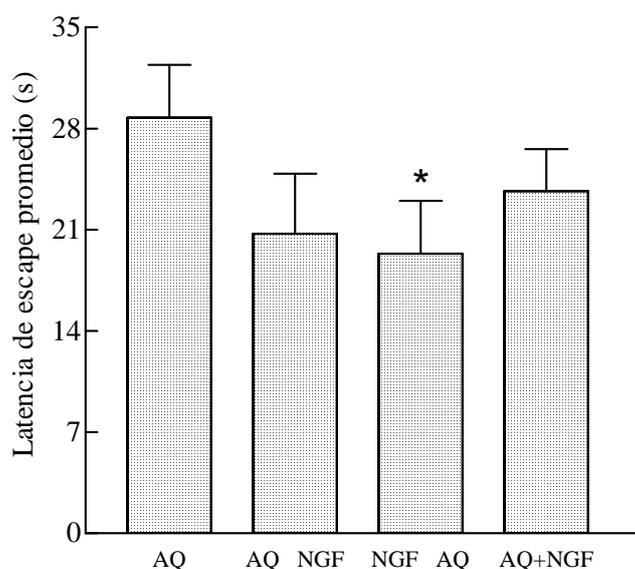


Figura 28 Latencias de escape promedio en el laberinto acuático de ratas lesionadas con ácido quinolínico (AQ, n=8), tratadas con factor de crecimiento nervioso después (AQ-NGF, n=10), antes (NGF-AQ, n=9) o durante (AQ+NGF, n=8) la lesión. Se muestra la media \pm el error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó por medio de las pruebas: ANOVA y prueba de Duncan, * $p < 0.05$.

Los resultados de la evaluación de los niveles de NGF en otras áreas cerebrales (hipocampo, corteza y septum) no mostraron cambios significativos al ser comparados con los del grupo control (datos no mostrados).

Estudio 10. Terapia neurotrófica en la lesión septohipocampal

El tratamiento neurotrófico en la lesión de la vía septohipocampal incrementa los niveles séricos de NGF (Fig. 29, $p < 0.05$).

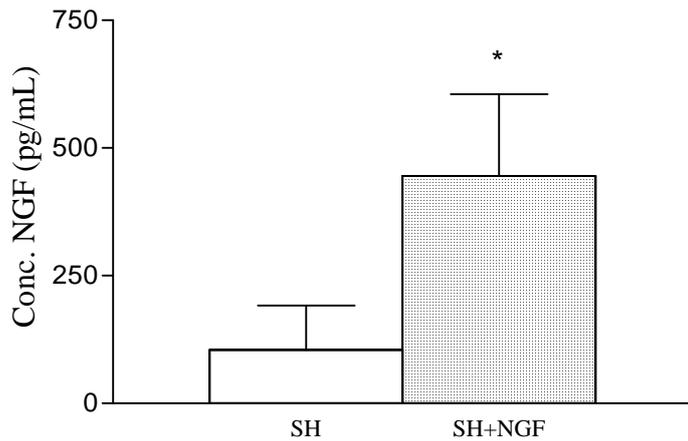


Figura 29. Comparación de los niveles séricos de NGF en ratas con lesión septohipocampal (SH, n=4) y ratas lesionadas que recibieron tratamiento con NGF (SH+NGF, n=4). Se muestra la media \pm el error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó por medio de la prueba *t* de Student, * $p < 0.05$.

Estudio 11. Terapia neurorestaurativa en el envejecimiento cerebral

Estudio conductual: El desempeño en el laberinto acuático de las ratas viejas con déficit cognitivo tratadas con NGF fue significativamente superior que el de las ratas similares no tratadas. Esta diferencia se apreció en una reducción en la latencia de escape promedio ($p < 0.01$, Fig. 30A) y en un aumento en el número de cruces análogos ($p < 0.01$, ANOVA y prueba de Duncan, Fig. 30B).

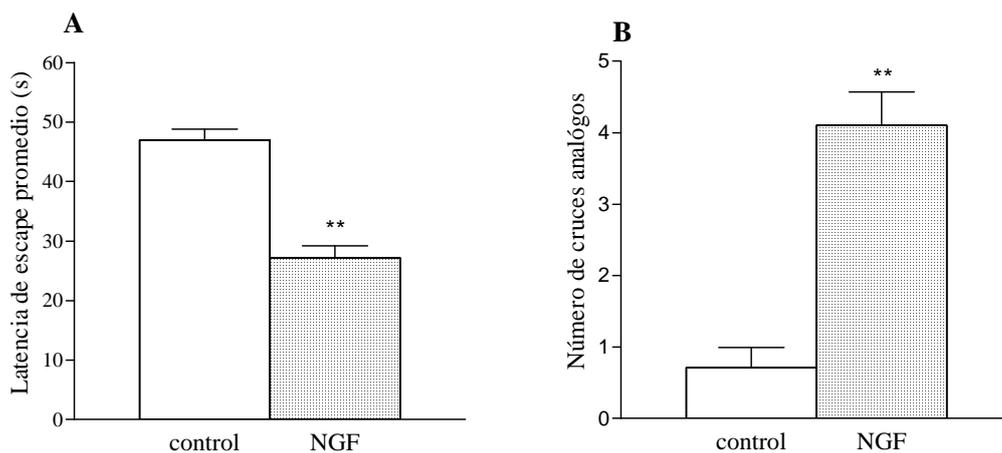


Figura 30. Desempeño conductual en el laberinto acuático de las ratas viejas con déficit cognitivo no tratadas (n=5) y tratadas con factor de crecimiento nervioso (NGF, n=9). Las variables medidas fueron la latencia de escape promedio (A) y el número de cruces análogos (B). Se muestra la media \pm el error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó por las pruebas: ANOVA y prueba de Duncan, ** ($p < 0.01$).

Niveles de NGF: El siguiente experimento fue realizado para determinar las concentraciones de NGF presentes en el suero de ratas con déficit cognitivo tratadas con diferentes técnicas neurorestaurativas tales como: trasplante de suspensión fetal de células septales e infusión ICV de NGF. La Figura 31 resume los cambios de los niveles de NGF en los diferentes grupos experimentales que recibieron tratamiento. Se evidenció que la combinación de las dos técnicas neurorestaurativas (trasplante e infusión de NGF, Fig. 31C) provoca un incremento en los niveles de NGF ($p < 0.01$).

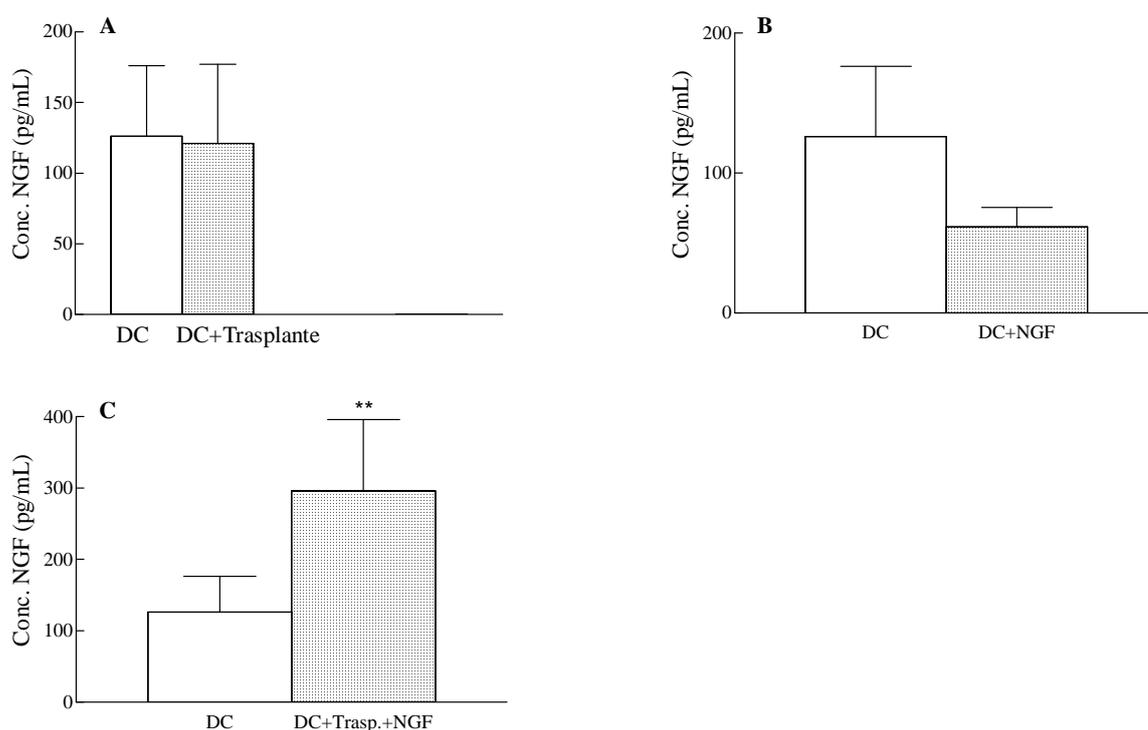


Figura 31 Comparación entre los niveles de NGF entre el suero de ratas viejas con déficit cognitivo (DC) y los grupos experimentales que recibieron tratamiento neurorestaurador: **A:** trasplante de células septales (DC+Trasplante), **B:** infusión intracerebroventricular de NGF (DC+NGF) y **C:** la combinación de ambas técnicas (DC+Trasp.+NGF). El análisis estadístico se realizó por la prueba *t* de Student (** $p < 0.01$) vs DC.

De igual forma, se evaluaron los niveles de NGF sérico en monos (uno joven y otro viejo con deterioro cognitivo) que recibieron tratamiento neurotrófico. En la Figura 32 se muestra el comportamiento temporal del NGF en estos monos. En el mono joven se evidencia inicialmente un incremento de los valores de NGF, a partir del tercer mes se comienza a apreciar una recuperación de los niveles de esta proteína alcanzándose valores similares a los reportados en el estudio pre-tratamiento. En el mono viejo, los niveles de NGF en suero antes

del tratamiento están muy disminuidos, resultado congruente con lo observado en el grupo experimental de monos viejos (n=25) (Fig. 22B). Hasta el tercer mes de evolución, los niveles se mantienen iguales llegando a ser indetectables. Se observa un aumento de NGF a partir del sexto mes hasta llegar a valores similares a los del mono joven cuando ha transcurrido un año de evolución del tratamiento.

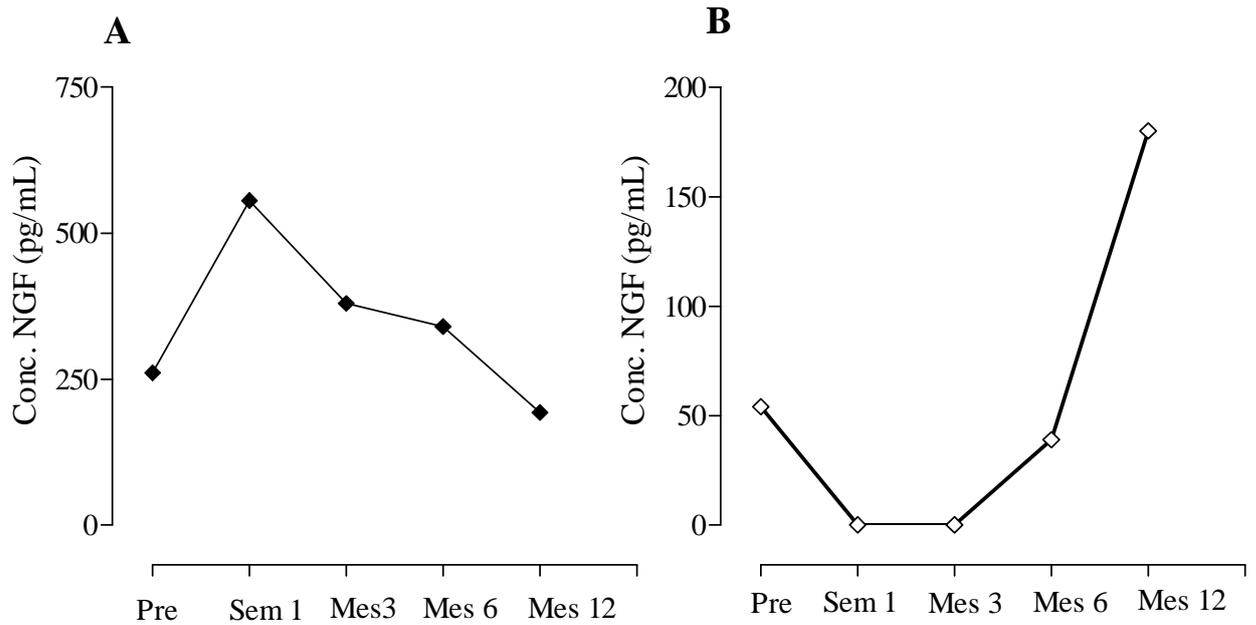


Figura 32. Comportamiento temporal de los niveles séricos de NGF en monos con infusión intracerebroventricular de NGF murino. **A:** Representa los niveles evolutivos de NGF en el suero del mono joven. **B:** Valores de NGF en el suero del mono viejo.

DISCUSIÓN

I. MÉTODO DE DETECCIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y CUANTIFICACIÓN DEL NGF

Detección de NGF en suero

Los estudios encaminados a la determinación de NGF en suero han sido muy contradictorios y muestran una amplia gama de resultados. Inicialmente las determinaciones mostraban valores muy altos cuando se utilizaban ensayos radioinmunoenzimáticos (Suda, Barde and Thoenen, 1978). Más tarde, Shinoda demostró por medio de un EIE de doble sitio, que los valores reportados estaban sobreestimados (Shinoda et al. 1988). En el mismo año, Heinrich y Meyer utilizando el mismo anticuerpo monoclonal que empleamos en esta tesis, validaron su utilidad para detectar NGF humano y encontraron que el NGF estaba presente en placenta y semen pero no se detectaba en suero de pacientes con enfermedad de Paget (Heinrich and Meyer, 1988). Contrario a esto, Faradji y Sotelo detectaron NGF en el suero de pacientes con neuropatía diabética por medio de un EIE de doble sitio (Faradji and Sotelo, 1990). Skaper y Varon estudiaron suero en tres tipos de ensayos biológicos y no detectaron actividad neurotrófica en las muestras, lo cual permitiría concluir que si existía NGF activo en el suero, sería a concentraciones por debajo de 0.1-0.2 UB/mL (límite de detección de los métodos utilizados). Contrariamente, Stephani halló por medio de un ensayo de actividad biológica en ganglio sensorial de embrión de pollo la presencia de actividad biológica en muestras de suero de rata, ratón y humano (Stephani, Sutter and Zimmermann, 1987). Más adelante, este mismo autor demostró NGF en suero de pacientes con EA (Stephani and Mauter, 1990).

En 1993, Naher-Noé, comparó la detección de NGF por EIE y ensayo de actividad biológica en muestras humanas (nervio ciático, músculo cardíaco, hipocampo, líquido cefalorraquídeo y suero) y planteó que existe NGF en estas muestras pero que no era posible detectar NGF en LCR (Näher-Noé et al. 1993).

En este trabajo se estudió la capacidad del anticuerpo monoclonal anti- β -NGF 27/21 para detectar NGF en muestras de suero humano y de monos por medio de un EIE. Para la utilización de este EIE se tuvo en cuenta la demostración previa de la eficiente detección de NGF recombinante humano por el anti- β -NGFm 27/21 (Bruce and Heinrich, 1989; Söderström et al. 1990). Una vez demostrada la capacidad del EIE utilizado en este trabajo para detectar NGF tanto en humanos como en monos, contamos con la herramienta necesaria para evaluar los cambios en las concentraciones de NGF en diferentes entidades neurológicas, modelos experimentales de neurodegeneración y tratamientos neurorestaurativos.

Nuestros resultados demuestran que el EIE descrito detecta NGF sérico en humanos y monos con una sensibilidad similar a la obtenida para el NGF murino (2-5 pg/mL) y que los valores medios normales de NGF sérico en humanos son 219 pg/mL y en monos son 135.8 pg/mL. En el estudio se demostró además que no existen diferencias en los niveles de NGF en el suero entre diferentes géneros y especies de monos.

Otras muestras evaluadas por el EIE

En contraste con el resultado del suero humano, no fue detectable NGF inmunorreactivo en las diferentes diluciones del suero fetal de carnero lo que nos hace pensar en dos posibilidades: una es que no exista NGF en este fluido y la otra, que los niveles de NGF en esta especie estén por debajo del límite de detección del EIE utilizado. Este resultado confirma los planteamientos de Nörrgren al señalar la incapacidad de mostrar actividad biológica para el NGF en muestras de suero fetal de carnero (Nörrgren et al. 1980).

Dada la similitud entre los diferentes miembros de la familia de las NTs y a pesar de que existen datos que muestran que otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico, fibroblástico e insulínico no muestran reactividad cruzada con el anticuerpo anti- β -NGFm 27/21 (Donohue, Head and Stitzel, 1989; Korsching and Thoenen, 1983), resultó de interés evaluar si otras NTs como el BDNF y la NT-3 tienen reacción cruzada con el anti- β -NGFm 27/21. Nuestros resultados, coincidentes con los de Söderström (Söderström et al. 1990), evidenciaron que bajo las condiciones descritas en el EIE, el anti- β -NGFm 27/21 no reconoce a las dos NTs evaluadas por lo que es específico para el NGF a pesar de la alta homología secuencial que existe entre estas NTs.

Estudio de recobrado del β -NGFm en muestras de suero humano

Los resultados contradictorios sobre la cuantificación sérica de NGF podrían estar relacionados con la interacción del NGF y proteínas séricas. Ronne y colaboradores demostraron que el NGF sanguíneo se une a la α 2-macroglobulina y que de esta forma el NGF es transportado en el suero; esta unión protege al NGF de ser degradado y permite liberar al NGF en su forma activa a las neuronas o a los linfocitos (Koo and Stach, 1989; Ronne et al. 1979). Como el NGF tiene mayor afinidad por su receptor que por la α 2-macroglobulina, el NGF unido a esta proteína puede ser transferido de la alfa 2-macroglobulina y captado por su receptor específico (Koo and Stach, 1989; Murase et al. 1992). Las implicaciones de estos estudios en la capacidad de cuantificación de NGF en el suero no están totalmente dilucidadas; no obstante, los resultados del experimento de recobrado realizado en nuestro trabajo muestran con claridad que no son altos los niveles relativos de NGF detectables en el suero humano.

La adición de una concentración conocida de NGF (1 ng/mL) al suero humano (50%) mostró un recobrado superior al 80%. Este estudio demostró un recobrado constante del NGF adicionado a cada una de las diferentes diluciones del suero humano. También se demostró que el bloqueo de la inmunorreactividad mediante la adición de anti-NGF fue efectiva para la muestra que tenía NGF adicionado. Estos resultados nos permiten afirmar que a pesar de que el NGF en el suero pueda estar unido a otra proteína o molécula transportadora, esto no interfiere, al menos bajo las condiciones descritas en este EIE, con la determinación de NGF en el suero.

Ensayo de actividad neurotrófica del NGF en el suero humano normal

Diversos informes refieren la presencia de factores en el suero que inhiben el crecimiento de fibras nerviosas en cultivo (Ebendal, 1989; Touzeau and Kato, 1983). Ebendal demostró que el ensayo de actividad biológica que utiliza explantes de ganglio simpático de embriones de pollo (límite de detección de 0.1-0.2 ng/mL) es negativamente influido por suero humano presente a concentraciones del 10-20% en el medio de cultivo (Ebendal, 1989).

Partiendo de estos resultados, consideramos importante evaluar si el NGF presente en el suero es activo biológicamente; para lo cual, se concentró el suero humano por diálisis a presión con el propósito de eliminar las sustancias de bajo peso molecular y se evaluó en un ensayo de actividad biológica esta muestra con y sin adición de NGF (1 ng/mL). Este experimento comprobó que el suero humano tiene factores inhibidores del crecimiento de fibras nerviosas y que la acción de estos factores disminuye al eliminarse sustancias de bajo peso molecular presentes en el suero.

Todos estos resultados nos permiten afirmar que el anticuerpo monoclonal anti-NGFm utilizado en el EIE descrito es capaz de detectar NGF sérico humano y de monos y no reconoce otras neurotrofinas. Por otra parte, se evidencia la presencia en el suero humano de sustancias de bajo peso molecular que inhiben la actividad biológica del NGF. Las características biológicas y físico-químicas de estas sustancias son hasta el momento desconocidas, así como, el papel fisiológico de las mismas en las enfermedades neurodegenerativas.

En la actualidad, no está dilucidado el papel fisiológico del NGF en el suero. Entre las funciones posibles se describe la eliminación de esta proteína a la sangre con lo que se logra disminuir los niveles de NGF en el cuerpo neuronal y de esta forma regular los niveles disponibles para lograr efectos tróficos (Murase et al. 1992). Otra alternativa para explicar el origen del NGF sérico sería su síntesis por neuronas simpáticas que inervan a los vasos sanguíneos y que son una de las principales fuentes de NGF (Shelton and Reichardt, 1984). Ya

en 1998, Hellweg resumió las posibles fuentes celulares, centrales y periféricas de NGF en el suero; entre ellas están: células supraópticas, ventrolaterales y paraventriculares del hipotálamo, células secretorias y lactotrópicas adenohipofisarias, la neurohipófisis, las glándula tiroidea y las paratiroides y finalmente, células del sistema inmune como linfocitos B, T auxiliares y mastocitos (Hellweg et al. 1998a; Missale et al. 1996; Torcia et al. 1996). Considerando que al menos en condiciones experimentales y patológicas, se ha demostrado el paso del NGF a través de la barrera hematoencefálica (Kastin et al. 1999; Pan, Banks and Kastin, 1998; Poduslo and Curran, 1996; Poduslo, Curran and Berg, 1994; Torres-Aleman, 2001), es posible que el NGF presente en el suero pueda influir sobre las neuronas del SNC de igual forma que sobre las del SNP. Por ejemplo, los mastocitos, producen y reciben NGF (Levi-Montalcini et al. 1996; Tam et al. 1997) y son capaces de alterar la integridad de la barrera hematoencefálica y por lo tanto pueden variar la concentración de NGF en el SNC (Hellweg et al. 1998a; Micera, Vigneti and Aloe, 1998). Otro ejemplo se refiere a las catecolaminas, ellas incrementan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en condiciones de estrés; por lo que el NGF podría modular en forma bidireccional los procesos relacionados con el estrés y el sistema neuroinmune (Dobrowsky and Carter, 2000; Levi-Montalcini et al. 1996; Sacerdote et al. 1996).

II. CONTENIDO DE NGF EN PROCESOS NEURODEGENERATIVOS CLINICOS Y EXPERIMENTALES

A pesar de los numerosos estudios de cuantificación de NGF en diversas enfermedades, hasta el momento, se desconocen los niveles de NGF en el suero de pacientes con enfermedades neurológicas diferentes a la EA. Básicamente, los estudios en esta temática han estado dirigidos a la evaluación de los niveles de NGF en tejido de pacientes y modelos experimentales de EA y de algunas enfermedades en las que se plantea como posible etiopatogenia la participación de mecanismos neuroinmunológicos.

Por su parte, existen estudios que muestran que el contenido de NGF está alterado en enfermedades en cuya etiopatogenia participan mecanismos inmunológicos: enfermedades autoinmunes (Arredondo et al. 2001; Bracci-Laudiero et al. 1993; Flugel et al. 2001), episodios inflamatorios en enfermedades neuropsiquiátricas, entre ellas la enfermedad de Behcet y la encefalomiелitis diseminada (Bracci-Laudiero et al. 1992; Jockers-Scherubl et al. 1996) y la esclerosis múltiple (Massaro and Tonali, 1998). En esta última, se muestran valores aumentados de NGF en el líquido cefalorraquídeo de pacientes en brote, no así, en los que estaban en remisión (Dowling et al. 1999; Laudiero et al. 1992).

Enfermedad de Alzheimer

En el caso de la EA, existen múltiples y disímiles hallazgos en relación con los niveles de NGF. Nuestros resultados se corresponden con los valores de NGF sérico detectados en sujetos normales y son similares al reporte de Murase (Murase et al. 1993) que no encontró diferencias entre la concentración de NGF en pacientes con EA y el grupo control. No obstante, otros autores reportan niveles aumentados o reducidos de NGF en la EA en diferentes áreas cerebrales y líquido cefalorraquídeo (Crutcher et al. 1993; Fahnestock et al. 2001; Fahnestock et al. 1996; Hamill, Lindner and Loy, 1993; Hock et al. 2000b).

Altas concentraciones corticales de NGF fueron encontradas en tejido nervioso postmortem de pacientes con EA (Hellweg et al. 1998b) y en un modelo experimental de EA en ratas (Gonzalez-Hoyuela et al. 1998). Es interesante notar que la reducción cortical de NGF se observó en pacientes no dementes que tenían placas seniles corticales, considerados preclínicamente como EA. Sin embargo, no fue encontrada disminución de NGF en la corteza de pacientes no dementes que no tenían placas seniles; de ahí, que los autores sugieran una deficiencia de NGF en estados preclínicos de la EA (Hellweg et al. 1998a). La razón de la reducción del NGF en estadios iniciales de la neurodegeneración en la EA y el incremento en los siguientes estadios es totalmente desconocida, pero sustenta la hipótesis de que el contenido de NGF está disminuido al inicio de la enfermedad y que a medida que la degeneración aumenta se produce un incremento de la concentración de NGF (Hellweg et al. 1998b). El hallazgo de los cambios temporales en la concentración de NGF en la EA, podría explicar los disímiles resultados reportados por los grupos que investigan sobre los niveles de NGF en la EA. En nuestro caso, los pacientes con EA estudiados tenían un diagnóstico de EA probable (según los criterios de la NINCDS/ADRDA) en los que ya es apreciable el déficit cognitivo y un mayor deterioro de otras funciones, todo lo cual sugiere que los valores séricos de NGF observados en nuestro grupo coinciden con los reportes de Hellweg y colaboradores para el grupo de pacientes con EA en estadios avanzados (Hellweg, 1998).

De igual forma, en esta tesis se evaluaron los niveles de NGF en modelos experimentales de EA: lesión septohipocampal y envejecimiento cerebral. En ambos modelos existe una reducción de los niveles séricos de NGF, reducción que en el caso de las ratas viejas con déficit cognitivo resultó estadísticamente significativa; no así, para la lesión septohipocampal. Los estudios en los animales con lesión septohipocampal se realizaron a las 2 semanas de la lesión, tiempo en el cual Hellweg reportó, en un modelo similar, concentraciones de NGF reducidas en las proyecciones colinérgicas de las áreas blanco; así como, valores normales a las 4 semanas

de producida la lesión (Hellweg et al. 1998b). Estos cambios podrían deberse a diversos mecanismos entre ellos: pérdida de neuronas productoras y disminución en la actividad neuronal en la etapas iniciales, seguida de gliosis que ocurre en estas enfermedades neurodegenerativas y procesos inflamatorios. Las células de la glía son productoras de factores tróficos, lo que puede explicar el aumento de NGF en fases más avanzadas.

Enfermedad de Parkinson

Dada la relación entre el NGF y el sistema colinérgico existe una asociación evidente entre esta proteína y la EA, no así, entre el NGF y la EP, donde se conoce que el NGF no tiene efecto sobre las neuronas dopaminérgicas (Collier and Sortwell, 1999). Está demostrado que el NGF no actúa sobre las neuronas inmunoreactivas a la TH y que a diferencia de otras NTs el NGF no tiene efecto protector sobre este tipo neuronal (Hagg, 1998).

Sin embargo, informes recientes indican que existe inmunorreactividad al NGF y al receptor TrkA en la sustancia negra parte compacta lo que sugiere una regulación autocrina/paracrina de este factor (Nishio et al. 1998). Por otra parte, las concentraciones de NGF en el estriado de ratas lesionadas con MPTP están disminuidas, aspecto que Mogi interpretó como indicador, conjuntamente con la elevación de la IL-1, de una relación entre el NGF y la muerte neuronal en este modelo de lesión nigral (Mogi et al. 1998). A estos hallazgos se le adiciona la demostración del valor preventivo del NGF sobre la muerte neuronal causada por el MPTP al suprimir la actividad de la caspasa-3, proteasa que participa en la fase de ejecución de la apoptosis (Shimoke and Chiba, 2001).

En el presente trabajo encontramos una disminución del contenido sérico de NGF en pacientes con EP en estadios tempranos de la enfermedad (I-II), lo que evidencia una disponibilidad reducida del NGF en tejidos centrales o periféricos y habla a favor de una relación entre el NGF y los cambios neurodegenerativos observados en estas dos enfermedades.

A pesar de la extensa literatura dedicada al estudio de distribución del NGF en el SNC y fluidos corporales, no existen reportes previos de la determinación de NGF en suero de pacientes con EP.

Los niveles séricos de NGF fueron evaluados en dos grupos de pacientes con EP, uno con síntomas avanzados de la enfermedad (G-III-IV, según la escala de Hoehn y Yahr), marcadas discinecias y fluctuaciones diurnas relacionadas con la denervación y el tratamiento crónico con L-dopa y otro grupo en estadios tempranos de la enfermedad (GI-II, según la escala de Hoehn y Yahr). Nuestros resultados hablan a favor de que existen menores valores de NGF endógeno en los estadios tempranos (tiempo de evolución de la enfermedad de 2.66 años) que

en estadios más avanzados (tiempo de evolución de la enfermedad de 9.06 años). Estos hallazgos sugieren que a medida que se acrecienta el deterioro degenerativo actúan mecanismos homeostáticos que normalizan los valores de NGF en estos pacientes y que es independiente de algún posible mecanismo relacionado con el tratamiento antiparkinsoniano con L-dopa.

Por otra parte, la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la EP causa un desequilibrio en el circuito de los núcleos de la base que resulta en una disminución de la vía excitatoria talámica a la corteza motora. Conociendo que la corteza es uno de los principales sitios de síntesis de NGF (Korsching and Thoenen, 1987) y considerando al cerebro como una fuente posible de NGF en el suero (Hellweg et al. 1998b; Pan, Banks and Kastin, 1998); la disminución de la actividad de la corteza motora en la EP, podría contribuir a la disminución de los niveles de NGF observados en los estadios tempranos (I-II) de la enfermedad. En estadios más avanzados (III-IV) la estimulación de la síntesis en otras áreas corticales como parte de un mecanismo homeostático podría ser responsable de los niveles normales observados en los estadios avanzados de la enfermedad.

Un aspecto a tener en cuenta es que la síntesis neuronal del NGF es dependiente de su actividad. El glutamato y la acetilcolina inducen la síntesis de NGF en las neuronas productoras; por su parte el GABA y la noradrenalina, la inhiben (Blochl and Thoenen, 1995). Existen evidencias de que la L-dopa aumenta la síntesis y secreción de NGF (Mena et al. 1998), sin embargo, nosotros no encontramos diferencias entre el grupo de pacientes con y sin tratamiento con L-dopa, aunque es importante señalar que se aprecia una tendencia a valores superiores de NGF en el grupo de pacientes con L-dopa en relación con el que no recibía este tratamiento.

Un estudio reciente indicó que la IL-1 y IL-6 son potentes estimuladores de la síntesis de NGF tanto en SNC como SNP (Hellweg et al. 1998b) y que los niveles de estas citoquinas están aumentados tanto en caudado y putamen como en LCR de pacientes con EP (Nagatsu et al. 2000a; Nagatsu et al. 2000b). A este resultado se unen hallazgos de nuestro laboratorio que muestran trastornos inmunológicos a nivel periférico y central en la EP, en específico, alteraciones en marcadores linfocitarios en sangre periférica y LCR de pacientes con EP (datos no mostrados). Todos estos datos sugieren dos posibles interpretaciones: la disminución en el contenido de NGF en la EP es consecuencia del deterioro degenerativo o tiene un origen secundario a un proceso inmunológico. A pesar de que los mecanismos de regulación de la

síntesis de NGF y el papel del NGF en la fisiopatología de la EP no están claros, los resultados expuestos sugieren que el daño temprano de neuronas dopaminérgicas afecta la síntesis de NGF.

Enfermedad de Huntington

En el caso de la EH, el hallazgo de valores disminuidos en esta enfermedad es un resultado difícil de explicar a la luz de los conocimientos actuales. Se conoce que el NGF protege a las neuronas contra el daño excitotóxico y que aunque los mayores niveles cerebrales de NGF se encuentran en el hipocampo y la corteza, se ha demostrado que las células estriatales expresan esta proteína (Canals et al. 1998; Gouhier et al. 2000). Diferentes formas de agresión al cerebro, incluida la excitotóxica, son capaces de inducir la síntesis de NGF (Canals et al. 1998). La mayor parte de estos estudios se han realizado a corto plazo, se desconoce si la síntesis incrementada de NGF persiste pasadas varias semanas de la lesión. Nuestros resultados muestran que seis semanas después de la inyección con ácido quinolínico el contenido de NGF en el estriado lesionado es similar al del contralateral y que el NGF sérico se encuentra disminuido. Esto es indicativo de que esta respuesta protectora al daño neurotóxico tiene un carácter transiente.

En resumen, en la EP y la EH existen bajos niveles de NGF, no así en los casos con EA (estadios avanzados de la enfermedad) estudiados. Específicamente, el daño dopaminérgico afecta los niveles séricos de NGF en etapas iniciales de la enfermedad, en estadios avanzados de la misma, el contenido de NGF se restablece sin que este hecho tenga relación con el tratamiento antiparkinsoniano.

Variaciones de los niveles séricos de NGF con la edad

Los estudios sobre la relación entre la edad y los niveles de NGF no han arrojado resultados homogéneos. Para algunos grupos la concentración de NGF varía a medida que aumenta la edad y para otros grupos los niveles de NGF y sus receptores permanecen constantes (Bracci-Laudiero et al. 1992; Nishizuka et al. 1991; Salehi et al. 2000), de ahí, que nos propusiéramos determinar si en las especies animales estudiadas en este trabajo existen diferencias en el contenido de NGF con el envejecimiento.

Si bien en ratas y monos fue posible detectar cambios en los niveles de NGF asociados al proceso de envejecimiento natural, en humanos no se observó afectación en las concentraciones de NGF entre los sujetos de diferentes grupos étnicos a pesar de que es posible distinguir una tendencia a la disminución en el contenido de NGF a medida que aumenta la edad.

La disminución en los niveles de NGF con la edad podría estar relacionada con la inhibición de los procesos de biosíntesis durante el envejecimiento, con la acumulación de lesiones oxidativas en el ADN y la disminución de la expresión central del NGF y sus receptores a medida que aumenta la edad (Harman, 1996; Laudiero et al. 1992; Murase et al. 1992).

III. EFECTOS DEL TRATAMIENTO NEURORRESTAURADOR SOBRE EL CONTENIDO DE NGF

Un acercamiento para optimizar la recuperación del SNC dañado es la liberación de NGF en la región afectada conjuntamente con un sustrato celular que apoye y promueva el crecimiento neuronal (Brundin et al. 2000; Espejo et al. 2000; Mahoney and Saltzman, 1999); es decir, la combinación de una técnica neurotrófica (infusión ICV de NGF) con una técnica neurorrestaurativa (injerto fetal) ha sido utilizada como una vía para lograr la restauración neuronal.

Las estrategias actuales para el suministro de NTs incluyen la implantación de cápsulas poliméricas y/o células modificadas genéticamente para lograr una liberación prolongada y anatómicamente específica de la proteína, que permita la aplicación clínica de estas sustancias. No obstante, los métodos empleados en el presente estudio para el tratamiento experimental con NGF han sido igualmente eficaces para revertir el deterioro cognitivo con pocos efectos colaterales y las ventajas adicionales de su simplicidad y bajo costo.

La administración de las NTs por vía intraestriatal resulta superior a la vía intraventricular, específicamente en sus efectos sobre las neuronas de esta área, por su mayor especificidad y la ausencia de efectos colaterales indeseados (Venero, Hefti and Knusel, 1996).

Hasta donde conocemos, no existen estudios publicados acerca de la distribución del NGF infundido desde esponjas biodegradables, que fue la vía de administración escogida para las ratas con lesión septohipocampal en el presente trabajo. Sin embargo, la recuperación morfofuncional que ejercen las NTs suministradas de esta última forma (Houle and Ye, 1999) sugiere posibilidades semejantes de biodisponibilidad entre este y otros métodos. La implantación de una esponja biodegradable ofrece la ventaja de reducir el trauma que representa la implantación de una cánula en el cráneo de una rata ya lesionada.

Por su parte, cuando el NGF es aplicado en el ventrículo, difunde 1-2 mm desde el líquido cefalorraquídeo hacia el parénquima cerebral periventricular. De este modo la NT alcanza el estriado, así como los axones de las neuronas del cerebro basal anterior que se agrupan en el haz de la fimbria fórnix por medio de los que es retrógradamente transportado. La NT también

circula por fuera del sistema ventricular y desde el espacio subaracnoideo penetra en los tejidos corticales, incluyendo al hipocampo (Anderson et al. 1995). Por lo tanto, la infusión ICV permite el acceso de la proteína tanto a las terminales axónicas como a las regiones somatodendríticas del septo, el hipocampo, el estriado y la corteza frontal.

Hefti y colaboradores encontraron que dos semanas después de la infusión de NGF en un modelo de lesión septohipocampal no había pérdida significativa de neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior, mientras que en las ratas lesionadas sin tratamiento con NGF se observó entre un 65-90% de pérdida neuronal. Este estudio evidenció que la muerte traumática neuronal puede ser prevenida por la administración de NGF en el cerebro (Hefti and Weiner, 1986). Otros experimentos demostraron este efecto protector del NGF en la atrofia del núcleo basal de Meynert después de una lesión neocortical (Casamenti et al. 1989; Mandel, Gage and Thal, 1989).

A los estudios descritos anteriormente siguieron otros en ratas viejas con déficit cognitivo que demostraron las posibilidades terapéuticas del NGF. Estos animales, que tenían deterioro de la memoria espacial y atrofia de las neuronas colinérgicas, al recibir tratamiento ICV con NGF mostraron una mejoría en la memoria espacial y disminución de la atrofia cerebral. Estos resultados en conjunto permitieron afirmar que el NGF previene la degeneración colinérgica inducida por trauma al igual que la atrofia inducida por la edad y que el NGF mejora la función cognitiva (Barrow, Mitchell and Paiva, 2000; Fischer et al. 1987).

En su conjunto, los efectos del tratamiento neurorestaurador en las diferentes entidades clínicas estudiadas en esta tesis (EA, EP, EH) y los modelos experimentales de las mismas, muestran un incremento del contenido de NGF después del tratamiento.

Los estudios clínicos de tratamiento trófico para evaluar los efectos de esta técnica neurorestaurativa en el contenido de NGF se realizaron en dos pacientes, uno con EA y otro con EP, en este último caso la infusión de NGF se realizó como apoyo del trasplante de células cromafines y en un grupo de pacientes con EP que recibió trasplante de células mesencefálicas fetales. Tanto el tratamiento en la EA como en la EP produjo un aumento de los niveles séricos de NGF que pudieran estar relacionados con la liberación al suero de NGF, lo cual permite disminuir el exceso de esta proteína en el cuerpo neuronal (Hellweg et al. 1998b; Murase et al. 1992). También es posible el paso a través de la barrera hematoencefálica del NGF que puede ocurrir en cantidades limitadas en determinadas circunstancias (Kastin et al. 1999; Pan, Banks and Kastin, 1998; Poduslo and Curran, 1996). Esta última posibilidad cobra especial fuerza con nuestros resultados si tenemos en cuenta que los pacientes con EP trasplantados evidenciaron

un incremento en la permeabilidad de la barrera dado por el índice albúmina LCR / albúmina suero.

De igual forma se evaluaron los niveles de NGF antes y después del tratamiento ICV de NGF en un mono viejo y uno joven. El mono viejo que recibió el tratamiento intracerebral de NGF no mostró valores detectables de esta proteína en los primeros periodos post-infusión, mientras que al año se evidenció una producción de NGF que permitió detectar niveles cercanos a los valores observados en el sujeto joven. Contrario a estos resultados, en el mono joven se apreció un aumento en los primeros estudios post-infusión y valores similares a los del estudio pre-infusión al año del tratamiento.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el mono joven, el incremento en los niveles séricos de NGF observados en las primeras determinaciones postratamiento se pudiera atribuir a la liberación a la sangre de un exceso de NGF no necesario a nivel central. Por otra parte, conociendo que es posible en determinadas condiciones y en cantidades limitadas el paso a través de la barrera hematoencefálica del NGF, esta podría ser una fuente del NGF detectado en el suero de este mono.

Los resultados observados en el mono viejo son totalmente diferentes. En los primeros estudios postratamiento no son apreciables niveles de NGF y es a partir de los seis meses que se detecta una tendencia a aumentar los valores de NGF en relación con el estudio pretratamiento. Estos hallazgos hablan a favor de una síntesis endógena de este factor como consecuencia del tratamiento trófico. En este mono (viejo) existía un déficit de NGF en el momento de iniciado el tratamiento, sin embargo, la administración exógena de NGF no implicó un aumento notable de los valores de esta proteína a nivel periférico en los primeros meses después de la infusión, resultado totalmente opuesto al observado en el mono joven. Esto podría explicarse por la baja disponibilidad de NGF a nivel central encontrada antes del inicio del tratamiento, de ahí, que el NGF exógeno es ávidamente captado por los receptores específicos. Otra posible interpretación de estos resultados podría ser que la causa de los bajos valores de NGF en los primeros meses después del tratamiento se deba a que exista un déficit en el mono viejo en los mecanismos homeostáticos del NGF cerebral a diferencia del óptimo mecanismo existente en el mono joven. Pasados los primeros meses del tratamiento, se puede inferir que se provocó un aumento en la síntesis endógena de NGF que es totalmente apreciable por los valores de NGF detectados en el suero de este mono.

Desde el punto de vista conductual se observó una recuperación del deterioro cognitivo en el mono viejo dado por una mejoría en la ejecución, eficacia y consolidación de la memoria, estos animales fueron evaluados por una prueba de discriminación visuo-espacial compleja (datos no mostrados)

Los niveles de NGF medidos en nuestros grupos experimentales de lesión septohipocampal y ratas viejas con déficit cognitivo que recibieron tratamiento ICV de NGF mostraron un incremento que resultó estadísticamente significativo en el caso de las ratas viejas con déficit cognitivo; mientras que para el grupo experimental de ratas con lesión septohipocampal, solo fue significativo cuando se combinan las dos técnicas neurorestaurativas: el trasplante y la infusión de NGF.

Se ha mostrado que la combinación de ambas técnicas restaurativas produce un efecto superior en la mejoría del déficit cognitivo encontrado en ratas viejas (Fernández, Bergado and de la Cuétara, 1994). Existen diferentes vías para explicar esta mejoría del trasplante apoyado por la terapia trófica: una es que se logra un incremento de la supervivencia de las células septales injertadas, otra se basa en que el apoyo trófico facilita la transformación de las células injertadas a un fenotipo neuronal y por último se logra un mejor recobrado funcional a largo plazo.

El presente trabajo demostró que la lesión estriatal no provoca cambios a largo plazo en el contenido de NGF estriatal pero el tratamiento neurotrófico con NGF previo a la lesión induce un aumento de esta proteína en el estriado lesionado. El hallazgo del aumento del NGF inducido por la propia neurotrofina en los estriados lesionados es un resultado de difícil explicación a la luz de los conocimientos actuales. Sin embargo, pudiera estar relacionado con cambios producidos en los circuitos intraestriatales, como la estimulación persistente de subpoblaciones celulares productoras de NGF o productoras de neurotransmisores como la acetilcolina que estimulan la síntesis del NGF (Blöchl and Thoenen, 1995). Por otra parte, el NGF puede estimular la actividad de factores de transcripción como AP-1 con conocidas influencias sobre la expresión del NGF (Tong et al. 1998). Esta inducción sostenida de la producción del NGF puede ser uno de los mecanismos que subyace en sus efectos restauradores del aprendizaje y la memoria espacial observado en las ratas lesionadas con AQ.

Finalmente, estos hallazgos nos permiten concluir que la afectación observada en el contenido de NGF en las lesiones inductoras de eventos neurodegenerativos es contrarrestada por la

intervención neurorestauradora, especialmente, en el caso en que estas técnicas se utilicen de manera combinada.

IV. CONSIDERACIONES SOBRE LOS NIVELES ENDÓGENOS DE NGF

Las NTs son producidas *in vivo* en pequeñas cantidades; de ahí, que las células sensibles al NGF tienen que competir por el limitado NGF disponible incluso en condiciones fisiológicas. Se conoce que solo el 10% de los receptores para NGF están unidos a su ligando endógeno. Consecuentemente, cambios en el tiempo de las concentraciones de NGF pueden influir en la función neuronal. Por lo tanto, un posible mecanismo de enfermedad sería que una deficiencia de NGF provoque un mal funcionamiento de las neuronas sensibles a este factor. Los cambios en las concentraciones de NGF en el curso de varias enfermedades como la EA (Hellweg, 1998) y la EP indican que las fluctuaciones de las concentraciones endógenas de NGF siguen un patrón distintivo. Al inicio del proceso patológico se produce una disminución temporal, seguida de un incremento en fases más tardías. Estos cambios encontrados en los niveles de NGF podrían deberse a modificaciones en: la transcripción, la traducción, las vías de regulación de la expresión, la liberación, la captación por sus dianas y/o los mecanismos de eliminación o recambio.

Nuestros resultados, especialmente los obtenidos en pacientes con EP y en los modelos experimentales empleados, unido a las hipótesis planteadas en la literatura, nos permiten proponer el modelo que se presenta en la figura 33.

Proponemos que, al inicio de la enfermedad, la disponibilidad de NGF para las neuronas sensibles a este factor está reducida. Esta depleción inicia una cascada de eventos patológicos, los cuales afectan primariamente parámetros funcionales de neurotransmisión pero en consecuencia conducen a la atrofia y finalmente a la apoptosis. En estadios avanzados de la enfermedad, ya sea producto de la gliosis o de otros mecanismos desconocidos hasta el momento, se incrementan los niveles de NGF. En este modelo postulamos que después del daño cerebral inicial, la síntesis de NGF es estimulada como un mecanismo intrínseco luego de que se produce una exposición por largo tiempo al daño cerebral; sin embargo, este incremento compensatorio de NGF podría ser negativo para las células, ya que se ha descrito que el NGF puede inducir la muerte neuronal utilizando la vía del receptor p75 (Friedman, 2000) el cuál está sobrerregulado en condiciones de daño (Roux, 1999). Por otro lado, es importante tener en cuenta que al menos para la EA la elevación de los niveles de NGF podría ser dañina ya que el NGF potencia la neurotoxicidad del beta-amiloide (Yankner, Caceres and Duffy, 1990) y

estimula la expresión del gen de la proteína precursora del beta-amiloide; así como, su secreción (Lahiri and Nall, 1995; Luo et al. 2001).

Este modelo se basa fundamentalmente en nuestros resultados obtenidos para la EP; en el caso de la EA, Hellweg y colaboradores plantean similares resultados (Hellweg, 1998). Quedaría por demostrar la validez de este modelo en la EH.

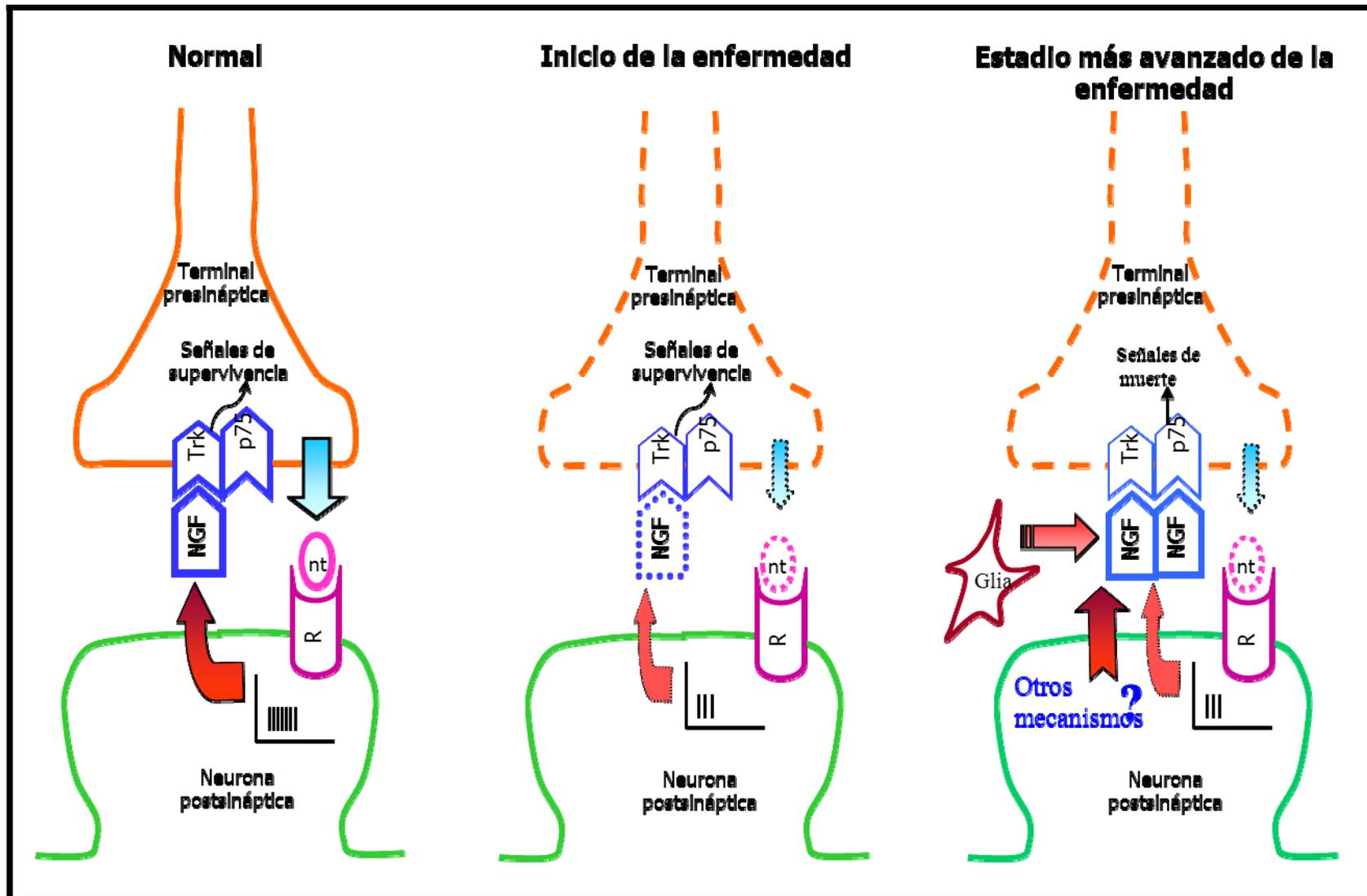


Figura 33. Modelo sobre las modificaciones en el contenido de NGF en procesos neurodegenerativos.

nt: neurotransmisor

R: receptor

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

I. Conclusiones

1. El ensayo inmunoenzimático para cuantificar NGF utilizado en este trabajo es específico para el NGF humano y de monos, no reconoce otras neurotrofinas y es útil para el estudio de los niveles de NGF tanto séricos como centrales. En el suero humano existen factores inhibidores de la actividad biológica del NGF sobre el ganglio simpático de embrión de pollo.
2. Los trastornos degenerativos se acompañan de modificaciones en los niveles séricos de NGF que probablemente dependen del grado de progreso de la enfermedad y pudieran reflejar mecanismos que retardan o aceleran la muerte neuronal en las regiones afectadas, según el grado de progreso de la enfermedad.
3. Las lesiones inductoras de eventos neurodegenerativos en ratas provocan una disminución en los niveles séricos de NGF similar a la observada en pacientes, lo cual sugiere que los cambios detectados en esta variable podrían estar causalmente vinculados con el proceso de la enfermedad.
4. Los tratamientos neurorrestaurativo (trasplante y terapia trófica) en modelos animales restablecen los niveles séricos de NGF sólo cuando se aplican de manera combinada. Este hallazgo podría ser útil en el diseño de futuras intervenciones terapéuticas en humanos.
5. Los niveles de NGF varían con la edad en ratas y monos, no así en humanos entre los 20 y los 60 años de edad.

II. Recomendaciones

1. Evaluar los niveles de NGF en diferentes estadios de la enfermedad de Huntington.
2. Evaluar los niveles de NGF en un grupo de sujetos normales con edades superiores a los 60 años de edad.
3. Realizar estudios de marcadores inmunológicos (IL-1, IL-6, TNF) encaminados a dilucidar la participación del Sistema Inmune en los cambios observados en el contenido de NGF en los diferentes paradigmas de neurodegeneración estudiados.
4. Estudiar la posible correlación entre marcadores apoptóticos y los niveles de NGF en la neurodegeneración.
5. Estudiar el efecto de otros tratamientos neurotróficos sobre el contenido de NGF en los paradigmas de neurodegeneración.

BIBLIOGRAFÍA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguado, F., J. Ballabriga, E. Pozas and I. Ferrer, 1998, TrkA immunoreactivity in reactive astrocytes in human neurodegenerative diseases and colchicine-treated rats., *Acta Neuropathol.(Berl.)* 96, 495.
2. Albert, M., 1997, The aging brain: normal and abnormal memory., *Philos.Trans.R.Soc.Lond.B.Bio.Sci.* 352, 1703.
3. Albin, R. and J. Greenamyre, 1992, Alternative excitotoxic hypotheses., *Neurology* 42, 733.
4. Alexi, T., J.L. Venero and F. Hefti, 1997, Protective effects of neurotrophin-4/5 and transforming growth factor-alpha on striatal neuronal phenotypic degeneration after excitotoxic lesioning with quinolinic acid., *Neuroscience* 78, 73.
5. Alvarez, P., L. Blanco, N. Pavón, L. Vidal, O. Castellano, L. Castillo, A. García, J. Rosillo and R. Macias, 1998, Trasplante simultáneo de células mesencefálicas fetales en striatum y globus pallidus de ratas con lesión por 6-hidroxidopamina., *Rev.Neurol.* 26, 537.
6. Anderson, K., R. Alderson, C.A. Altar, P. Di Stefano, T. Cocoran, R.M. Lindsay and S.J. Wiegand, 1995, Differential distribution of exogenous BDNF, NGF, and NT-3 in the brain corresponds to the relative abundance and distribution of high-affinity and low-affinity neurotrophin receptors., *J.Comp.Neurol.* 26, 296.
7. Angeletti, R. and R. Bradshaw, 1971, NGF from mouse submaxillary gland., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 68, 2417.
8. Appel, S., 1981, A unifying hypothesis for the cause of amyotrophic lateral sclerosis, parkinsonism, and Alzheimer disease., *Ann Neurol.* 10, 499.
9. Arredondo, L., C. Deng, R. Ratts, A. Lovett-Racke, D.M. Holtzman and M. Racke, 2001, Role of nerve growth factor in experimental autoimmune encephalomyelitis, *Eur.J.Immunol.* 31, 625.
10. Backlund, E., P. Granberg, B. Hamberger, E. Knutsson, A. Martensson, G. Sedvall, A. Seiger and L. Olson, 1985, Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism: First clinical trials., *J.Neurosurg.* 62, 169.
11. Backman, C., G. Rose, B. Hoffer, M. Henry, R.T. Bartus and P.M. Friden, 1996, Systemic administration of a nerve growth factor conjugate reverses age-related cognitive dysfunction and prevent cholinergic neurons atrophy., *J.Neurosci.* 16, 5437.
12. Báez, M.M., L. Morales, C.I. Fernández, I. Cabrera, O. González, E. Padilla and M. Zaldivar, 1999, Evoked potentials in the sacred baboon: long-term follow-up of intracerebroventricular infusion of nerve growth factor, *Rev.Neurol.* 28, 665.

13. Bakay, R., 1990, Transplantation into the central nervous system: a therapy of the future., *Stereotac.Neurosurg.* 1, 881.
14. Barde Y, 1989, Trophic factors and neural survival., *Neuron* 2, 1525.
15. Barker, P.A., 1998, p75NTR: a study in contrasts, *Cell Death Differentiation* 5, 346.
16. Barker, R. and S. Dunnett, 1999, Neuronal repair, transplantation and rehabilitation. *Neuropsychological rehabilitation: a modular handbook.* (Psychology Press, UK)
17. Barrett, G., 2000, The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis., *Prog.Neurobiol.* 61, 205.
18. Barrow, M., J. Mitchell and M. Paiva, 2000, Over expression of NGF ameliorates ethanol neurotoxicity in the developing cerebellum, *J.Neurobiol.* 45, 95.
19. Bergado, J., C.I. Fernández, A. Gomez-Soria and O. González, 1997, Chronic intraventricular infusion with NGF improves LTP in old cognitively-impaired rats., *Brain.Res.* 770, 1.
20. Bergado, J., A. Gomez-Soria, R. Cruz-Aguado and C.I. Fernández, 1998, Nerve growth factor improves evoked potentials and long-term potentiation in the dentate gyrus of presenile rats., *Eur.J.Pharmacol* 345, 181.
21. Bigl, V. and R. Schliebs, 1998, Simulation of cortical cholinergic deficits--a novel experimental approach to study pathogenetic aspects of Alzheimer's disease., *J.Neural Transm.Suppl.* 54, 237.
22. Björklund, A. and U. Stenevi, 1985, Intracerebral neural grafting: a historical perspective., in: *Neural Grafting in the Mammalian CNS*, eds. A. Bjorklund and U. Stenevi (Elseviers, Amsterdam)
23. Blanco, L., N. Pavón, R. Macías, L. Castillo, C. Díaz, A. García and P. Alvarez, 2000, Microtrasplante simultáneo de células mesencefálicas fetales en el estriado y sustancia nigra pars reticulada de ratas hemiparkinsonianas. Estudio conductual., *Rev.Neurol.* 30, 1122.
24. Blesch, A., R.J. Grill and M.H. Tuszynski, 1998, Neurotrophin gene therapy in CNS models of trauma and degeneration., *Prog.Brain Res.* 117, 473.
25. Block, F. and M. Schwartz, 1997, Single microinjection of L-glutamate induces oxidative stress in discrete regions of rat brain., *Neuroreport.* 5, 2237.
26. Blöchl, A. and H. Thoenen, 1995, Characterization of nerve growth factor (NGF) release from hippocampal neurons: evidence for a constitutive and a unconventional sodium-dependent regulation pathway., *Eur.J.Neurosci.* 7, 1220.
27. Bocchini, V. and P. Angeletti, 1969, The nerve growth factor: purification as a 30,000-molecular-weight protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 64, 787.
28. Bowenkamp, K., P.A. Lapchak and B. Hoffer, 1996, Glial cell line derived neurotrophic factor reverses motor impairment in 16-17 month old rats., *Neurosci.Lett.* 211, 84.

29. Bracci-Laudiero, L., L. Aloe, R. Levi-Montalcini, C. Buttinelli, D. Schilter, S. Gillessen and U. Otten, 1992, Multiple sclerosis patients express increased levels of β -nerve growth factor in cerebrospinal fluid., *Neurosci.Lett.* 147, 9.
30. Bracci-Laudiero, L., L. Aloe, R. Levi-Montalcini, M. Galeazzi, D. Scilter, J. Scully and U. Otten, 1993, Increased levels of NGF in sera of systemic lupus erythematosus patients., *Neuroreport.* 4, 563.
31. Bradford, H.F., J. Zhou, B. Pliego-Rivero, G.M. Stern and E. Jauniaux, 1999, Neurotrophins in the pathogenesis and potential treatment of Parkinson's disease., *Adv.Neurol.* 80, 19.
32. Bresjanac, M. and G. Antauer, 2000, Reactive astrocytes of the quinolinic acid-lesioned rat striatum express GFRalpha1 as well as GDNF in vivo., *Exp.Neurol* 164, 53.
33. Bruce, G. and G. Heinrich, 1989, Production and characterization of biologically active recombinant human nerve growth factor., *Neurobiol.Aging* 10, 89.
34. Brundin, P., J. Karlsson, M. Emgard, G.S. Schierle, O. Hansson, A. Petersen and R.F. Castilho, 2000, Improving the survival of grafted dopaminergic neurons: a review over current approaches., *Cell Transplant.* 9, 179.
35. Bu, G., Y. Sun, A.L. Schwartz and D.M. Holtzman, 1998, Nerve growth factor induces rapid increases in functional cell surface low density lipoprotein receptor-related protein., *J.Biol.Chem.* 273, 13359.
36. Canals, J.M., S. Marco, N. Checa, A. Michels, E. Perez-Navarro, E. Arenas and J. Alberch, 1998, Differential regulation of the expression of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin-3 after excitotoxicity in a rat model of Huntington's disease., *Neurobiol.Dis.* 5, 357.
37. Casamenti, F., P.P. Di, F. Milan, L. Petrelli and G. Pepeu, 1989, Effects of nerve growth factor and GM1 ganglioside on the number and size of cholinergic neurons in rats with unilateral lesion of the nucleus basalis., *Neurosci lett* 103, 87.
38. Castellanos-Ortega, M.R., R. Cruz-Aguado and L. Martinez-Marti, 1999, Nerve growth factor: possibilities and limitations of its clinical application, *Rev.Neurol.* 29, 439.
39. Chen, X., J.R. Fawcett, Y. Rahman, T. Ala and W. Frey, 1998, Delivery of nerve growth factor to the brain via the olfactory pathway, *J.Alzheimer.Dis.* 1, 35.
40. Chun, H.S., J.J. Son and J.H. Son, 2000, Identification of potential compounds promoting BDNF production in nigral dopaminergic neurons: clinical implication in Parkinson's disease., *Neuroreport.* 11, 511.
41. Collier, T.J. and C.E. Sortwell, 1999, Therapeutic potential of nerve growth factors in Parkinson's disease., *Drugs Aging* 14, 261.
42. Connor, B. and M. Dragunow, 1998, The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain, *Brain Res.Rev.* 27, 1.

43. Conrad, G. and E. Kandel, 2000, Genes and behavior., in: Principles of neural science, eds. E. Kandel, J. Schwartz and T. Jessell (McGraw Hill, New York) p. 36.
44. Coyle, J. and R. Schwarcz, 1976, Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea., *Nature* 263, 244.
45. Crutcher, K.A., S.A. Scott, S. Liang, W. Everson and J. Weingartner, 1993, Detection of NGF-like activity in human brain tissue: increased levels in Alzheimer's disease., *J.Neurosci.* 13, 2540.
46. Cruz-Aguado, R. Relación del metabolismo del glutatión con la función cognitiva, la neurodegeneración y el tratamiento neurotrófico en ratas. 2001. Tesis doctoral. CIREN. 1-117
47. Cruz-Aguado, R., L. Francis-Turner, C. Díaz and J. Bergado, 1999, NGF prevents changes in rat glutathione-related enzymes following transection of the septohippocampal pathway., *Neurochem.Int.* 34, 729.
48. Cuétara, K., L. Castillo and A. García, 1997, Obtención de suspensiones de células neurales. Aplicación en las investigaciones neurobiológicas., *Rev.Neurol.* 25, 1383.
49. Cullum, S., F. Huppert, M. McGee, T. Dening, A. Ahmed, E. Paykel and C. Brayne, 2000, Decline across different domains of cognitive function in normal ageing: results of a longitudinal population-based study using CAMCOG, *Int.J.Geriatr.Psychiatry* 15, 853.
50. Davies, D., N. Howood, S. Isaacs and D. Mann, 1992, The effect of age and Alzheimer's disease on pyramidal neuron density in the individual fields of the hippocampal formation., *Acta Neuropathol.* 83, 510.
51. Dobrowsky, R. and B. Carter, 2000, p75 neurotrophin receptor signaling: mechanisms for neurotrophic modulation of cell stress?., *J.Neurosci.Res.* 61, 237.
52. Donohue, S., R. Head and R. Stitzel, 1989, Elevated nerve growth factor levels in young spontaneously hypertensive rats., *Hypertension* 14, 421.
53. Dowling, P., X. Ming, S. Raval, W. Husar, P. Casaccia-Bonnet, M. Chao, S. Cook and B. Blumberg, 1999, Up-regulated p75NTR neurotrophin receptor on glial cells in MS plaques, *Neurology* 53, 1676.
54. Dragunow, M., P. Hughes, S.E. Mason-Parker, P. Lawlor and W.C. Abraham, 1997, TrkB expression in dentate granule cells is associated with a late phase of long-term potentiation., *Brain Res.Mol.Brain Res.* 46, 274.
55. Dunnett, S. and A. Bjorklund, 1999, Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease, *Nature* 399, 32.
56. Dunnett, S., A. Kendall, C. Watts and E. Torres, 1997, Neuronal cell transplantation for Parkinson's and Huntington's diseases., *British.Med.Bull.* 53, 1.

57. Ebadi, M., R.M. Bashir, M.L. Heidrick, F.M. Hamada, H.E. Refaey, A. Hamed, G. Helal, M.D. Baxi, D.R. Cerutis and N.K. Lassi, 1997, Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair., *Neurochem.Int.* 30, 347.
58. Ebendal, T., 1989, NGF in CNS: Experimental data and clinical implications., *Prog.Growth Factor Res.* 1, 143.
59. Ebendal, T., D. Larhammar and H. Persson, 1986, Structure and expression of the chicken β nerve growth factor., *Eur.Mol.Biol.Org.J.* 5, 1483.
60. Ebendal, T., L. Olson, A. Seiger and M. Belew, 1984, Nerve growth factors in chick and rat tissue., in: *Nerve growth factor*, ed. Black IB (Plenum Publishing Corp., New York) p. 231.
61. Emerich, D.F., S.R. Winn, P.M. Hantraye, M. Peschanski, E.Y. Chen, Y. Chu, P. McDermott, E.E. Baetge and J.H. Kordower, 1997, Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease., *Nature* 386, 395.
62. Emgard, M. Mechanisms and time course of cell death in embryonic nigral tissue and intrastriatal transplants. Doctoral document. 13-74. 2001. Lund University.
63. Escobar, M. and H. Pimienta, 1998, Núcleos de la base, en: *Sistema nervioso. Neuroanatomía funcional, neurobiología, neurotransmisores, receptores y clínica*, eds. M. Escobar and H. Pimienta (Universidad del Valle, Santiago de Cali) p. 119.
64. Espejo, M., B. Cutillas, T.E. Arenas and S. Ambrosio, 2000, Increased survival of dopaminergic neurons in striatal grafts of fetal ventral mesencephalic cells exposed to neurotrophin-3 or glial cell line-derived neurotrophic factor., *Cell Transplant.* 9, 45.
65. Fahnestock, M., B. Michalski, B. Xu and M. Coughlin, 2001, The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease, *Mol.Cell Neurosci.* 18, 210.
66. Fahnestock, M., S.A. Scott, N. Jette, J.A. Weingartner and K.A. Crutcher, 1996, Nerve growth factor mRNA and protein levels measured in the same tissue from normal and Alzheimer's disease parietal cortex., *Brain Res.Mol.Brain Res.* 42, 175.
67. Faradji, R. and J. Sotelo, 1990, Low serum levels of nerve growth factor in diabetic neuropathy., *Acta Neurol.Scand.* 81, 402.
68. Fernandez, C.I., J. Bergado and K. de la Cuétara, 1994, Brain aging and neurotransmission. Effect of septal suspension graft to hippocampus of aged rodents on learning and memory., *Arch.Gerontol.Geriatr.* 4, 59.
69. Ferrer, I., C. Marin, M.J. Rey, T. Ribalta, E. Goutan, R. Blanco, E. Tolosa and E. Marti, 1999, BDNF and full-length and truncated TrkB expression in Alzheimer disease. Implications in therapeutic strategies., *J Neuropathol.Exp.Neurol* 58, 729.

70. Fischer, W., K. Victorin, A. Björklund, L.R. Williams, S. Varon and F.H. Gage, 1987, Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor., *Nature* 329, 65.
71. Fletcher, L., 1997, Memories are made of this: the genetic basis of memory., *Mol.Med.Today* 3, 429.
72. Flugel, A., K. Matsumuro, H. Neumann, W. Klinkert, R. Birnbacher, H. Lassmann, U. Otten and H. Wekerle, 2001, Anti-inflammatory activity of nerve growth factor in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of monocyte transendothelial migration., *Eur.J.Immunol.* 31, 11.
73. Freed, C., R. Breeze, N. Rosenberg, E. Kriek, T. Lone, T. Wells, S. Grafton, H. Huang, J. Mazziotta, G. Sawle and D. Brooks, 1992, Implants of human embryonic mesencephalic dopamine cells improve motor performance and reduce drug requirements in patients with severe Parkinson's disease 5 to 45 months after transplant., *Restor.Neurol.Neurosci.* 4, 230.
74. Freed, W., 1983, Functional brain tissue transplantation: Reversal of lesion-induced rotational by intraventricular substantia nigra and adrenal medulla grafts, with a note on intracranial retinal grafts., *Biol.Psychiatric.* 18, 1205.
75. Freed, W., H. Cannon-Spoor and E. Krauthamer, 1986, Intrastratial adrenal medulla grafts in rats: Long-term survival and behavioral effects., *J.Neurosurg.* 65, 664.
76. Freed, W., J. Morihisa and E. Spoor, 1981, Transplanted adrenal chromaffin cells in rat brain reduce lesion-induced rotational behaviour., *Nature* 292, 351.
77. Friedman, W.J, 2000, Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor., *J. Neurosci.* 20,6340.
78. Friedman, W.J. and L.A. Greene, 1999, Neurotrophin signaling via Trks and p75., *Exp.Cell Res.* 253, 131.
79. Froestl, W., 2000, Receptors in neurodegenerative diseases., *Pharm.Acta Helv.* 74, 247.
80. García-Yébenes, J., 1997, Factores tróficos en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, en: *Tratado sobre la enfermedad de Parkinson*, eds. J. Obeso, E. Tolosa and F. Grandas (Luzán 5, SA de Ediciones Lab. DU PONT Pharma, Madrid) p. 351.
81. Goedert, M., A. Fine, S. Hunt and A. Ullrich, 1986, Nerve growth factor mRNA in peripheral and central nervous system: lesion effects in the rat brain and levels in Alzheimer's disease., *Mol.Brain.Res.* 1, 85.
82. Goldberg, M. and P. Lansbury, 2000, Is there a cause-and-effect relationship between alfa-synuclein fibrillization and Parkinson's disease?, *Nature Cell.Biol.* 2, 115.
83. Gonzalez-Hoyuela, M., J. Soto, R. Garcia-Milian, R. Ubieta, L. Francis and R. Conde-Vazquez, 1998, Genetic expression of nerve growth factor in the central nervous system. Evaluation of an experimental model for Alzheimer's dementia, *Rev.Neurol.* 26, 204.

84. Gouhier, C., S. Chalon, M.C. Venier-Julienne, S. Bodard, J. Benoit, J. Besnard and D. Guilloteau, 2000, Neuroprotection of nerve growth factor-loaded microspheres on the D2 dopaminergic receptor positive-striatal neurones in quinolinic acid-lesioned rats: a quantitative autoradiographic assessment with iodobenzamide., *Neurosci.Lett.* 288, 71.
85. Grill, R., A. Blesch and M. Tuszynski, 1997, Robust growth chronically injured spinal cord axons induced by grafts of genetically modified NGF-secreting cells., *Exp.Neurol.* 148, 444.
86. Gu, Z., J. Yu and J.R. Perez-Polo, 1998a, Long term changes in brain cholinergic markers and nerve growth factor levels after partial immunolesion., *Brain Res.* 801, 190.
87. Gu, Z., J. Yu and J.R. Perez-Polo, 1998b, Responses in the aged rat brain after total immunolesion, *J.Neurosci.Res.* 54, 7.
88. Hagg, T., 1998, Neurotrophins prevent death and differentially affect tyrosine hydroxylase of adult rat nigrostriatal neurons in vivo., *Exp.Neurol* 149, 183.
89. Haik, K., D. Shear, U. Schoeder and B. Bel, 2000, Quinolinic acid released from polymeric brain implants causes behavioral and neuroanatomical alterations in a rat model of Huntington's disease., *Eur.Neurol.* 163, 430.
90. Hamill, R., M. Lindner and R. Loy, 1993, Decline in levels of NGF protein and p75 receptor in Alzheimer's disease cortex., *Soc.Neurosci.Abstr.* 19, 191.
91. Haque, N.S. and O. Isacson, 2000, Neurotrophic factors NGF and FGF-2 alter levels of huntingtin (IT15) in striatal neuronal cell cultures., *Cell Transplant.* 9, 623.
92. Harman, D., 1996, Free radical theory of aging., *Age* 18, 97.
93. Harwood, D., W. Barker, R. Ownby and R. Duara, 2000, Relationship of behavioral and psychological symptoms to cognitive impairment and functional status in Alzheimer's disease., *Int.J.Geriatr.Psychiatry* 15, 393.
94. Hattori, N., H. Shimura, S. Kubo, M. Wang, N. Shimizu, K. Tanaka and Y. Mizuno, 2000, Importance of familial Parkinson's disease and parkinsonism to the understanding of nigral degeneration in sporadic Parkinson's disease., *J.Neural Transm* 60, 101.
95. Heese, K., C. Hock and U. Otten, 1998, Inflammatory signals induce neurotrophin expression in human microglial cells., *J.Neurochem.* 70, 699.
96. Hefti, F., 1997a, Neurotrophic factor therapy keeping score., *Nat.Med.* 3, 497.
97. Hefti, F., 1997b, Pharmacology of neurotrophic factors., *Annu.Rev.Pharm.Toxicol.* 37, 239.
98. Hefti, F., J. Hartikka and B. Knusel, 1989, Function of neurotrophic factors in the adult and aging brain and their possible use in the treatment of neurodegenerative disease., *Neurobiol.Aging* 10, 515.

99. Hefti, F. and W. Weiner, 1986, Nerve growth factor and Alzheimer's disease., *Ann Neurol.* 20, 275.
100. Heikkila, R., A. Hess and R. Duvoisin, 1984, Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice., *Science* 224, 1451.
101. Heinrich, G. and T. Meyer, 1988, Nerve growth factor is present in human placenta and semen but undetectable in normal and Paget's disease blood: measurements with an anti-mouse-NGF enzyme immunoassay using a recombinant human NGF reference., *Biochem.Biophys.Res Commun.* 155, 482.
102. Hellweg, R., C.A. Gericke, K. Jendroska, H.D. Hartung and J. Cervos-Navarro, 1998a, NGF content in the cerebral cortex of non-demented patients with amyloid-plaques and in symptomatic Alzheimer's disease., *Int.J.Dev.Neurosci.* 16, 787.
103. Hellweg, R., R.S. von, D. Anders, C. Baethge, S. Ropke, H.D. Hartung and C.A. Gericke, 1998b, The time course of nerve growth factor content in different neuropsychiatric diseases--a unifying hypothesis., *J.Neural Transm.* 105, 871.
104. Hengartner, M., 2000, The biochemistry of apoptosis, *Nature* 407, 770.
105. Henriksson, B., S. Soderstrom, A. Gower, T. Ebendal and B. Winblad, 1992, Hippocampal nerve growth factor levels are related to spatial learning ability in aged rats., *Behav.Brain Res.* 48, 15.
106. Herrero, M., 1997, Anatomía de la enfermedad de Parkinson: Parkinsonismo experimental por MPTP, en: *Tratado sobre la enfermedad de Parkinson*, eds. J. Obeso, E. Tolosa and F. Grandas (Luzán 5, SA de Ediciones Lab. DU PONT Pharma, Madrid) p. 143.
107. Hock, C., K. Heese, C. Hulette, C. Rosenberg and U. Otten, 2000a, Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas., *Arch.Neurol.* 57, 846.
108. Hock, C., K. Heese, F. Muller-Spahn, P. Huber, W. Riesen, R.M. Nitsch and U. Otten, 2000b, Increased CSF levels of nerve growth factor in patients with Alzheimer's disease., *Neurology* 54, 2009.
109. Hock, C., K. Heese, G. Olivieri, C. Hulette, C. Rosenberg, R.M. Nitsch and U. Otten, 2000c, Alterations in neurotrophins and neurotrophin receptors in Alzheimer's disease., *J.Neural Transm* 59, 171.
110. Hoehn, M. and M. Yahr, 1967, Parkinsonism: onset, progression and mortality., *Neurology* 17, 427.
111. Houle, J. and J. Ye, 1999, Survival of chronically-injured neurons can be prolonged by treatment with neurotrophic factors., *Neuroscience* 94, 929.
112. Ibañez, C., 1998, Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors., *Trends.Neurosci.* 21, 438.

113. Jiménez, F., 1997, Epidemiología de la enfermedad de Parkinson, en: Tratado sobre la enfermedad de Parkinson, eds. J. Obeso, E. Tolosa and F. Grandas (Luzán 5, SA de Ediciones Lab. DU PONT Pharma, Madrid) p. 71.
114. Jockers-Scherubl, M., C. Zouboulis, F. Boegner and R. Hellweg, 1996, Is nerve growth factor a serum marker for neurological and psychiatric complications in Behcet's disease?, *Lancet* 347, 982.
115. Jönhagen, M.E., 2000, Nerve growth factor treatment in dementia, *Alzheimer.Dis.Assoc.Disord.* 14 Suppl 1, S31.
116. Jönhagen, M.E., A. Nordberg, K. Amberla, L. Backman, T. Ebendal, B. Meyerson, L. Olson, Seiger, M. Shigeta, E. Theodorsson, M. Viitanen, B. Winblad and L.O. Wahlund, 1998, Intracerebroventricular infusion of nerve growth factor in three patients with Alzheimer's disease., *Dement.Geriatr.Cogn.Disord.* 9, 246.
117. Junger, H. and S. Varon, 1997, Neurotrophin-4 (NT-4) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promote the survival of corticospinal motor neurons of neonatal rats in vitro., *Brain Res* 762, 56.
118. Kaminski, G., O. Hansson and P. Brundin, 1999, Flunarizine improves the survival of grafted dopaminergic neurons., *Neurosci.* 94, 17.
119. Kaplan, D. and F. Miller, 2000, Neurotrophin signal transduction in the nervous system., *Curr.Opin.Neurobiol.* 10, 381.
120. Kastin, A.J., W. Pan, L.M. Maness and W.A. Banks, 1999, Peptides crossing the blood-brain barrier: some unusual observations., *Brain Res.* 848, 96.
121. Koliatsos, V.E., 1996, Biological therapies for Alzheimer's disease: focus on trophic factors., *Crit.Rev.Neurobiol.* 10, 205.
122. Koo, P. and P. Stach, 1989, Interaction of nerve growth factor with alpha-macroglobulin., *J.Neurosci.Res.* 22, 247.
123. Kordower, J.H., D.C. Gash and M. Bothwell, 1989, Nerve growth factor receptor and choline acetyltransferase remain colocalized in the nucleus basalis (Ch4) of Alzheimer's patients., *Neurobiol.Aging* 10, 76.
124. Kordower, J.H., O. Isacson and D.F. Emerich, 1999, Cellular delivery of trophic factors for the treatment of Huntington's disease: is neuroprotection possible?, *Exp.Neurol* 159, 4.
125. Korsching, S., G. Auburger, R. Heumann, J. Scott and H. Thoenen, 1985, Levels of nerve growth factor and its mRNA in the central nervous system of the rat correlate with cholinergic innervation., *Eur.Mol.Biol.Org.J.* 4, 1389.
126. Korsching, S. and H. Thoenen, 1983, Nerve growth factor in sympathetic ganglia and corresponding target organs of the rat: Correlation with density of sympathetic innervation., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 80, 3513.

127. Korsching, S. and H. Thoenen, 1987, Two-site enzyme immunoassay for nerve growth factor., *Med.Enzymol.* 147, 167.
128. Krogsgaard-Larsen, P., 1993, Neurotransmitter receptors as pharmacological targets in Alzheimer's disease., in: *Drug design for Neuroscience*, ed. A. Kozikowski (Raven Press, New York) p. 1.
129. Kurlan, R., M.H. Kim and M.D. Gash, 1991, Oral Levodopa Dose-Response Study in MPTP-Induced Hemiparkinsonian Monkeys: Assessment with a new rating scale for monkey parkinsonism., *Movement Disorders* 6, 111.
130. Kurth, M., C. Adler, M. Hilaire, C. Singer, C. Waters, P. LeWitt, D. Chernik, E. Dorflinger and K. Too, 1997, Tolcapone mejora la función motora y reduce el requerimiento de levodopa en pacientes con enfermedad de Parkinson que experimentan fluctuaciones motoras: Ensayo multicéntrico, a doble ciego, randomizado y controlado con placebo., *Neurology* 48, 81.
131. Lahiri, D.K. and C. Nall, 1995, Promoter activity of the gene encoding the beta-amyloid precursor protein is up-regulated by growth factors, phorbol ester, retinoic acid and interleukin-1., *Mol.Brain.Res.* 32, 233.
132. Lai, K., W. Fu, F. Ip and N. Ip, 1998, Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp., *Mol.Cell Neurosci.* 11, 64.
133. Landreth, G.E., 1999, Growth factors., in: *Basic neurochemistry, molecular, cellular and medical aspects.*, Vol.6, ed. G.J. Siegel, B. Agranoff, R. Wayne, S. Albers, A. Fisher and M. Uhler (Lippincott-Raven, New York) p. 384.
134. Lau, L. and R. Huganir, 1999, Tyrosine phosphorylation., in: *Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects*, eds. G.J. Siegel, B. Agranoff, R. Wayne, S. Albers, A. Fisher and M. Ulher (Lippincott-Raven Publishers, New York) p. 497.
135. Laudiero, L., L. Aloe, R. Levi-Montalcini, C. Buttinelli, D. Schilter, S. Gillessen and U. Otten, 1992, Multiple sclerosis patients express increased levels of β -nerve growth factor in cerebrospinal fluid., *Neurosci.Lett.* 147, 9.
136. Lärkfors, L. and T. Ebendal, 1987, Highly sensitive enzyme immunoassay for β -nerve growth factor., *J.Immunol.Meth.* 97, 41.
137. Levi-Montalcini, R. and V. Hamburger, 1951, Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo., *J.Exp.Zool.* 116, 321.
138. Levi-Montalcini, R., S.D. Skaper, R. Dal Toso, L. Petrelli and A. Leon, 1996, Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine., *Trends.Neurosci.* 19, 514.
139. Lewin, G. and Y.A. Barde, 1996, Physiology of the neurotrophins., *Annu.Rev.Neurosci.* 19, 289.

140. Lindvall, O., E. Backlund, L. Farde, G. Sedvall, R. Freedman, B. Hoffer, A. Nobin, A. Seiger and L. Olson, 1987, Transplantation in Parkinson's disease: Two cases of adrenal medullary grafts to the putamen., *Ann.Neurol.* 22, 457.
141. Longo, F.M., J. Woo and W.C. Mobley, 1989, Purification of nerve growth factor., in: *Nerve growth factors*, ed. J. Wiley (Rush RA, New York) p. 3.
142. López-Lozano, J., G. Bravo and J. Abascal, 1992, First clinical trial of cografing of autologous adrenal medulla and peripheral nerve in Parkinson's disease., *Restor.Neurol.Neurosci.* 4, 207.
143. López, J. and B. Brera, 1997, Regeneración y restauración del sistema dopaminérgico. Trasplantes neurales, en: *Tratado sobre la enfermedad de Parkinson*, eds. J. Obeso, E. Tolosa and F. Grandas (Luzán 5, SA de Ediciones Lab. DU PONT Pharma, Madrid) p. 363.
144. Luo, J., M. Wallace, D. Hawver, J. Kusiak and W. Wallace, 2001, Characterization of the neurotrophic interaction between nerve growth factor and secreted amyloid precursor protein., *J.Neurosci.Res.* 63, 410.
145. MacPhee, I. and P. Baker, 1999, Extended ceramide exposure activates the trkA receptor by increasing receptor homodimer formation., *J.Neurochem.* 72, 1423.
146. Madrazo, I., R. Drucker-Colin, V. Diaz, J. Martinez-Mata, C. Torres and J. Becerril, 1987, Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease., *N.Engl.J.Med.* 316, 831.
147. Mahoney, M.J. and W.M. Saltzman, 1999, Millimeter-scale positioning of a nerve-growth-factor source and biological activity in the brain., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96, 4536.
148. Mandel, R.J., F.H. Gage, D.G. Clevenger, S.K. Spratt, R.O. Snyder and S.E. Leff, 1999, Nerve growth factor expressed in the medial septum following in vivo gene delivery using a recombinant adeno-associated viral vector protects cholinergic neurons from fimbria-fórnix lesion-induced degeneration., *Exp.Neurol.* 155, 59.
149. Mandel, R.J., F.H. Gage and L.J. Thal, 1989, Spatial learning in rats: correlation with cortical choline acetyltransferase and improvement with NGF following NBM damage., *Exp.Neurol* 104, 208.
150. Martínez, P., 1997, Tratamiento de la enfermedad de Parkinson con levodopa. Experiencia de 25 años, en: eds. J. Obeso, E. Tolosa and F. Grandas (Luzán 5, SA de Ediciones Lab. DU PONT Pharma, Madrid) p. 243.
151. Massaro, A.R. and P. Tonali, 1998, Cerebrospinal fluid markers in multiple sclerosis: an overview., *Mult.Scler.* 4, 1.
152. McKay, S., A. Purcell and T. Carew, 1999, Regulation of synaptic function by neurotrophic factors in vertebrates and invertebrates: implications for development and learning., *Learn.Mem.* 6, 193.

153. Mckhann, G., D. Drachman, M. Folstein, M. Katzman, D. Price and E. Stadlan, 1984, Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and human Services Task Force on Alzheimer's disease, *Neurology* 34, 939.
154. Mena, M.A., V. Davila, J. Bogaluvsky and D. Sulzer, 1998, A synergistic neurotrophic response to l-dihydroxyphenylalanine and nerve growth factor., *Mol.Pharmacol.* 54, 678.
155. Menei, P., J.M. Pean, V. Nerriere-Daguin, C. Jollivet, P. Brachet and J.P. Benoit, 2000, Intracerebral implantation of NGF-releasing biodegradable microspheres protects striatum against excitotoxic damage., *Exp.Neurol.* 161, 259.
156. Meyer, M. and J.Z. Rasmussen, 1999, Neuronal growth factors--neurotrophins, *Ugeskr.Laeger* 161, 2063.
157. Micera, A., A. Lambiase, P. Rama and L. Aloe, 1999, Altered nerve growth factor level in the optic nerve of patients affected by multiple sclerosis., *Mult.Scler.* 5, 389.
158. Micera, A., E. Vigneti and L. Aloe, 1998, Changes of NGF presence in nonneuronal cells in response to experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats., *Exp.Neurol.* 154, 41.
159. Missale, C., F. Boroni, S. Sigala, A. Burianni, M. Fabris, A. Leon, R. Dal Toso and P. Spano, 1996, Nerve growth factor in the anterior pituitary: localization in mammothroph cells and cosecretion with prolactin by a dopamine-regulated mechanism., *Proc Natl Acad Sci* 93, 4240.
160. Mobley, W.C., J. Rutkowski, G. Tennekoon, J. Gemski, K. Buchanan and M. Johnston, 1986, Nerve growth factor increase choline acetyltransferase activity in developing basal forebrain neurons., *Mol.Brain.Res.* 1, 53.
161. Mobley, W.C., A. Schenker and E.M. Shooter, 1976, Characterization and isolation of proteolytically modified nerve growth factor., *Biochem.* 15, 5543.
162. Mogi, M., A. Togari, M. Ogawa, K. Ikeguchi, N. Shizuma, D. Fan, I. Nakano and T. Nagatsu, 1998, Effects of repeated systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to mice on interleukin-1beta and nerve growth factor in the striatum., *Neurosci.Lett.* 250, 25.
163. Murase, K., T. Nabeshima, Y. Robitaille, R. Quirion, M. Ogawa and K. Hayashi, 1993, NGF level is not decreased in the serum, brain-spinal fluid, hippocampus, or parietal cortex of individuals with Alzheimer's disease., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 193, 198.
164. Murase, K., R. Takeuchi, E. Iwata, Y. Furukawa, S. Furukawa and K. Hayashi, 1992, Developmental changes in nerve growth factor level in rat serum., *J.Neurosci.Res.* 33, 282.
165. Nagatsu, T., M. Mogi, H. Ichinose and A. Togari, 2000a, Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease., *J.Neural Transm Suppl.* 277.

166. Nagatsu, T., M. Mogi, H. Ichinose and A. Togari, 2000b, Cytokines in Parkinson's disease., *J.Neural Transm Suppl.* 143.
167. Nakao, N., H. Yokote, K. Nakai and T. Itakura, 2000, Promotion of survival and regeneration of nigral dopamine neurons in a rat model of Parkinson's disease after implantation of embryonal carcinoma-derived neurons genetically engineered to produce glial cell line-derived neurotrophic factor., *J.Neurosurg.* 92, 659.
168. Näher-Noé, M., H. Gnahn, A. Grundler, J. Klingelhofer, A. Weindl and B. Conrad, 1993, Determination of nerve growth factor concentration in human samples by two-site immunoenzymometric assay and bioassay., *Eur.J.Clin.Cahm.Clin.Biochem.* 31, 375.
169. Nilsson, A., M. Fainzilber, P. Falck and C.F. Ibanez, 1998, Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebra fish., *FEBS Lett.* 424, 285.
170. Nishio, T., S. Furukawa, I. Akiguchi and N. Sunohara, 1998, Medial nigral dopamine neurons have rich neurotrophin support in humans., *Neuroreport.* 9, 2847.
171. Nishizuka, M., R. Katoh-Semba, K. Eto, Y. Arai, R. Iizuka and K. Kato, 1991, Age- and sex-related differences in the nerve growth factor distribution in the rat brain., *Brain Res.Bull.* 27, 685.
172. Nörrgren, G., T. Ebendal, M. Belew, C. Jacobson and J. Porath, 1980, Release of nerve growth factor by human glial cells in culture., *Exp.Cell Res.* 130, 31.
173. Olanow, C.W. and W.G. Tatton, 1999, Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease., *Annu.Rev.Neurosci.* 22:123-44., 123.
174. Olson, L., E. Backlund, T. Ebendal, R. Freedman, B. Hamberger, P. Hansson, B. Hoffer, U. Lindblom, B. Meyerson, I. Stromberg, O. Sydow and A. Seiger, 1991, Intraputamial infusion of nerve growth factor to support adrenal medullary autografts in Parkinson's disease: one-year follow-up of first clinical trial., *Arch.Neurol.* 48, 373.
175. Olson, L., A. Nordberg, H.H. von, L. Backman, T. Ebendal, I. Alafuzoff, K. Amberla, P. Hartvig, A. Herlitz and A. Lilja, 1992, Nerve growth factor affects 11C-nicotine binding, blood flow, EEG, and verbal episodic memory in an Alzheimer patient (case report)., *J.Neural Transm.Park.Dis.Dement.Sect.* 4, 79.
176. Orike, N., C. Thrasivoulou, A. Wrigley and T. Cowen, 2001, Differential regulation of survival and growth in adult sympathetic neurons: an in vitro study of neurotrophin responsiveness, *J.Neurobiol.* 47, 295.
177. Pan, W., W.A. Banks and A.J. Kastin, 1998, Permeability of blood-brain barrier to neurotrophins., *Brain Res.* 788, 87.
178. Pan, W., D. Sampath, G. Jackson, K. Werrbach-Pérez and R. Pérez-Polo, 1997, Nerve growth factor and oxidative stress in the nervous system., en: *Brain plasticity*, ed. Filogamo (Plenum Press, New York) p. 173.
179. Pardridge, W.M., 1991, Transnasal and intraventricular delivery of drugs., in: *Peptide drug delivery to the brain.*, ed. W.M. Pardridge (Raven, New York) p. 99.

180. Pascual, J., J. Berciano and A. Pazos, 1997, Características neuroquímicas de la enfermedad de Parkinson y otras causas de parkinsonismo, in: Tratado sobre la enfermedad de Parkinson, eds. J. Obeso, E. Tolosa and F. Grandas (Luzán 5, SA de Ediciones Lab. DU PONT Pharma, Madrid) p. 155.
181. Paxinos, G. and C. Watson, 1986, The rat brain in stereotaxic coordinates. (Academic Press, New York)
182. Pezzoli, G., E. Motti and A. Zecchinelli, 1990, Adrenal medullary autografts in 3 parkinsonian patients: Results using two different approaches., in: Neural transplantation: From molecular basis to clinical application., eds. S. Dunnett and S. Richards (Elsevier, Amsterdam) p. 677.
183. Phillips, H.S., J.M. Hains, M. Armanini, G.R. Laramée, S.A. Johnson and J.W. Winslow, 1991, BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease., *Neuron* 7, 695.
184. Poduslo, J. and G. Curran, 1996, Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF., *Mol.Brain.Res.* 36, 280.
185. Poduslo, J., G. Curran and C. Berg, 1994, Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood-brain barriers., *Proc Natl Acad Sci* 91, 5705.
186. Price, D., 2000, Aging of the brain and dementia of the Alzheimer type., in: Principles of neural science, eds. E. Kandel, J. Schwartz and T. Jessell (McGraw Hill, New York) p. 1149.
187. Przedborski, S., V. Jackson-Lewis, A. Naini, M. Jakowec, G. Petzinger, R. Miller and M. Akram, 2001, The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety., *J.Neurochem.* 76, 1265.
188. Reynolds, A., S. Bartlett and I. Hendry, 2000, Molecular mechanisms regulating the retrograde axonal transport of neurotrophins., *Brain Res.Rev.* 33, 169.
189. Rodríguez, MC, Rodríguez, M, and Obeso, JA. Organización y función de los ganglios basales. Modelos experimentales.en: Obeso, JA, Tolosa, E., and Grandas, F. Tratado sobre la enfermedad de Parkinson. (9), 113-125. 1997. Madrid, Luzán 5, SA de Ediciones Lab. DU PONT Pharma
190. Ronne, H., H. Anundi, L. Rask and P. Peterson, 1979, Nerve growth factor binds to serum alpha-2-macroglobulin., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 87, 330.
191. Roy, B., T. Sunderland, D. Murphy and J. Morihisa, 1988, Antibody for nerve growth factor detected in patients with Alzheimer's disease., *Ann N.Y.Acad.Sci.* 540, 398.
192. Rouxx, P.P., M.A. Colicos, P.A. Barker, T.E. Kennedy, 1999, p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure, *J. Neurosci.* 19, 6887.

193. Sacerdote, P., B. Manfredi, L. Aloe, A. Micera and A.E. Panerai, 1996, Centrally injected nerve growth factor modulates peripheral immune responses in the rat, *Neuroendocrinology* 64, 274.
194. Salehi, A., M. Ocampo, J. Verhaagen and D.F. Swaab, 2000, P75 neurotrophin receptor in the nucleus basalis of Meynert in relation to age, sex, and Alzheimer's disease., *Exp.Neurol.* 161, 245.
195. Schierle, G.S., O. Hansson, M. Leist, P. Nicotera, H. Widner and P. Brundin, 1999, Caspase inhibition reduces apoptosis and increases survival of nigral transplants., *Nat.Med.* 5, 97.
196. Schulz, J., J. Lindenau, J. Seyfried and J. Dichgans, 2000, Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration., *Eur.J.Biochem.* 267, 4904.
197. Selkoe, D. and P. Lansbury, 1999, Biochemistry of Alzheimer's and prion diseases., in: *Basic neurochemistry molecular, cellular and medical aspects.*, eds. G. Seigel, B. Agranoff, R. Wayne and S. Albers (Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia) p. 949.
198. Serrano-Sanchez, T. and I. Diaz-Armesto, 1998, Brain-derived growth factor: current aspects, *Rev.Neurol.* 26, 1027.
199. Shelton, D. and L. Reichardt, 1984, Expression of the β -nerve growth factor gene correlates with the density of sympathetic innervation in effector organs., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 81, 7951.
200. Shimizu, N., S. Asakawa, S. Minoshima, T. Kitada, N. Hattori and H. Matsumine, 2000, Parkin as a pathogenic gene for autosomal recessive juvenile parkinsonism, *J.Neural Transm* 58, 19.
201. Shimoke, K. and H. Chiba, 2001, Nerve growth factor prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced cell death via the Akt pathway by suppressing caspase-3-like activity using PC12 cells: relevance to therapeutical application for Parkinson's disease, *J.Neurosci.* 63, 402.
202. Shinoda, I., R. Takeuchi, M. Kurobe, S. Furukawa and K. Hayashi, 1988, Molecular nature of β -nerve growth factor (NGF)-like immunoreactive substance(s) in mouse plasma., *J.Clin.Biochem.Nutr.* 5, 135.
203. Sian, J., M. Youdim, P. Reiderer and M. Gerlach, 1999, Neurotransmitter and disorders of the basal ganglia., in: *Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects.*, eds. G. Seigel, B. Agranoff, R. Wayne and S. Albers (Lippincott-Raven publishers, Philadelphia) p. 917.
204. Siegel, G.J. and N.B. Chauhan, 2000, Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain., *Brain Res.Brain Res.Rev.* 33, 199.
205. Smith, D.E., J. Roberts, F.H. Gage and M.H. Tuszynski, 1999, Age-associated neuronal atrophy occurs in the primate brain and is reversible by growth factor gene therapy [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Dec 7;96(25):14668], *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96, 10893.

206. Söderström, S., F. Hallbook, C.F. Ibanez, H. Persson and T. Ebendal, 1990, Recombinant human β -nerve growth factor (NGF): Biological activity and properties in an enzyme immunoassay., *J.Neurosci.Res.* 27, 665.
207. Springer, J. and P. Kitzman, 1998, Neuroprotective strategies involving the neurotrophins and their signaling pathways., in: *Neuroprotective signal transduction.*, ed. M.P. Mattson (Human Press, New York) p. 1.
208. Sramek, J.J. and N.R. Cutler, 1999, Recent developments in the drug treatment of Alzheimer's disease., *Drugs Aging* 14, 359.
209. Stephani, U. and K. Mauter, 1990, Nerve growth factor in serum of patients with dementia (Alzheimer type)., *J.Alzheimer.Dis.* 323.
210. Stephani, U., A. Sutter and A. Zimmermann, 1987, Nerve growth factor (NGF) in serum: evaluation of serum NGF levels with a sensitive bioassay employing embryonic sensory neurons., *J.Neurosci.Res.* 17, 25.
211. Stoessl, A.J., 1999, Etiology of Parkinson's disease., *Can.J Neurol Sci* 26 Suppl 2:S5-12., S5.
212. Suda, K., Y.A. Barde and H. Thoenen, 1978, Nerve growth factor in mouse and rat serum: correlation between bioassay and radioimmunoassay determinations., *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 75, 4042.
213. Tam, S., M. Tsai, M. Yamaguchi, K. Yano, J. Butterfield and S. Galli, 1997, Expression of functional TrkA receptor tyrosine kinase in the HMC-1 human mast cell line and in human mast cells., *Proc Natl Acad Sci* 90, 1807.
214. Thatte, U. and S. Dahanukar, 1997, Apoptosis: clinical relevance and pharmacological manipulation., *Drugs* 54, 511.
215. Tibbling, G., H. Link and S. Ohman, 1977, Principles of albumin and IgG analyses in neurological diseases., *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 37, 385.
216. Toma, J., D. Rogers, D. Senger, R. Campenot and F. Miller, 1997, Spatial regulation of neuronal gene expression in response to nerve growth factor, *Dev.Biol.* 184, 1.
217. Torres-Aleman, I. 2001, Serum growth factors and neuroprotective surveillance.*Mol. Neurobiol.*21, 153.
218. Tong, L., T. Toliver-Kinsky, G. Tagliatela, K. Werrbach-Perez, T. Wood and J.R. Perez-Polo, 1998, Signal transduction in neuronal death., *J.Neurochem.* 71, 447.
219. Torcia, M., L. Bracci-Laudiero, M. Lucibello, L. Nencioni, D. Labardi, A. Rubartelli, F. Cozzolino, L. Aloe and E. Garaci, 1996, Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes., *Cell* 85, 345.
220. Touzeau, G. and A. Kato, 1983, Effects of amyotrophic lateral sclerosis sera on cultured cholinergic neurons., *Neurobiol.* 33, 317.

221. Ungerstedt, U. and G. Arbuthnott, 1970, Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system., *Brain Res.* 24, 485.
222. Vantini, G., N. Schiavo, A. Di Martino, P. Polato, C. Triban, L. Callegaro, G. Toffalo and A. Leon, 1989, Evidence for a physiological role of nerve growth factor in the central nervous system of neonatal rats., *Neuron* 3, 267.
223. Varon, S., J. Nomura, J.R. Perez-Polo and E.M. Shooter, 1972, The isolation and assay of the nerve growth factor proteins., in: *Methods in Neurochemistry.*, ed. R. Fried (H.Dekker Inc., New York) p. 203.
224. Vela, L., G. Linazasoro and J. Obeso, 1997, Inicio del tratamiento de la enfermedad de Parkinson, en: *Tratado sobre la enfermedad de Parkinson*, eds. J. Obeso, E. Tolosa and F. Grandas (Luzán 5, SA de Ediciones Lab. DU PONT Pharma, Madrid) p. 255.
225. Venero, J.L., F. Hefti and B. Knusel, 1996, Trophic effect of exogenous nerve growth factor on rat striatal cholinergic neurons: comparison between intraparenchymal and intraventricular administration., *Mol.Pharmacol.* 49, 303.
226. Walton, M., C. Henderson, S. Mason-Parker, P. Lawlor, W.C. Abraham, D. Bilkey and M. Dragunow, 1999, Immediate early gene transcription and synaptic modulation., *J Neurosci Res* 58, 96.
227. Weskamp, G. and U. Otten, 1987, An enzyme-linked immunoassay for nerve growth factor (NGF): A tool for studying regulatory mechanism involved in NGF production in brain and in peripheral tissues., *J.Neurochem.* 48, 1779.
228. Whittemore, S.R., T. Ebendal, L. Lärkfors, L. Olson, A. Seiger, I. Stromberg and H. Persson, 1986, Developmental and regional expression of β nerve growth factor messenger RNA and protein in the rat central nervous system., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 83, 9231.
229. Whittemore, S.R., P.L. Friedman, D. Larhammar, H. Persson and M. Gonzalez-Carbajal, 1988, Rat β -nerve growth factor sequence and site of synthesis in the adult hippocampus., *J.Neurosci.Res.* 20, 403.
230. Windisch, M., B. Hutter-Paier and A. Gschanes, 1999, The usefulness of neurotrophic factors for treatment of Alzheimer disease., *Ann.Psychiat.* 7, 171.
231. Winkler, C., D. Kirik, A. Bjorklund and S. Dunnett, 2000, Transplantation in the rat model of Parkinson's disease: ectopic versus homotopic graft placement, *Prog.Brain Res* 127, 233.
232. Wyman, T., D. Rohrer, P. Kirigiti, H. Nichols, K. Pilcher, G. Nilaver and C. Machida, 1999, Promoter-activated expression of nerve growth factor for treatment of neurodegenerative diseases., *Gene Ther.* 6, 1648.
233. Yanagisawa, N., 2000, A prospect of treatment for Parkinson's disease in the 21st century, *Nippon.Rinsho.* 58, 1968.

234. Yankner, B., A. Caceres and L. Duffy, 1990, Nerve growth factor potentiates the neurotoxicity of β amyloid, Proc Natl Acad Sci 87, 9020.
235. ZonaMedica. Atlas de Neurología. 2000. 12-14-2001. www.zonamedica.com.ar. Internet Communication.
236. Zurn, A., J. Tseng, N. Deglon, J. Joseph and P. Aebischer, 1998, A gene therapy approach for the treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Parkinson's disease, Adv.Pharm. 42, 929.

AUTOBIBLIOGRAFIA

I. Artículos donde se han divulgado los resultados de la tesis.

1. **L Lorigados**, S Soderstrom and T Ebendal. Two-site enzyme immunoassay for β -NGF applied to human patient sera. *J Neurosci Res* 32:329-339, 1992.
2. K. de la Cuétara, JC. García, **L Lorigados**, O. Castellano, ME. González, M. McPherson. Biological activity assay to detect nerve growth factor. *Advances in Modern Biotechnology* 1(1):20,1992.
3. JC García, **L.Lorigados**, N. Pavón, L. Alvarez, TL. Perry. Functional study of blood brain barrier in neurotransplanted patients. *J, Neural Transpl and Plasticity* 3(4):180,1992.
4. **L Lorigados**, H Molina, T Serrano, N Pavón, MA Robinson, L Alvarez, S Soderstrom, T Ebendal. Evolutive levels of NGF in neurodegenerative disorders. *Mol Chem Neuropathol* 24:231-235, 1995.
5. **L Lorigados**, P Alvarez, N Pavón, T Serrano, L Blanco, R Macias. NGF in experimental models of Parkison's disease. *Mol Chem Neuropathol* 28:225-228, 1996.
6. T Serrano, **L Lorigados**, S Armenteros. Nerve growth factor levels in normal human sera. *NeuroReport* 8:179-181,1996.
7. **L Lorigados**, T serrano, CI Fernández, N Pavón, J Bregado, K de la Cuétara, P Alvarez. NGF levels in experimental models of aging. *Alzheimer's Disease Review* 3:106-108, 1998.
8. **L Lorigados**, N Pavón, T Serrano, MA Robinson. Factor de crecimiento nervioso y enfermedades neurológicas. *Rev Neurol* 26:744-748, 1998.
9. T Serrano, MA Robinson, **L Lorigados**, I Díaz-Armesto, ME González, A Dorta. Factor de crecimiento nervioso endógeno en pacientes con enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol* 32:825-828, 2001.
10. **L Lorigados**, N Pavón, T Serrano, MA Robinson, CI Fernández, P Alvarez. Cambios en los niveles de factor de crecimiento nervioso con el envejecimiento y el tratamiento neurotrófico e primates no humanos. *Rev Neurol* 33:417-421, 2001.
11. N Pavón, R Macías, L Blanco, L Alvarez, L Martinez, L Castillo, K de la Cuétara, C Diaz, **L Lorigados**, Y Coro, A García, JC Rosillo. Efectos del trasplante simultáneo de células y mesencefálicas fetales en el estriado y el núcleo subtalámico de ratas hemiparkinsonianas. *Rev Neurol* 34:917-923, 2002
12. **L Lorigados**, N Pavón, L Alvarez, A McRae, T Serrano, L Blanco, R Macias. NGF levels in Parkison's patients and experimental models of parkinsonism. *Brain Res* , 952:122-127, 2002.

II. Artículos del autor relacionados con el tema de la tesis.

1. N. Pavón, **L. Lorigados**, L. Suárez, J. Muñoz, C. González, C. Cruz, H. Molina. T-cells subsets in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with Parkinson's disease. *J Neural Transpl and Plasticity* 3(4):206,1992.
2. H. Molina, R. Quiñones, L. Alvarez, J. Piedra, O. Hernández, O. Lastra, O. Torres, I. Ortega, M.Rachid, JC. García, M. León, **L. Lorigados**, T. Perry, JL. Muñoz, R. Macías, MJ. Rojas. Transplantation of human fetal mesencephalic tissue in caudate nucleus as treatment for Parkinson's disease: Long term follow up. *J Neural Transpl and Plasticity* 3(4):323,1992.
3. H. Molina, R. Quiñones, L. Alvarez, I. Ortega, JL. Muñoz, C. González, K. De la Cuétara, O. Torres, C. Suárez, M. León, MJ. Rojas, M. Rachid, R. Macías, JC. García, N. Pavón, **L. Lorigados**, O. Castellanos, O. Hernández. Stereotactic transplantation of

- foetal ventral mesencephalic cells: cuban experience from five patient with Idiopathic PD. *J Neurol Transpl and Plasticity* 3(4):338,1992.
4. MA. Robinson, **L. Lorigados**, N. Pavón, RD. Hormilla. Immune system response in Alzheimer's disease. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, supp 4, 1993.
 5. N Pavón, L Vidal, L Blanco, P Alvarez, A Torres, **L Lorigados**, L Alvarez, R Macías. Factores que desencadenan la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas. *Rev Neurol*, 1998
 6. N Pavón, **L Lorigados**, J Muñoz, L Blanco, L Alvarez, H Molina, P Alvarez, L Vidal, A Torres, R Macías. Immunological study in PD patients with intracerebral allografts. *Brain Function, Behaviour, drugs and disease: Neurosciences in the Caribbean. Progress and promise*. Pp 185-190, 2000.
 7. N Pavón, **L Lorigados**, J Muñoz, L Blanco, L Alvarez, H Molina, P Alvarez, L Vidal, A Torres, R Macías. *Neurosciences in the Caribbean* pp185-190, 2000.
 8. MA Robinson, AJ Dorta-Contreras, **L Lorigados**. Eventos inmunológicos en el sistema nervioso central de pacientes con enfermedad de Alzheimer temprana y tardía. *Rev Neurol* 32:901-904, 2001.
 9. R Cruz, W Almaguer, C Diaz, **L Lorigados**, J Bergado. Behavioral and biochemical effects of glutation depletion in the rat brain. *Brain Res Bull.* 55(3) 327-333, 2001.

EVENTOS CIENTIFICOS DONDE HAN SIDO PRESENTADOS LOS RESULTADOS DE ESTE TRABAJO

1. Seguimiento inmunológico de pacientes con Enfermedad de Parkinson neurotrasplantados. III Reunión Ibero-latinoamericana de Neurotrasplante. 1990, Habana, Cuba
2. Detección methods and biological assay of human NGF. INTERMOZG-90. International Conference of Pathophysiology of Nervous System. 1990, Habana, Cuba
3. Neurotrophic activity in homogenate of murine and human placental tissue. International Symposium Biotechnology of Growth Factors: Vascular and Nervous Systems. 1991, Milan, Italia
4. NGF enzyme immunoassay applied to human patients sera. I Congreso Centroamericano y del Caribe, II congreso Nacional. I Jornadas Hispano-Cubanas de Gerontología y Geriatria. 1992, Habana, Cuba.
5. Functional study of blood brain barrier in neurotransplanted patients. IV International Symposium on Neural Transplantation. 1992, USA.

6. T-cells subsets in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with PD. IV International Symposium on Neural Transplantation. 1992, USA.
7. NGF enzyme immunoassay applied to human sera. IV International Symposium on Neural Transplantation. 1992, USA.
8. Immune system response in Alzheimer's disease. World Congress of Gerontology. 1993, Hungria.
9. Immunological study in Parkinson's disease. II International Congress Neuroimmunomodulation. 1993, Italia.
10. Levels of NGF in serum of Parkinson patients after neural graft. V International Symposium on Neural Regeneration. 1993, USA.
11. Evolutive levels of NGF in neurodegenerative disorders. Neurodegenerative disorders. Common Mol. Mechanisms. 1993, Jamaica
12. NGF in experimental models of Parkinson disease. Neurodegenerative disorders. Common Mol. Mechanisms. 1994, Jamaica.
13. Endogenous levels of NGF in hemi-parkinsonian rats and MPTP-treated monkeys. 5th Internatioanl Symposium Neural Transplantation. 1994, Francia.
14. Nerve growth factor and neural transplant. 5th International Symposium Neural Transplantation. 1994, Francia.
15. Comparative study of response in Parkinson's disease with unilateral and bilateral fetal neural allografts. 5th International Symposium Neural Transplantation. 1994, Francia.
16. Chronic and acute infusions of NGF in rats following fimbria-fornix lesion. 5th Internatioanl Symposium Neural Transplantation. 1994, Francia.
17. NGF in sera from AD. Alzheimer Research International Symposium on Alzheimer. 1995, UK.
18. NGF levels in experimental models of aging. Neurodegenerative disorders. Common Mol. Mechanisms. 1997, Jamaica.
19. Molecular biology and pathogenesis of AD. International Workshop on Brain Aging and AD from Molecular to Clinical Approaches. 1997, Cuba
20. Decreased NGF serum levels in PD patients. V International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. 1998, USA.
21. Enzyme immunoassay for NGF applied to normal non-human primate sera. Neurological Restoration. 1999, Cuba.
22. Evolutive study of serum NGF levels during infusion of NGF in non-human primate. Experimental Neurosciences. International Meeting: Neurological Restoration. 1999, Cuba.
23. Immune markers in early and late AD patients. V Latin American Congress of Immunology. 2000, Argentina.
24. Changes in NGF levels in hemiparkinsonian rats with dopaminergic grafts. Neurodegenerative disorders: Common Molecular Mechanisms. 2000, Trinidad y Tobago.
25. Central NGF levels in quinolinic acid lesion rats with trophic suply. International Meeting: Experimental Neurosciences, 2001, Cuba.
26. Niveles centrales de NGF en un modelo experimental de corea de huntington con terapia trófica. Conferencia de Neurología. Stgo de Cuba. 2002.

AGRADECIMIENTOS

Finalmente la autora quiere agradecer a todas las personas que contribuyeron, entre ellas y por orden alfabético están:

Alain, por el apoyo técnico en la obtención de células.

Aracelys, Erick, Guille, por el cuidado de todos los animales que fueron estudiados.

Carmita, por los estudios bioquímicos.

Jorge, por tantas cosas: compañía en cada momento, sabia asesoría, evaluador rápido y certero y lo más importante su valor científico, su paciencia y ecuanimidad.

Juanca, por los estudios morfológicos e inmunohistoquímicos.

Ilen, por dedicar tiempo a mejorar el contenido informático del documento.

Ivette, por los estudios en animales viejos, los tratamientos restaurativos y los estudios conductuales.

Karelys, por la obtención de las células para trasplante en humanos y en animales, por su amistad y por su confianza y apoyo familiar.

Kike, por la disposición de ayudar a acortar las distancias.

Lazarita, por la lectura crítica del documento y los sabios consejos, por la ayuda en la obtención de las células para el trasplante.

Lazaro A, por estar siempre dispuesto a las nuevas ideas, por apoyarlas y hacerlas posible.

Liana, mejor ni hacer la lista de cosas, por todo.

Lily Francys, por su incansable trabajo y ejemplo, por los experimentos de lesión estriatal y de terapia trófica.

Lisette, por los modelos de lesión nigral, por estar siempre al tanto de lo necesario y su meticulosidad ante los estudios.

Lisis, por los estudios morfológicos e inmunohistoquímicos, por su paciencia a toda prueba ante mis charlas.

Macías, por los modelos de lesión nigral, por apoyar cada urgencia, por la revisión del documento y por sus consejos certeros, por empezar juntos en este centro y compartir durante tantos años.

Maria de los A, por los estudios en monos, por soportar cada una de las etapas.

Magalys, por su asistencia quirúrgica.

Margarita, por la lectura paciente y precisa del documento.

Mawy, por su cariño y disposición, por su profesionalidad.

Maylen, por la ayuda a cada problema computacional.

Mi Familia: Carmen, Isabel, Elías.

Nancy, por el trabajo con los modelos de lesión nigral, su evaluación conductual, el trasplante y sobre todo por luchar conmigo por tantos años y compartir no solo el lugar de trabajo sino también su amistad.

Pio, por los estudios en el modelo de lesión nigral y en monos, por su risa contagiosa que ayudo a salir de muchas tensiones.

Rey, por la obtención y purificación del NGF, por los estudios bioquímicos, por sus aportes en la confección del documento, por insistir en que esto podía ser.

Tere, por los estudios en sujetos normales, por ayudar en todo lo que llegaba a sus manos sin necesidad de decirlo, por compartir durante años el mismo laboratorio y por su ánimo.

William, por la ayuda en el modelo de lesión estriatal, la obtención de tejido, los estudios conductuales, la cuidadosa revisión del documento y las oportunas sugerencias.

Yovani, por la lesión nigral y el estudio conductual.

Hay otras personas que si bien no ejecutaron aspectos experimentales o algun trabajo investigativo concreto, aportaron el sustento espiritual de esta tesis, ellos son: *Baby* por su ánimo, *Elsita* por estar al tanto de todo, *Fernan*, por ser un amigo que nunca falla, Jose, por su fidelidad a toda prueba y por acceder a ser un hermano durante tantos años, *Lily* (M. Chacón) por su objetividad y seguridad, *Margarita 1* por poder contar siempre con ella, *Margarita 2* por estar en cada situación difícil mía o de los míos y por acompañarme tanto en el trabajo como en el hogar, *Raquel* por su preocupación y generosidad, *Roberto* por su presencia, su ayuda incondicional y permanente, por ser un amigo que sabemos es parte de la familia.