

**Centro Internacional de Restauración Neurológica
Departamento de Inmunoquímica**

**Efecto de la inactivación de los receptores dopaminérgicos
D₂ y de la manipulación del núcleo subtalámico sobre la
conducta motora en modelos de hemiparkinsonismo en
roedores.**

Tesis para optar al grado científico de Doctor en Ciencias Médicas

AUTOR: Dra. Nancy Pavón Fuentes

TUTOR: Prof. Tit. Lic. Jorge Alberto Bergado Rosado, Dr C

ASESOR: Lic. Rosario Moratalla, Dr C

Ciudad de La Habana
2006

	Págs.
ÍNDICE	
SÍNTESIS	3
RELACIÓN DE ABREVIATURAS	4
INTRODUCCIÓN	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	12
I. Enfermedad de Parkinson	12
II. Ganglios Basales	12
III. Disquinesias inducidas por levodopa.....	25
IV. Trasplante.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS	33
I. Diseño experimental	33
II. Materiales.....	37
III. Método de lesión, tratamiento crónico con L-DOPA y evaluación conductual en modelos experimentales de hemiparkinsonismo diseñados en ratones.....	40
IV. Métodos de lesión y técnicas neurorestaurativas en modelos experimentales diseñados en ratos	46
V. Cuantificación de Factor de Crecimiento de Nervio en suero de ratas con lesión de la vía nigroestriatal y trasplante de células mesencefálicas fetales	51
VI. Obtención, preparación y procesamiento del tejido cerebral de ratas.....	52
VII. Procesamiento Estadístico	55
RESULTADOS.....	57
I. Lesión con 6-OHDA, tratamiento crónico con L-DOPA y evaluación conductual en modelos experimentales de hemiparkinsonismo diseñados en ratones.....	57
II. Tratamiento crónico con L-DOPA en ratones que carecen de receptores dopaminérgicos D ₂ hemiparkinsonizados y evaluación conductual	65
III. Métodos de lesión y técnicas neurorestaurativas en modelos experimentales diseñados en ratos	69
DISCUSIÓN.....	86
I. Lesión con 6-Hidroxidopamina, tratamiento crónico con L-DOPA y evaluación conductual en modelos experimentales de hemiparkinsonismo diseñados en ratones	86
II. Tratamiento crónico con L-DOPA en ratones hemiparkinsonizados que carecen de receptores dopaminérgicos D ₂ y evaluación conductual.....	91
III. Métodos de lesión y técnicas neurorestaurativas en modelos experimentales diseñados en ratos	95
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	108
ANEXOS	110
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
AUTOBIBLIOGRAFÍA	134
AGRADECIMIENTOS	139

SÍNTESIS

El tratamiento actual de la enfermedad de Parkinson (EP) se basa en la utilización de fármacos que intentan compensar el déficit dopaminérgico nigroestriatal. La levodopa constituye el tratamiento sintomático más eficaz, sin embargo, con el uso prolongado de este medicamento aparecen complicaciones motoras como los movimientos involuntarios (disquinesias) y las fluctuaciones en la respuesta motora. Consecuentemente después de 5 años de tratamiento los efectos beneficiosos de la levodopa disminuyen y aparecen complicaciones motoras de difícil tratamiento. Todos estos hechos han contribuido a que el énfasis de las investigaciones fisiopatológicas con intenciones terapéuticas en la EP, se haya centrado en los últimos años en entender el origen de las disquinesias y en buscar nuevas alternativas terapéuticas para la enfermedad. Los propósitos del presente trabajo estuvieron centrados en desarrollar un modelo experimental de parkinsonismo con disquinesias inducidas por levodopa, evaluar la participación de los receptores dopaminérgicos D₂ en el origen de estas, así como, analizar el efecto del trasplante de células dopaminérgicas dentro de algunos núcleos de los ganglios basales, sobre la conducta motora parkinsoniana.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran la participación de cambios que tienen lugar en la actividad de los núcleos de la vía indirecta del circuito motor, en la génesis de las complicaciones motoras asociadas al tratamiento con levodopa en el estado parkinsoniano y en el impacto de la reinervación dopaminérgica del núcleo subtalámico sobre la conducta motora en el modelo experimental de hemiparkinsonismo en ratas. Se describe por primera vez un modelo experimental de disquinesias inducidas por la administración crónica e intermitente de una dosis fija de levodopa en ratones, previamente parkinsonizados por lesión neurotóxica con 6- hidroxidopamina (6-OHDA) y se aportan evidencias sobre la participación decisiva de los receptores dopaminérgicos D₂ en la génesis y fisiopatología de las disquinesias de la porción axial del cuerpo y de las extremidades. Por otra parte, se evidencia que la actividad motora puede ser alterada, no sólo por la inyección unilateral de 6-OHDA en la porción compacta de la sustancia negra; sino que la inyección unilateral de esta neurotoxina en el núcleo subtalámico también induce cambios significativos en la conducta de giro inducida por agonistas dopaminérgicos. Adicionalmente se demuestra, que las células mesencefálicas fetales trasplantadas en el núcleo subtalámico son capaces de sobrevivir y desarrollarse, aunque la reinervación dopaminérgica de este núcleo mediante el trasplante acentuó la asimetría conductual que se registra en la actividad rotatoria inducida tanto por D-anfetamina como por apomorfina.

RELACIÓN DE ABREVIATURAS

6-OHDA: 6-hidroxidopamina	i p: intraperitoneal
ADN: ácido desoxirribonucleico	LCR: líquido cefalorraquídeo
AMPc: monofosfato cíclico de adenosina	L-DOPA: levodopa
AMPA: α -amino.3.hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate	MIA: movimientos involuntarios anormales
ANOVA: análisis de varianza	ML: mediolateral
AP: anteroposterior	MEMD: Medio mínimo esencial modificado por Dulbecco
ARNm: ácido ribonucleico mensajero	MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
ATP: trifosfato de adenosina	NGF: factor de crecimiento nervioso (del inglés: nerve growth factor)
ATV: área tegmental ventral	NMDA: N-metil D-aspartato
DA: dopamina	NPP: núcleo pedúnculo-pontino
DE: desviación estándar	NT: neurotrofina
DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético	NST: núcleo subtalámico
DTT: ditioneitol	Pb: pares de bases
DV: dorsoventral	RCP: reacción en cadena de la polimerasa
EIE: ensayo inmunoenzimático	SDS: sodio dodecilsulfato
EP: enfermedad de Parkinson	SFT: suero fetal de ternera
ESM: error estándar de la media	STF: solución tampón de fosfato
GABA: ácido gamma-aminobutírico	SN: substantia nigra
GB: ganglios basales	SNC: sistema nervioso central
GP: Globus pallidum	SNC: substantia nigra pars compacta
GPI: Globus pallidum (segmento lateral)	SNr: substantia nigra pars reticulata
GPM: Globus pallidum (segmento medial)	St: cuerpo estriado
HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa	TH: tirosina hidroxilasa
HVA: ácido homovanílico	Trk: quinasa tirosínica o quinasa relacionada con la tropomiosina
i m: intramuscular	

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza clínicamente por: temblor durante el reposo, rigidez muscular, disminución en la cantidad de movimientos voluntarios (hipocinesia), así como reducción de la velocidad y amplitud de estos (bradicinesia)[1;2]. Las características anatomopatológicas más prominentes de esta enfermedad son: la degeneración de las células dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* (SNc), la existencia de gliosis y la presencia de cuerpos eosinófilos de inclusión en el citoplasma de las neuronas de la SNc y *locus coeruleus* principalmente[3]. Estos cuerpos eosinofílicos también se han descrito en los núcleos del rafe, cuerpo estriado, globo pálido, núcleos pontinos, olivas inferiores, ganglios simpáticos, corteza cerebral, hipotálamo e incluso en el asta anterior de la médula espinal.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, en la actualidad la EP es considerada como un trastorno del sistema nervioso central (SNC) que afecta a los ganglios basales (GB), término acuñado por el uso para referirse a los núcleos grises de la base del encéfalo[4]. Estos núcleos conforman una unidad compleja que tiene múltiples conexiones aferentes y eferentes con regiones de la corteza cerebral, cerebelo, tálamo motor y varias estructuras subcorticales[5].

La pérdida de neuronas dopaminérgicas conduce a una disminución en la concentración de Dopamina (DA) estriatal, que afecta más al núcleo putamen (el cual está más directamente involucrado con la función motora) que al caudado (que tiene un mayor peso en la función de integración)[5;6].

El tratamiento contemporáneo de la EP se basa en la utilización de fármacos que intentan compensar el déficit dopaminérgico nigroestriatal. En los estadios tempranos de la enfermedad, sus síntomas y signos son en gran medida aliviados por la levodopa (L-DOPA); la cual constituye el tratamiento sintomático más eficaz[7]. Sin embargo, con el uso prolongado de este medicamento aparecen complicaciones motoras como los movimientos involuntarios (disquinesias) y las fluctuaciones en la respuesta motora. Las disquinesias se manifiestan a través de un amplio rango de síntomas motores, que van desde movimientos involuntarios orofaciales hasta movimientos anormales de las extremidades de tipo coreico, bállico (o ambos) y posturas distónicas[3;8;9]. Consecuentemente después de 5 años de tratamiento los efectos beneficiosos de la levodopa disminuyen y aparecen complicaciones motoras de difícil tratamiento[8;10;11].

A pesar de la gran relevancia clínica y alta incidencia de estas complicaciones, en la actualidad se conoce muy poco acerca de los mecanismos moleculares que subyacen en la etiopatogenia de las disquinesias. Esto está relacionado, al menos parcialmente, con la carencia de modelos experimentales, que reproduzcan la gran gama de síntomas motores observados en los pacientes tratados crónicamente con L-

DOPA. La administración crónica de L-DOPA activa cascadas moleculares que incluyen la activación de quinasas dependientes de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), fosforilación de receptores N-metil D-aspartato (NMDA) al glutamato y otras proteínas relacionadas con receptores dopaminérgicos, así como la inducción de genes de respuesta rápida y modificaciones en la expresión de neuropéptidos estriatales[12;13].

El descubrimiento de la neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) ha tenido una significativa trascendencia en los avances obtenidos en la actualidad en la experimentación animal relacionada con la EP. La lesión unilateral de la SNc en animales de experimentación (ratas y ratones), mediante la inyección intracerebral de 6-OHDA, provoca severas afecciones conductuales, como consecuencia de la destrucción casi completa de los cuerpos neuronales de este núcleo, junto con la disminución de la dopamina estriatal. Este paradigma experimental es ampliamente utilizado, pues conduce al desarrollo de disfunciones motoras neurológicas asimétricas, en el hemicuerpo contralateral al hemisferio lesionado dando lugar a ratas hemiparkinsonianas[14-16].

En los últimos años se ha demostrado que la administración crónica de L-DOPA u otros agonistas dopaminérgicos, en ratas hemiparkinsonianas, provoca consistentemente cambios en la respuesta motora similares a las disquinesias[17-19]. Las ratas hemiparkinsonianas tratadas, durante 20 días o más con L-DOPA, exhiben movimientos involuntarios anormales y fluctuaciones motoras (fenómeno conocido como “*wearing off*”) similares a los observados en pacientes parkinsonianos[18;20]. Sin embargo, en estos modelos resulta difícil estudiar la contribución específica que tienen los distintos sistemas de neurotransmisión en la génesis de las disquinesias y aún se desconoce la contribución concreta de los receptores dopaminérgicos D₂ en su aparición en la EP. La posibilidad de disponer, de ratones transgénicos y mutantes que no expresan diferentes tipos de receptores dopaminérgicos, ayudaría a diseñar experimentos de importancia crucial en la comprensión de los mecanismos moleculares de señalización relacionados con el desarrollo y la producción de disquinesias inducidas por L-DOPA.

Todos estos hechos han contribuido a que el énfasis de las investigaciones fisiopatológicas con intenciones terapéuticas, en la EP, se haya centrado en los últimos años en entender el origen de las disquinesias para intentar evitar su aparición o eliminarla en aquellos pacientes que ya la sufren.

De todos los circuitos que forman lazos corteza - ganglios basales – tálamo – corteza, el circuito motor ha sido el que más relevancia ha tenido en la comprensión de la fisiopatología del estado parkinsoniano. Este circuito conecta áreas motoras y somatosensoriales con la región dorsolateral del cuerpo estriado[3]. El cuerpo estriado influye sobre la actividad eferente de los GB por medio de proyecciones “directas” cuerpo estriado – globo pálido medial (Gpm), e “indirectas” cuerpo estriado – globo pálido lateral (Gpl) – núcleo subtalámico (NST). Las neuronas estriatales de proyección, que se encuentran en el origen de cada

una de estas vías, se diferencian por el neuromodulador que poseen y por el tipo de receptor dopaminérgico (D_1 ó D_2) que predominantemente expresan. Las que se encuentran en el origen de la vía directa expresan receptores dopaminérgicos D_1 y utilizan como neuromodulador sustancia P y dinorfina; mientras que las que se encuentran en el origen de la vía indirecta portan receptores D_2 y utilizan como neuromodulador encefalina[3;21;22]. Estas proyecciones directa e indirecta tienen un efecto funcional opuesto sobre los núcleos de salida (GPM/ *Substantia nigra pars reticulata* (SNr)) siendo la directa facilitadora del movimiento y la indirecta inhibidora del movimiento[23].

La relevancia fisiológica de la modulación directa de las neuronas del núcleo subtalámico por neuronas dopaminérgicas de la SNc deviene en un tema polémico, debido al pequeño calibre y baja densidad de los axones dopaminérgicos encontrados en el NST[24]. Numerosos datos obtenidos a partir de estudios anatómicos e inmunocitoquímicos han demostrado la existencia de proyecciones nigro-subtalámicas. Dentro de estos podemos mencionar, la presencia de pequeños procesos varicosos inmunorreactivos a la tirosina hidroxilasa (TH) o dopamina en el NST[25], además se han encontrado células marcadas, empleando técnicas de marcaje retrógrado a partir del NST, tanto en SNc como en el área tegmental ventral[26]. Adicionalmente, estudios que inyectan trazadores anterógrados en SNc, han demostrado la existencia de terminales marcadas en el NST[27;28]. La administración de dopamina incrementa la frecuencia de descarga de las neuronas y reduce el efecto de la estimulación gabaérgica en NST[24]. Estos hallazgos sugieren que la SNc modula directamente la actividad de las neuronas del NST y que la pérdida de la inervación dopaminérgica al NST, puede contribuir a la actividad anormal de las neuronas de este núcleo en la EP.

Los signos cardinales de la EP, derivan de la deficiencia de Dopamina estriatal y constituyen el objeto principal de todas las aproximaciones terapéuticas que existen en la actualidad. En este sentido, además de los tratamientos sustitutivos ya mencionados, el trasplante de células capaces de liberar dopamina dentro de los GB en niveles adecuados constituye una alternativa esperanzadora[29]. Existen importantes evidencias experimentales de que el trasplante dentro del cuerpo estriado denervado, puede restaurar los niveles de neurotransmisión dopaminérgica en el área del implante y revertir algunas de las alteraciones conductuales inducidas por la 6-OHDA[30]. Sin embargo, se ha prestado poca atención a la función que ejerce la inervación dopaminérgica en otros núcleos de los GB, como el *globus pallidum* (GP), la *substantia nigra pars reticulata* y el NST y, consecuentemente, no está totalmente dilucidado el papel neurorestaurador del trasplante extraestriatal.

La deficiencia de dopamina que acompaña a la EP trae una serie de cambios funcionales en los GB que tienen como una de sus características principales el incremento de la actividad neuronal del NST. Teniendo en cuenta que esta hiperactividad de las neuronas del NST representa el cambio funcional más

relevante dentro de los GB, el desarrollo de investigaciones que nos permitan dilucidar el papel de la estimulación dopaminérgica intermitente sobre el funcionamiento de la vía indirecta del circuito motor, así como el efecto de la reinervación dopaminérgica del NST, mediante trasplante, sobre la conducta motora de modelos experimentales de EP; pudieran resultar en nuevas terapias alternativas tanto farmacológicas como quirúrgicas.

HIPÓTESIS

En presencia de una denervación dopaminérgica de los ganglios basales la estimulación intermitente de receptores dopaminérgicos D₂, presentes en las neuronas estriatales que originan la vía indirecta, debe producir sobreestimulación de esta vía, que se traduciría en inhibición de estas neuronas, hiperactividad del globo pálido lateral e inhibición del NST originando, una conducta disquinética. La reinervación dopaminérgica por trasplante neural del núcleo subtalámico, sola o simultáneamente con la del cuerpo estriado, puede resultar en una mejoría de las alteraciones motoras presentes en la enfermedad de Parkinson.

OBJETIVOS GENERALES

1. Evaluar la contribución de los receptores dopaminérgicos D₂ en las disquinesias inducidas por levodopa en un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson.
2. Evaluar el efecto de la denervación dopaminérgica de diversos núcleos de los GB (estriado y NST) en la conducta motora de ratas sanas, y de la reinervación dopaminérgica en un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar un modelo experimental de disquinesias inducidas por levodopa, en ratones con lesión neurotóxica de la *substancia nigra pars compacta* por inyección de 6-OHDA en cuerpo estriado.
2. Determinar si el tratamiento mantenido con levodopa en ratones que carecen de receptores dopaminérgicos D₂ con lesión neurotóxica de la *substancia nigra pars compacta* por inyección de 6-OHDA en cuerpo estriado, es capaz de provocar disquinesias.
3. Evaluar el efecto de la lesión unilateral con 6-OHDA en núcleo subtalámico de ratas, sobre la conducta de giro y las habilidades motoras de las extremidades.
4. Evaluar las modificaciones funcionales y morfológicas provocadas por el trasplante de células dopaminérgicas fetales en el núcleo subtalámico de ratas con lesión neurotóxica de la vía nigroestriatal y los mecanismos responsables de las mismas.

NOVEDAD CIENTÍFICA E IMPORTANCIA TEÓRICA Y PRÁCTICA

Las temáticas abordadas en esta tesis constituyen puntos de análisis y discusión de múltiples grupos de trabajo en el campo de las neurociencias. En la última década se han producido importantes avances en el entendimiento de la fisiopatología de los ganglios basales, la función dopaminérgica y el origen de las disquinesias. El establecimiento de un modelo de disquinesias en ratones normales y ratones que carecen de algún tipo de receptor dopaminérgico (“Knock-out”) permitió hacer inferencias acerca de la contribución diferencial de los distintos receptores dopaminérgicos en la génesis de las disquinesias, que actualmente constituyen la complicación más importante del tratamiento farmacológico de la enfermedad de Parkinson. En este trabajo, se reporta por primera vez en la literatura internacional la caracterización morfológica, conductual y molecular de un modelo de disquinesias en ratones salvajes y en ratones mutantes que carecen del receptor dopaminérgico D₂, lo cual constituye una de sus principales novedades científicas. Adicionalmente, el modelo de disquinesias en ratones da la posibilidad de abordar otras aproximaciones a la etiopatogenia de esta complicación motora a través del estudio de ratones mutantes de otros subtipos de receptores dopaminérgicos, de receptores A_{2a}, de tirosina hidroxilasa, etc.

En el documento aparecen otros resultados novedosos tales como la caracterización conductual de la lesión neurotóxica por 6-OHDA de las terminales dopaminérgicas que llegan al núcleo subtalámico y el efecto de la reinervación dopaminérgica de dicho núcleo por trasplante de células mesencefálicas fetales.

Se conoce que la degeneración progresiva de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra pars compacta* constituye la característica más prominente de la enfermedad de Parkinson. Durante mucho tiempo se ha pensado que la denervación dopaminérgica del cuerpo estriado, secundaria a la lesión de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, está relacionada con los síntomas y signos que caracterizan a la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, se le ha prestado poca atención a la pérdida de innervación dopaminérgica que tiene lugar en otros núcleos de los ganglios basales, después de la muerte de las neuronas nigrales. El conocimiento de la participación de los receptores dopaminérgicos D₂ (abundantes en la vía indirecta) en la génesis de las complicaciones motoras del tratamiento de la enfermedad de Parkinson, así como la repercusión que tiene sobre la conducta motora la denervación dopaminérgica por lesión neurotóxica y la reinervación por células dopaminérgicas fetales, de uno de los núcleos principales de esta vía: el núcleo subtalámico, contribuirá con la búsqueda de alternativas terapéuticas para la enfermedad de Parkinson e implicará un potencial incremento en la calidad de vida de los enfermos, lo cual en estos momentos es un reto importante en la comunidad neurocientífica.

Desde el punto de vista social, la enfermedad de Parkinson, tiene una alta prevalencia entre la población mayor de 65 años. A pesar de los grandes avances en el conocimiento y en el tratamiento de la enfermedad, su pronóstico continúa siendo incierto por la presentación de complicaciones a largo plazo y

por la ausencia de un tratamiento curativo. Las conclusiones de estos estudios amplían los conocimientos acerca de la disfunción de la vía indirecta del circuito motor en la fisiopatología de la enfermedad. Asimismo aportan importantes elementos sobre la participación de receptores dopaminérgicos D₂ en el origen y desarrollo de las disquinesias; así como sobre el efecto de la estimulación dopaminérgica del núcleo subtalámico, estructura clave en esta vía.

El documento está formado por 11 secciones (Introducción, Revisión Bibliografía, Materiales y Método, Resultados, Discusión, Conclusiones, Recomendaciones, Anexos, Referencias Bibliográficas, Autobiografía y Agradecimientos); Consta de 139 páginas, 33 figuras, 7 tablas y 3 anexos.

Los resultados que forman parte de este trabajo han sido publicados en 7 artículos aparecidos en revistas internacionales indexadas y han sido presentados en 39 eventos científicos (nacionales e internacionales).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I. Enfermedad de Parkinson

En 1817 James Parkinson describió de forma detallada la clínica de la enfermedad que más tarde llevaría su nombre[31]. En su ensayo sobre Parálisis Agitante, Parkinson la definió como: “Involuntary tremulous motion, with lessened muscular power, in parts not in action and even when supported; with a propensity to bend the trunk forward, and to pass from a walking to a running pace: the senses and intellects being uninjured” [31]. Si bien con anterioridad a Parkinson varios médicos habían visto casos de “Parálisis Agitante”, fue James Parkinson quien finalmente capturó su esencia y agrupó estos síntomas y signos bajo una entidad nosológica[1;32]. Las contribuciones hechas durante la primera mitad del siglo que siguió a la descripción original de la “Parálisis Agitante” aportaron muy pocos datos adicionales a los descritos por Parkinson. El cuadro cambiaría gracias a las contribuciones de los neurólogos franceses, especialmente Trousseau, Charcot y sus discípulos. Trousseau contribuyó a la descripción clínica de la enfermedad con su concepto de la rigidez muscular; definió la bradicinesia y llamó la atención sobre el deterioro intelectual y la pérdida de memoria cuando la enfermedad avanzaba[32-34]. Charcot, más tarde, amplió la descripción clínica diferenciando el temblor parkinsoniano del temblor intencional, describió la postura característica, la tendencia a la propulsión y retropulsión, la pérdida del equilibrio y la micrografía del paciente parkinsoniano[32;35].

A principios del siglo XX, los estudios neuropatológicos de la EP se centraron esencialmente en las lesiones de los núcleos grises de la base de los hemisferios cerebrales y particularmente en el globo pálido[36-39]. La participación crucial de la SN en la patología de la EP fue demostrada por Tretiakoff en 1919, aunque fue propuesta por primera vez por Brissaud en 1895[1;40]. Estos hallazgos fueron confirmados posteriormente por otros trabajos, que además precisaron la afectación predominante de la zona compacta dentro de la SN[41-44].

II. Ganglios Basales

Funcionamiento normal

Los ganglios basales fueron descritos hace ya siglos. La primera documentación de la que se dispone son las láminas anatómicas grabadas en cobre en el año 1552 por Bartolomeo Eustachio, y están constituidos por un grupo de núcleos grises situados en la base de los hemisferios cerebrales, en la región ventral del diencefalo, alrededor del tálamo e hipotálamo[4]. Estas estructuras en mamíferos, aves y reptiles son muy similares en conexiones y neurotransmisores, lo cual sugiere que la evolución de los ganglios basales en amniotas ha sido muy conservadora. Morfológicamente se incluyen bajo esta denominación los núcleos: caudado, lenticular [putamen y *globus pallidum* (porción medial y porción lateral)], claustro o antemuro y

el cuerpo amigdalino. El cuerpo amigdalino representa la parte más antigua de los núcleos de la base y se considera parte integrante del Sistema Límbico. Por otro lado, siguiendo un criterio macroscópico el Comité Internacional de Nomenclatura Anatómica denomina cuerpo estriado al conjunto de núcleos formado por el caudado y el putamen[2;45]. Dada las características de este trabajo nosotros trataremos en detalle las estructuras de los núcleos grises de la base más relacionadas con el control motor e incluiremos, bajo esta denominación, todas aquellas estructuras que sin ser consideradas anatómicamente núcleos de la base se encuentren funcionalmente relacionadas con dichos núcleos. Así desde un punto de vista funcional, forman parte de este conjunto de núcleos grises: el cuerpo estriado (St) (caudado y putamen), el *globus pallidum* (segmento lateral (GPl) y un segmento medial (GPm)), el núcleo subtalámico (NST) y la *substantia nigra* (SN) [*pars reticulata* (SNr) y *pars compacta* (SNc)][4].

Debido a los avances significativos en la comprensión anatómica, fisiológica y farmacológica de estas estructuras, los conceptos sobre la organización de los ganglios basales han sufrido profundos cambios en las dos últimas décadas. Actualmente se considera que:

Las conexiones de los ganglios basales forman parte de un sistema distributivo córtico-subcortical que incluye: áreas de cortezas (motora, sensitiva y asociativas); y el sistema límbico, organizado anatómicamente y funcionalmente en paralelo[5;46].

Funcionalmente, los ganglios basales mantienen segregadas las distintas modalidades sensoriales que procesan; poseen una organización somatotópica en los componentes sensorimotrices, donde la organización de los movimientos predomina sobre la representación de músculos o segmentos corporales[5;47].

La disposición en paralelo de los GB, con respecto a la vía piramidal, supone una actividad reguladora compleja de estos sobre la actividad motora primaria, lo cual explica que las enfermedades que afectan a estas estructuras no provoquen trastornos de tipo paralítico[3].

Se han descrito cinco circuitos “corteza – ganglios basales – tálamo - corteza”, que representan una vía a través de la cual la información proveniente de áreas específicas de corteza es retornada a algunas de estas mismas áreas después de un procesamiento intermedio entre los GB y el tálamo. Estos circuitos funcionan en paralelo y desempeñan un importante papel en las funciones esqueleto-motoras, oculomotoras, cognitivas y límbicas. Cada uno de ellos es el sustrato neural de funciones diferentes[3;26;46;48-51]:

1. El circuito motor es esencial en la programación, iniciación y ejecución del movimiento.
2. El circuito oculomotor tiene un papel comparable al anterior para los movimientos oculares.
3. El circuito prefrontal-dorsolateral forma parte del sistema cognitivo implicado en los procesos de la memoria espacial.

4. El circuito órbito-frontal-lateral forma parte del sistema cognitivo implicado en los procesos de la adaptación conductual.
5. El circuito límbico forma parte del sustrato anátomo-funcional implicado en el procesamiento de las motivaciones, las emociones y los sentimientos afectivos.

Las conexiones “corteza – ganglios basales – tálamo - corteza”, que forman el circuito motor son las más relevantes en la fisiología del movimiento y en la fisiopatología de los trastornos motores[3]. Por esta razón será el que desarrollaremos con más detalle en este trabajo.

El circuito motor une áreas motoras pre-centrales (área 4, 6 de Brodmann y área motora suplementaria) y áreas sensitivas post-centrales (áreas 1, 2, 3a-b) con la región sensorimotora del cuerpo estriado (porción dorsolateral del núcleo putamen). Incluye, además, las porciones posterolateral y ventral del GPm y GPI, la región dorsolateral del NST y los núcleos talámicos: ventral anterior y ventral lateral. Finalmente, el flujo de información desde los GB está dirigido (a través del tálamo) directa o indirectamente hacia cada una de las siguientes áreas: la corteza premotora, el área motora suplementaria y el área cingulada dorsal[52;53]. Se ha demostrado un alto grado de especificidad neuronal y organización somatotópica en todos los núcleos de los ganglios basales[50;54].

El cuerpo estriado, entre los ganglios basales, es el núcleo integrador y principal receptor de las conexiones más importantes provenientes de la corteza cerebral[21;22;46;55]. Es una estructura histológicamente compleja, formada por diferentes tipos de células nerviosas (entre 5 y 6), pero las neuronas espinosas de mediano tamaño o neuronas de Golgi tipo I, que utilizan como neurotransmisor el ácido gamma-aminobutírico (GABA, neuronas gabaérgicas), representan el 70 % de las neuronas encontradas y son sus principales células de proyección[50;56]. El resto de los tipos neuronales del cuerpo estriado son menos frecuentes e incluyen neuronas gigantes con dendritas largas que utilizan como neurotransmisor la acetilcolina y que funcionan como interneuronas[4;57]. Este núcleo recibe aferencias, fundamentalmente, de todas las áreas de la corteza cerebral y el tálamo (probablemente glutamatérgicas) y de la SNc (dopaminérgicas); y menos abundantes del GP, NST, núcleo dorsal del rafe, *locus coeruleus*, porción basolateral de la amígdala y núcleo pedunculopontino[4;26;50;55;58]. De todas las aferencias estriatales las más importantes son las corticales.

Las proyecciones eferentes del cuerpo estriado son gabaérgicas y están dirigidas, principalmente, a tres blancos: GPI, GPm y SNr (proyecciones estriato-palidales y estriato-nigrales)[22;59;60]. Según el modelo actual, dentro de los ganglios basales el circuito motor está dividido en dos sistemas de proyección estriopalidales (vía “directa” y vía “indirecta”) con origen en diferentes subpoblaciones de neuronas estriatales y terminación en los núcleos de salida (GPm y SNr) a través de diferentes rutas[21]. Experimentos realizados con métodos de doble marcaje retrógrado indican que cada una de estas proyecciones se originan a partir de grupos neuronales relativamente independientes, que se diferencian

por el neuromodulador que poseen (sustancia P/dinorfina o encefalina) y por el tipo de receptor dopaminérgico (D_1 ó D_2) que predominantemente expresan[3;21;22;59]. Áreas específicas del GPm y la SNr, que reciben aferencias provenientes de las áreas motoras: del putamen, del GPI y del NST, constituyen los componentes de salida del circuito motor de los GB, cuyas proyecciones gabaérgicas ejercen un efecto tónico inhibitorio, sobre sus núcleos diana en el tálamo y el tronco encefálico, en virtud de sus descargas espontáneas de alta frecuencia[22;59;61]. Esta organización constituye el sustrato neuronal del procesamiento en paralelo de diferentes funciones.

El circuito directo hacia los núcleos de salida es monosináptico. Está formado por neuronas eferentes estriatales que portan receptores dopaminérgicos de la familia D_1 y utilizan como neurotransmisor GABA, sustancia P y dinorfina[3;46]. El circuito indirecto, en cambio, termina en el GPm y en la SNr a través de una secuencia de conexiones que involucran al GPI y al NST. Eferencias inhibitorias de neuronas estriatales que expresan receptores dopaminérgicos de la familia D_2 y utilizan como neurotransmisor GABA y encefalinas llegan al GPI, y este último envía proyecciones inhibitorias gabaérgicas al NST. Finalmente el NST envía a los núcleos de salida (GPm y SNr) una proyección excitatoria, probablemente glutamatérgica[3;5;46;62].

A partir de los datos fisiológicos con que se contaba, a finales de los años 80 se definió un modelo fisiopatológico de los GB, basado en el estudio neuroquímico y neurofisiológico de animales en quienes se provocaron bloqueos reversibles o lesiones de los diferentes núcleos. El modelo, propugnado originalmente por Young y Penny, revisado por Albin, Penny y Young a partir de sus trabajos en rata[21] y por Crossman y cols., y De Long y cols., en el mono[48;63], propone un esquema anátomo-funcional basado en la existencia de los circuitos directo e indirecto ya descritos (Fig. 1).

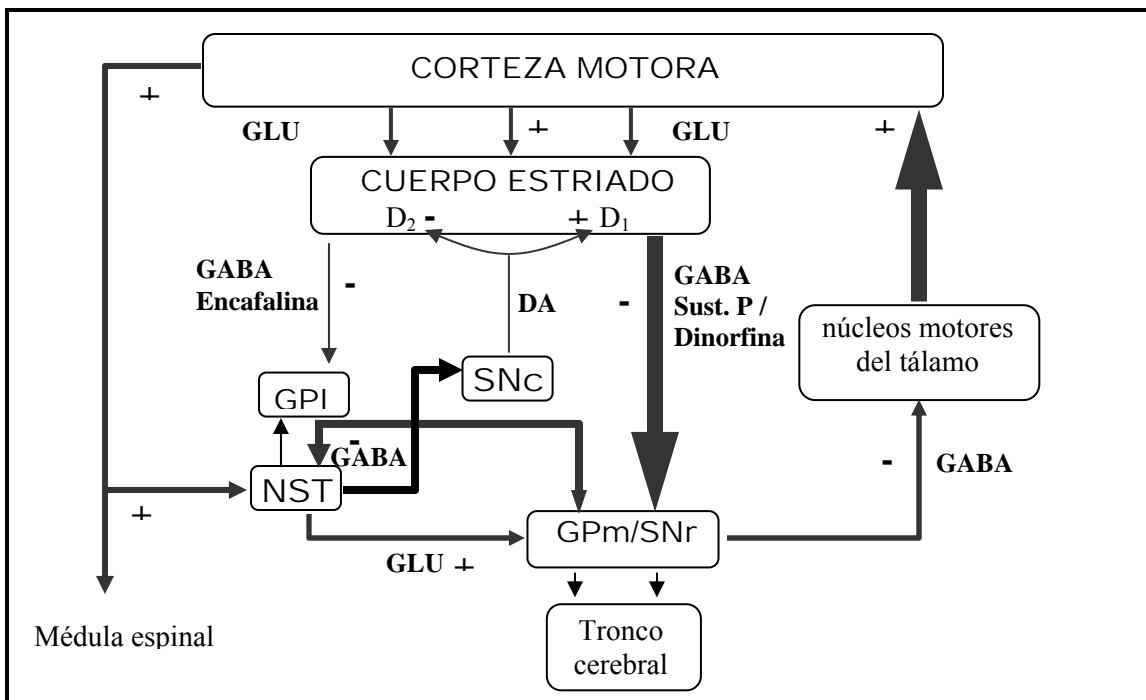


Figura 1. Diagrama del funcionamiento normal del circuito motor de los ganglios basales.
 Leyenda : Glu: ácido glutámico, GABA: ácido gamma amino butírico, DA: dopamina, GPm: globo pálido medial, GPI: globo pálido lateral, NST: núcleo subtalámico, SNc: *substantia nigra pars compacta*, SNr: *substantia nigra pars reticulata* . El grosor de las flechas está en relación con la actividad de la conexión, (+) sinápsis excitatorias, (-) sinápsis inhibitorias.

En estado normal la activación del circuito directo, tanto por la liberación de glutamato de aferencias córtico-estriales como por la liberación de DA proveniente de la SNc, resulta en desinhibición de sus blancos talámicos (núcleos ventral anterior y ventral lateral), de los que parten eferencias excitatorias hacia la corteza[3;9;21;26;52;55;64]. El efecto neto de estimulación de la vía “directa” sería, por tanto, la facilitación del movimiento iniciado corticalmente. Por otro lado, la activación del circuito indirecto tiene el efecto de desinhibir al NST. Esto trae como consecuencia un incremento en la inhibición (mediada por GABA) que ejercen el GPm y la SNr sobre sus blancos talámicos y reduce la salida excitatoria tálamo - cortical[3;9;21;26;52;55;64;65]. Por tanto, el aspecto fundamental de la fisiología motora de los GB es que la inhibición neural de los núcleos de salida (GPm, SNr) conduce a una facilitación del movimiento, mientras que el aumento en las descargas neuronales provoca detención o inhibición del mismo.

La DA ejerce un efecto dual sobre las neuronas estriales (excitador sobre la vía directa e inhibitorio sobre la indirecta)[46;66-69]. Esto ha conducido, a que numerosos autores, le adjudiquen una función tónica sobre las dos vías de los ganglios basales, lo cual mantiene inhibidos los núcleos de salida (GPm y SNr) y facilita permanentemente la ejecución de planes motores corticales[22;69;70].

Resulta demasiado sencillo imaginarse que la simple hiper o hipoactividad de estas estructuras decide el patrón de conducta motora, por lo cual al esquema anterior hay que añadir las modificaciones cualitativas por cambios en la frecuencia de descarga y en los patrones de actividad de las neuronas de esas estructuras. Los cambios en la frecuencia de descargas de las unidades constituyen un verdadero código de señales, que posibilitan un alto rango de procesamiento de información.

En los últimos años, aparecen en la literatura una gran cantidad de datos que avalan el papel de los ganglios basales en la ejecución secuencial de los movimientos, más que en su iniciación[22;61;69;70]. Puede considerarse que la función esencial de los GB es contribuir a la selección y ejecución de los programas motores, adecuando los parámetros del movimiento, suprimiendo la actividad muscular innecesaria y proporcionando el orden temporal que sustenta la concatenación de secuencias motoras, permitiendo su realización con escasa o nula concentración voluntaria, es decir, en forma automática[64;71].

Sistemas Dopaminérgicos del Cerebro Medio

Las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio están distribuidas de manera continua a través de varias estructuras. Este sistema dopaminérgico está formado, principalmente, por tres grupos de neuronas pertenecientes a las áreas A8, A9 y A10 descritas originalmente por Dahlström y Fuxe[72]. El grupo A8 corresponde al área retrorrubral, mientras que los grupos A9 y A10 designan a la *pars compacta de la SN* y al área tegmental ventral (ATV), respectivamente[73].

La SN fue identificada en cerebro de humanos, en 1786 por Vicq d'Azir, como una colección de células pigmentadas ubicadas dorsalmente al pedúnculo cerebral, y recibió el nombre de "*Locus Níger crurum cerebri*"[74]. Posteriormente, la SN fue rápidamente identificada por varios pioneros de las neurociencias como una masa de células ubicada como emparedado entre el pedúnculo cerebral y el lemnisco medial[75-77]. Sin embargo, las proyecciones de esta área y de la SNc en particular fueron más difíciles de identificar.

La existencia de una vía nigroestriatal fue predicha en la literatura neuropatológica sobre la base de la degeneración retrógrada de las células dopaminérgicas de la SN, después de lesiones telencefálicas extensas que involucraban corteza cerebral y cuerpo estriado[78]. En 1970, Moore aportó los elementos que permitieron la primera demostración de que las neuronas del cuerpo estriado degeneraban, en el cerebro de gato, después de una lesión en la región tegmental ventral del cerebro medio[79]. La identificación del sistema de fibras nigroestriatales, estuvo inexorablemente ligada a la disminución de DA en cuerpo estriado y SN encontrada, por Ehringer y Hornykiewicz en 1960, en cerebro post-mortem de pacientes parkinsonianos[80;81], y fue definitivamente probada a través de estudios que combinaban la

identificación, por inmunohistoquímica, de células que expresaban tirosina hidroxilasa (TH+) y marcaje retrógrado de células de la SNc después de la inyección de enzima peroxidasa de rábano picante en el cuerpo estriado[82].

El cuerpo estriado es el principal blanco fisiológico de la inervación dopaminérgica; a él llegan proyecciones neuronales provenientes de todos los grupos de células dopaminérgicas del cerebro medio[83]. Los axones nigroestriatales se corresponden con fibras relativamente finas, que viajan a través de grandes distancias dentro del cuerpo estriado y luego establecen múltiples contactos sinápticos con las neuronas de esta estructura[83].

Además del cuerpo estriado, otras estructuras de los GB como: el GPI, GPM, la SNr y el NST también reciben aferencias dopaminérgicas significativas a partir de las neuronas de la SNc y el ATV[27;83-87]. En los últimos años ha aumentado el número de evidencias que muestran que el sistema dopaminérgico nigroestriatal ejerce su función no sólo a través de la liberación de DA en las terminales axónicas de la unidad caudado-putamen; sino también a través de conexiones con otros núcleos de los GB. Se ha demostrado que la liberación de DA en la SNr a partir de las dendritas de la SNc, y en el GPI, GPM y NST de proyecciones eferentes provenientes de esta, puede jugar un papel importante en la regulación de los núcleos de salida de los GB[27;83-92].

Receptores Dopaminérgicos

La acción fisiológica de la DA (tanto neurotransmisora como neuromoduladora) es mediada por al menos cinco subtipos diferentes de receptores, que tienen siete dominios transmembrana hidrofóbicos; representan el prototipo de receptores acoplados a proteína G y pueden ser clasificados, atendiendo al alto grado de homología en las secuencias transmembrana observada entre ellos como: receptores de la familia D₁ (receptores D₁ y D₅) y receptores de la familia D₂ (receptores D₂, D₃ y D₄)[83;93-95]. La primera identificación de subtipos de receptores dopaminérgicos fue hecha por Spano y colaboradores en 1978[96]. En ese momento los subtipos de receptores fueron clasificados en: D₁ y D₂, sobre la base de su capacidad para estimular o inhibir la actividad de la adenilato ciclasa[97]. Con la introducción de la metodología de clonaje de genes, a principios de la década de 1990, se lograron identificar tres nuevos subtipos: D₃, D₄ y D₅[95;98] (Tabla. 1).

La función de los receptores D₁, D₂ y D₃ ha sido caracterizada en estudios conductuales y bioquímicos. Sin embargo, la carencia de compuestos con alta selectividad para los receptores D₄ y D₅ ha dificultado enormemente su caracterización fisiológica hasta el momento[83].

Los receptores D₁ se caracterizan por su actividad estimuladora sobre la adenilato ciclasa[83;95;99;100]. Están ampliamente distribuidos en todo el Sistema Nervioso Central (Tabla 1) y se les han atribuido numerosas funciones psicomotoras[83;100-102].

La activación de receptores D₁ tiene poco efecto sobre la conducta locomotora, sin embargo, a estos receptores se les ha atribuido un papel en el control del movimiento en relación con los receptores D₂, ya sea por la acción sinérgica entre estos receptores o por la sensibilización de los receptores D₁[100].

Tabla 1. Propiedades de los subtipos de receptores dopaminérgicos.

	Subtipo de Receptores				
	Familia D ₁		Familia D ₂		
	D ₁	D ₅	D _{2S} / D _{2L}	D ₃	D ₄
amino ácidos (humano)	446	477	415/445	400	387
Cromosoma	5	4	11	3	11
Segundo mensajero	AMPC/ fosfatidil inositol	AMPC	AMPC	AMPC	AMPC
Distribución de ARNm (Conc. altas)	Cuerpo estriado, SNr, GPM, núcleo <i>accumbens</i>	Hipotálamo, Cuerpo estriado, núcleo <i>accumbens</i> y Bulbo olfatorio.	Cuerpo estriado, núcleo <i>accumbens</i>	Regiones mesolímbicas con inervación dopaminérgica	Corteza parietal y frontal
Conc. moderadas	Algunas áreas de Corteza, Bulbo olfatorio, Amígdala, NST, etc.	Hipocampo,	Cuerpo estriado, núcleo <i>accumbens</i> , Tubérculo olfatorio	Tubérculo olfatorio, Hipotálamo, núcleo <i>accumbens</i>	Cuerpo estriado, SNc, núcleo <i>accumbens</i> e hipocampo

Los receptores D₂ fueron los primeros receptores dopaminérgicos clonados[103]. La isoforma corta se expresa fundamentalmente sobre los cuerpos y axones de células dopaminérgicas ubicadas en estructuras mesencefálicas e hipotalámicas; mientras que la isoforma larga, está predominantemente expresada sobre terminales post-sinápticas de neuronas del cuerpo estriado y núcleo *accumbens*[104]. Estos receptores se caracterizan por inhibir la actividad de la adenilato ciclasa, también activan canales de potasio, estimulan a la fosfolipasa A₂ y afectan a los canales de calcio[83;105]. Las concentraciones más altas de este receptor se han identificado en: cuerpo estriado (núcleo caudado y putamen), núcleo *accumbens*, tubérculo olfatorio y bulbo olfatorio. También se han detectado concentraciones entre moderadas y alta de estos receptores en otras estructuras como: núcleo subtalámico, cuerpos mamilares laterales, habénula lateral, hipocampo, área tegmental ventral, SNc y SNr, entre otras,[101;102;106].

Los receptores dopaminérgicos D₃, están codificados por genes homólogos al gen del receptor D₂. Su estimulación inhibe la acumulación de AMPc, además inhiben corrientes de calcio y promueven la mitogénesis, probablemente a través de la fosforilación de la tirosina y la activación de proteínas quinasas con acción mitógena[107]. La expresión de receptores D₃ en el cerebro, es en general varias veces menor que la expresión de receptores D₁ o D₂[107].

Los receptores dopaminérgicos D₄ y D₅, como ya señalamos están menos caracterizados. El receptor D₄ exhibe una homología de un 41% y un 39% con los receptores D₂ y D₃, respectivamente. Al igual que los otros receptores de su mismo subgrupo su principal mecanismo de transducción es la inhibición de la adenilato ciclasa[108;109]. Se conoce muy poco acerca del papel fisiológico de estos receptores se plantea que participan en la génesis de la sensibilización conductual y se ha sugerido una vinculación de estos con la esquizofrenia[110;111]. Los niveles de expresión de ARNm de este receptor son más altos en áreas corticales y límbicas que en regiones motoras, lo cual sugiere una vinculación de estos receptores con conductas afectivas y de aprendizaje[100;112-114].

Los receptores D₅ (o D_{1B} en roedores) tienen una alta homología con los receptores D₁, diferenciándose de ellos por tener mayor afinidad para la DA y menor afinidad para los neurolépticos[105]. Presentan capacidad para estimular a la adenilato ciclasa[100;105;115].

El hecho de que en el cuerpo estriado los receptores D₁ y D₂ se expresen en poblaciones estriatales de neuronas de proyección diferentes, que contienen GABA/dinorfina/sustancia P y GABA/encefalina respectivamente, llevó a sugerir que estos receptores podrían modular de forma independiente la actividad de los circuitos directo e indirecto y dar lugar a la expresión de diferentes conductas motoras[116]. Sin embargo, en la actualidad se cuenta con un grupo de evidencias que sugieren que ambos tipos de receptores dopaminérgicos son capaces de mediar conductas motoras similares, cuando existe un tono de DA endógeno que garantice la estimulación de ambos subtipos de receptores. Por otro lado, en ratones *knock-out* de un subtipo de receptor dopaminérgico, únicamente los ratones que no expresan receptores D₂ muestran una inhibición motora que sería equivalente a la bradicinesia de los pacientes con EP, lo cual sugiere que los receptores dopaminérgicos D₂ son los que tienen una función motora, mientras que los otros subtipos de receptores actuarían fundamentalmente como moduladores[116-118].

Bases neurales de las alteraciones motoras en la enfermedad de Parkinson

A partir del conocimiento de que la DA en los ganglios basales se encuentra contenida en las terminales nigroestriatales que degeneran en la EP, creció el interés por el estudio del funcionamiento de los circuitos de los GB en presencia de una pérdida de las neuronas dopaminérgicas.

La degeneración de las neuronas de la SNc afecta los circuitos “directo” e “indirecto” entre el cuerpo estriado y los núcleos eferentes de los ganglios basales (GPM y SNr), de forma diferente[22;59;61;119;120]. Los estudios de actividad neuronal en los GB de primates tratados con MPTP han mostrado un incremento en el promedio de descarga de las neuronas gabaérgicas del GPM y una disminución en el patrón de descarga de las neuronas del GPI[119-121]. Esto hace pensar que la falta de dopamina desequilibra la transmisión glutamatérgica desde las áreas motoras precentrales, dificultando así, el movimiento iniciado corticalmente (Fig. 2).

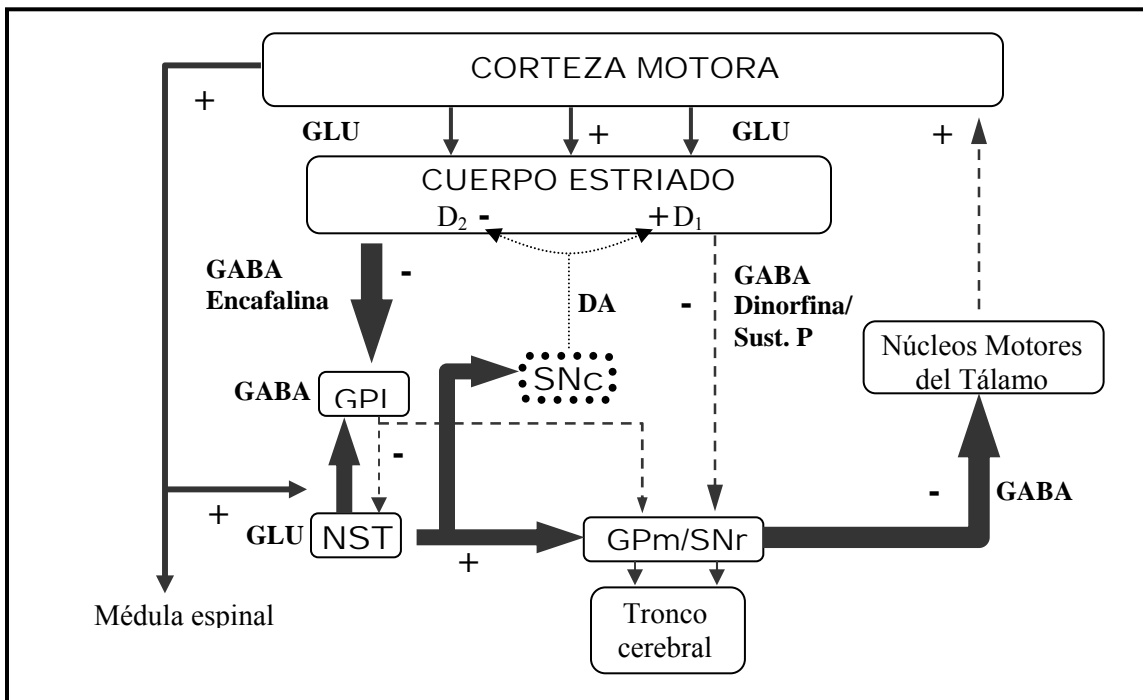


Figura 2. Diagrama del funcionamiento del circuito motor de los ganglios basales en condición parkinsoniana. Leyenda : Glu: ácido glutámico, GABA: ácido gamma amino butírico, DA: dopamina, GPM: globo pálido medial, GPI: globo pálido lateral, NST: núcleo subtalámico, SNc: *substantia nigra pars compacta*, SNr: *substantia nigra pars reticulata* . El grosor de las flechas está en relación con la actividad de la conexión , (+) sinápsis excitatorias,(-) sinápsis inhibitorias.

••••• Degeneración de la vía nigroestriatal ----- Disminución significativa de la transmisión.

En condición parkinsoniana, la vía “directa” disminuye significativamente su actividad; mientras que la proyección al GPI (primera porción de la vía “indirecta”) se encuentra hiperactiva, lo cual provoca una disminución de la actividad inhibitoria del GPI sobre el NST, el GPM y la SNr. Los cambios en la vía “directa” y en los dos brazos de la vía “indirecta” resultan en una hiperactividad de los núcleos eferentes: GPM y SNr y sus proyecciones inhibitorias hacia el Tálamo ventrolateral[3;22;59;121].

De acuerdo con este modelo, la actividad neuronal del GPM/SNr en el parkinsonismo está aumentada, lo cual tiene diversas causas:

- La vía directa (cuerpo estriado-GPm/SNr) está deprimida, por lo cual debido a su carácter inhibitorio (neurotransmisión gabaérgica), los potenciales post-sinápticos inhibitorios que esta vía genera en las neuronas de las porciones correspondientes del GP y la SN, están disminuidos[26;59;120].
- La vía indirecta (cuerpo estriado-GPI-NST-GPm/SNr) tiene incrementada la actividad del cuerpo estriado sobre el GPI, por estar este último innervado por neuronas estriatales portadoras fundamentalmente de receptores D₂, a las que la falta de dopamina les permite incrementar su actividad gabaérgica inhibitoria[26]. El incremento de la aferencia inhibitoria sobre el GPI tiene un grupo de efectos importantes en el funcionamiento de este sistema. El GPI tiene conexiones recíprocas con el GPm de naturaleza gabaérgica y consecuentemente decrece la proporción de potenciales post-sinápticos inhibitorios que se generan por la actividad sináptica de esta vía, lo cual facilita el incremento de las descargas del GPm[26;122;123]. La principal aferencia que recibe el NST proviene del GPI, la cual es también de naturaleza inhibitoria y por tanto al estar deprimida, se produce una considerable disminución del efecto de “frenado” sobre el NST[124-126]. Este último, a su vez, recibe simultáneamente una importante eferencia de origen cortical de carácter excitador, cuyo efecto se hace predominante al provocarse un desbalance a favor de esta última por el mecanismo explicado anteriormente[3;125]. Finalmente, el NST con neuronas predominantemente glutamatérgicas y por tanto, excitadoras, incrementa su actividad sobre los núcleos de salida de los ganglios basales (GPm/SNr)[3;125].

De esta manera se incrementan y modifican los patrones de actividad de los núcleos de salida, con un aumento de sus efectos inhibidores tanto sobre el tálamo motor como sobre el núcleo pedúnculo pontino.

Los cambios en la actividad de los núcleos de salida de los GB observados en el parkinsonismo experimental pueden explicar los signos de la enfermedad por varios mecanismos. El incremento de la salida tónica desde el GPm, reduce la actividad de las neuronas tálamo-corticales; lo cual disminuye la respuesta de las áreas motoras precentrales que están relacionadas con el circuito motor[125]. Además, la disminución de la selectividad dentro de los circuitos de los GB, puede perturbar el procesamiento normal de las aferencias fásicas asociadas con la información propioceptiva y el bloqueo de los movimientos indeseados dentro de los GB.

Los ensayos farmacológicos actuales sobre inhibición de receptores glutamatérgicos AMPA (α -amino.3.hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate) asocian la mejoría en los signos cardinales de la EP a una disminución de la actividad subtalámica sobre el GPm/SNr[2;5]. Estos hechos apoyan la hipótesis de un sistema eferente del GPm/SNr, que a través de relevos talámicos, induce desconexión de programas motores no deseados en el área motora suplementaria (efecto inhibitorio) o la estimulación de la iniciación de programas adecuados en la corteza motora y premotora. Los síntomas y signos de la EP

serían entonces modulables, modificando el nivel de eferencia de los núcleos de salida de los GB y suprimiendo sus patrones de descargas anormales[2;5].

En conclusión, en ausencia de DA se produce un incremento de la actividad del GPM/SNr y de la inhibición talámica. La hiperactividad tónica de estas estructuras impide los cambios a tiempo de programas en el área motora suplementaria, lo cual produce dificultad para iniciar el movimiento o cambiar de actividad. Todo esto explica tanto la pobreza como la lentitud de los movimientos que caracterizan a la EP (hipo-bradicinesia)[60].

Las manifestaciones clínicas de la EP son el prototipo de alteraciones originadas por disfunción de un circuito (córtico-estrio-pálido-tálamo-cortical) sin lesión estructural. En este caso, no hay interrupción definida de este, sino desequilibrio en la neurotransmisión y en los patrones de actividad de las neuronas implicadas en él, secundarias a una lesión estructural a distancia (muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNc)[127]. Si bien las manifestaciones primarias de la EP pueden ser explicadas por las alteraciones funcionales en los circuitos de los GB[128]; no sucede lo mismo con las manifestaciones evolutivas. Estas se deben a alteraciones o cambios morfofuncionales en el propio circuito (modificación de la sensibilidad y densidad de receptores, cambios en la eficacia sináptica, colateralizaciones anómalas, etc.) o en sus proyecciones, con lo cual, el análisis o estudio de los mecanismos generadores de cada manifestación deben estudiarse en momentos evolutivos distintos (estadios iniciales vs avanzados)[128].

Modelos experimentales de enfermedad de Parkinson

El desconocimiento de la etiología de la EP, conjuntamente con la constante búsqueda de alternativas terapéuticas para la enfermedad, ha hecho incuestionable la importancia del uso de la experimentación animal. No se ha constatado parkinsonismo de manera espontánea en animales, si bien se han desarrollado varios modelos experimentales que tratan de simular las características clínicas de la enfermedad. Los modelos en roedores inducidos por: α -methyl-p-tyrosine y reserpina, fueron los primeros modelos experimentales disponibles para la investigación de posibles tratamientos en la EP[129]. La principal desventaja de estos modelos es que inducen un defecto conductual reversible, sin daño específico de la vía nigroestriatal[130]. Además de estos, se han desarrollado otros modelos entre los que se encuentran: los inducidos por rotenona, por MPTP, por 6-OHDA y más recientemente se han desarrollado animales transgénicos y *knock-out*[131;132]. Los modelos obtenidos a partir de la lesión con las neurotoxinas MPTP y 6-OHDA han sido los más usados.

La pro-neurotoxina MPTP, inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, es un compuesto con efectos parkinsogénicos, que se ha convertido en el prototipo de cómo una toxina (endógena o exógena) puede contribuir al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. El mecanismo

por el cual el MPTP provoca la muerte celular es complejo y se destacan diferentes factores: alteración mitocondrial, producción de radicales libres, incremento del calcio intracitoplasmático, excitotoxicidad, apoptosis, etc[133].

La 6-OHDA es un agente neurotóxico que ha sido empleado para el desarrollo de modelos experimentales de EP, especialmente en roedores (ratas y ratones). Desde su descripción original por Ungerstedt y colaboradores[16], el modelo de parkinsonismo en ratas inducido por 6-OHDA, ha constituido una herramienta de incalculable valor en la investigación de la fisiopatología de la denervación dopaminérgica y para la evaluación de nuevas opciones terapéuticas[83;134-138]. La 6-OHDA no atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE) por lo que debe ser inyectada estereotácticamente en el SNC[137]. La acumulación selectiva de esta neurotoxina en las neuronas dopaminérgicas causa la muerte de estas probablemente por estrés oxidativo[139].

La destrucción unilateral masiva de la innervación dopaminérgica, por inyección estereotáctica de 6-OHDA, resulta en un síndrome caracterizado bioquímicamente por depleción casi total de DA en el cuerpo estriado ipsilateral a la SNc lesionada, e hipersensibilidad por denervación, de los receptores dopaminérgicos postsinápticos en el cuerpo estriado ipsilateral a la lesión[83;132;134-138;140;141]. Además, trae como consecuencia un déficit crónico y lateralizado en la conducta de los animales, que incluye asimetría postural, actividad rotatoria espontánea que se ve incrementada con el uso de diferentes agonistas dopaminérgicos e indiferencia sensorimotora a los estímulos aplicados sobre el lado contralateral del cuerpo[132;137].

La lesión unilateral de la vía nigroestriatal puede ser inducida por inyección unilateral estereotáctica de 6-OHDA en el haz nigroestriatal, en la SNc o en el cuerpo estriado. En todos los casos puede alcanzarse una depleción de DA estriatal mayor del 95 %[142]. La asimetría en las concentraciones de DA entre el lado lesionado y el lado no lesionado, se piensa, es la responsable de la conducta rotatoria espontánea en estos animales que se incrementa con el uso de agonistas dopaminérgicos[15;143-145]. La lesión bilateral en ratas con esta neurotoxina provoca severa afagia, adipsia, acinesia e indiferencia sensorimotora bilateral, un síndrome que muchas veces puede causar la muerte del animal y por estas razones no se emplea como modelo habitual[146].

La cuantificación de las rotaciones inducidas por D-anfetamina y apomorfina constituye la prueba conductual más ampliamente usada y mejor caracterizada para evaluar el modelo de EP en ratas, debido a su simplicidad y reproducibilidad[137;147;148]. Un animal se considera completamente lesionado cuando se ha perdido más del 90 % de la dopamina estriatal. La magnitud de la depleción dopaminérgica es estimada a partir del número de rotaciones completas (360°) por minuto, inducidas tanto por D-anfetamina como por apomorfina. Se ha demostrado que cuando la D-anfetamina es capaz de inducir más

de 7 vueltas/minuto y la apomorfina más de 150 vueltas en 45 minutos, existe una denervación nigroestriatal de más del 90 %[15;140].

Otras pruebas que exploran conductas motoras más complejas pueden ser utilizadas para evaluar el modelo, tal es el caso de la prueba que mide habilidades motoras de las extremidades anteriores[149;150]. Esta prueba se emplea para medir el déficit motor presente en las extremidades anteriores de las ratas y nos permite medir de manera independiente y cuantificable el uso de ambas extremidades anteriores para realizar movimientos con un alto nivel de dificultad, que requieren de un aprendizaje previo: recolectar alimentos y llevarlos a la boca.

III. Disquinesias inducidas por levodopa

Los movimientos involuntarios asociados al tratamiento crónico con levodopa representan la complicación principal y la limitación más importante de esta terapia sustitutiva. Están presentes entre un 30% y un 80% de los pacientes parkinsonianos tratados con este agonista[93;151;152]. El término “disquinesia inducida por L-DOPA” se emplea para referirse a movimientos involuntarios, excesivos y no deseados, que aparecen en el paciente con EP asociados al tratamiento con levodopa[6]. Las disquinesias pueden ser divididas en dos patrones diferentes:

- a.) Disquinesias de período “on” o “disquinesias de pico de dosis”: Estas disquinesias están relacionadas con el efecto motor máximo de la medicación y aparecen cuando la concentración de levodopa en el plasma es máxima. Consisten en movimientos de naturaleza coreica principalmente, con predominio en la musculatura del cuello y orolingual cuando son leves, y que afectan a todo el cuerpo cuando son más intensos[9;64;153].
- b.) Disquinesias difásicas: Estas disquinesias se observan antes de que comience el efecto máximo de la medicación y cuando el efecto de la levodopa comienza a decaer. Se caracteriza por movimientos estereotipados que involucran a las extremidades inferiores de manera predominante[9;153].

El mecanismo preciso que subyace en el origen de las disquinesias no es completamente comprendido en la actualidad. Se piensa que el origen de las disquinesias en la EP puede centrarse en dos factores principales: el proceso de muerte neuronal progresivo que tiene lugar en la SNc con el consiguiente déficit dopaminérgico; y el mecanismo de acción de los fármacos dopaminérgicos. Varias consecuencias de la degeneración de la SNc pueden contribuir al origen de las disquinesias. La pérdida de las terminales de DA pre-sinápticas impide la recaptación de DA que, junto a un aumento en su síntesis y liberación por parte de las terminales aún funcionales, puede prolongar y potenciar la acción sináptica de la DA formada a partir de la levodopa exógena[154;155]. Por otro lado, se ha postulado una hipersensibilidad de

receptores dopaminérgicos post-sinápticos, inducida por la denervación, que conllevaría un aumento en el número o un cambio en el estado de afinidad de los receptores; o bien un aumento en el proceso de transducción post-receptorial[156;157].

Las disquinesias inducidas por L-DOPA tienen particularidades especiales desde el punto de vista fisiopatológico, caracterizadas por una hipoactividad en el eje: núcleo subtalámico – núcleos de salida de los GB (GPM y SNr), como base de este fenómeno. Basándose en los trabajos realizados, principalmente por el grupo de Crossman en el modelo de MPTP con disquinesias inducidas por L-DOPA o agonistas dopaminérgicos[63;158;159], es posible predecir que la administración de estos fármacos produciría, a través del circuito directo, una sobreinhibición del GPM/SNr y, a través del circuito indirecto, una disminución de la inhibición gabaérgica sobre el GPI, que quedaría hiperactivo. Este a su vez, inhibiría al NST que disminuiría la excitación sobre el GPM/SNr[9;64;160]. De este modo, tanto por la vía directa como por la indirecta, se produce una disminución de la actividad del GPM y de la SNr que dejan de inhibir a los núcleos ventral anterior y ventral lateral del tálamo, lo cual produce una hiperexcitación de la corteza pre-motora, que daría lugar al movimiento excesivo característico del patrón disquinético (Fig. 3).

Hasta 1998, los estudios sobre tratamiento crónico con L-DOPA, en el modelo de lesión unilateral con 6-OHDA en ratas, se habían concentrado en el análisis de la conducta rotacional inducida por el medicamento. Esta conducta, guarda poca similitud con los movimientos disquinéticos inducidos por el tratamiento con L-DOPA observados en pacientes parkinsonianos[161;162]. En el año 1998, Cenci y colaboradores[18], informan que la inyección repetida de L-DOPA en ratas hemiparkinsonizadas, puede inducir movimientos distónicos y disquinéticos que afectan a la cabeza, el tronco y las extremidades, muy similares a las manifestaciones observadas en pacientes con EP, que incluyen: movimientos bálicos rítmicos de las extremidades, movimientos de torsión del tronco, por contracción de la musculatura axial y movimientos masticatorios vacíos, acompañados en ocasiones de protrusión lingual[12;18;19].

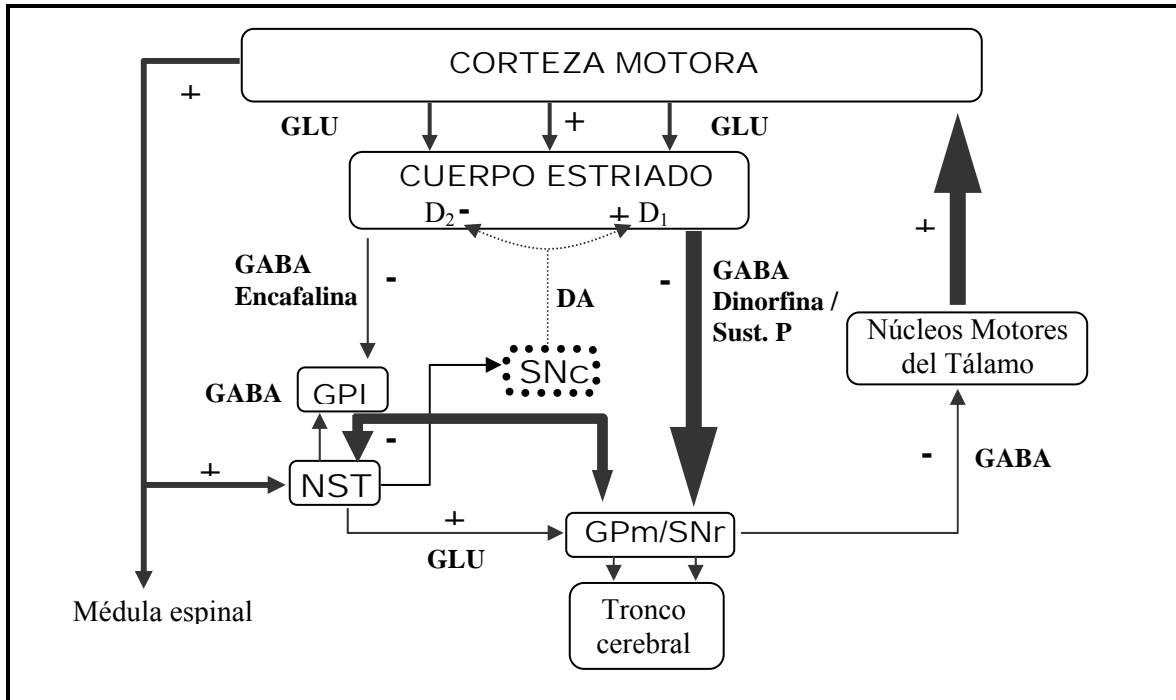


Figura 3. Diagrama del funcionamiento del circuito motor de los ganglios basales en las disquinesias. La característica más importante es hipoactividad del NST y de los núcleos de salida de los ganglios basales. Leyenda : Glu: ácido glutámico, GABA: ácido gamma amino butírico, DA: dopamina, GPm: globo pálido medial, GPI: globo pálido lateral, NST: núcleo subtalámico, SNc: *substantia nigra pars compacta*, SNr: *substantia nigra pars reticulata*. El grosor de las flechas está en relación con la actividad de la conexión. (+) sinápsis excitatorias, (-) sinápsis inhibitorias.

••••• Degeneración de la vía nigroestriatal ----- Disminución significativa de la transmisión.

IV. Trasplante

La práctica del trasplante neural data de más de un siglo, cuando WG Thompson en 1890 publicó su artículo: "Successful Brain Grafting", donde dijo tener éxito al intercambiar grandes piezas de tejido neocortical entre gatos y perros adultos y analizó la supervivencia de estos trasplantes siete semanas después[163]. Años más tarde, en 1917, fue publicado que el tejido nervioso central trasplantado, era capaz de sobrevivir cuando el tejido donante es inmaduro y se estableció que el tejido cortical fetal trasplantado a conejos jóvenes podía mantener algunas de las características de su organización interna[164]. En los años sesenta aparecen algunos reportes sobre intentos exitosos de trasplante, pero no es hasta casi 90 años después del primer intento que aparecen datos que abren la era del trasplante neural para la EP; cuando Björklund y colaboradores demostraron que las neuronas fetales dopaminérgicas de ratas sobrevivían después de un trasplante en un animal adulto[165;166].

El trasplante cerebral como tratamiento para la EP ha sido muy utilizado en los últimos 25 años. Aunque la EP responde adecuadamente al tratamiento farmacológico con levodopa, la mejoría inicial no se mantiene indefinidamente. De modo que la falta de alternativas prácticas de tratamiento en pacientes con estadios avanzados llevó a la realización de trasplantes celulares en un intento de mejorar la calidad de vida de estos pacientes[167].

La médula suprarrenal, fue inicialmente utilizada como fuente de dopamina[168]. Sin embargo, la supervivencia de este tejido es muy limitada cuando no se administra una fuente exógena de factor de crecimiento nervioso[169]. Aunque existen experiencias clínicas con el empleo de tejido proveniente de médula suprarrenal las evidencias experimentales apuntan a que este tipo de tejido no es óptimo para el tratamiento de EP[170].

La otra fuente fundamental de obtención de células para trasplante en EP es el mesencéfalo ventral fetal[171]. En el modelo de 6-OHDA en ratas, ha quedado ampliamente demostrado que las neuronas mesencefálicas ventrales fetales implantadas dentro del estriado denervado sobreviven, se diferencian, extienden sus axones, realizan conexiones sinápticas con el hospedero, secretan DA y disminuyen las rotaciones espontáneas e inducidas por agonistas dopaminérgicos[12;136;172-174]. Se ha señalado que las células fetales tienen mayor viabilidad y potencial para establecer conexiones sinápticas que las células cromafines de la glándula adrenal[135;175;176].

Muchos estudios coinciden en que el cuerpo estriado (caudado-putamen) es el sitio óptimo para localizar el trasplante de tejido con vistas al tratamiento del parkinsonismo[177;178]. No obstante, se sabe que la recuperación inducida por el trasplante es dependiente de la ubicación exacta de este, teniendo en cuenta la organización topográfica de las funciones estriatales. La reinervación del caudado-putamen dorsal produce una disminución de la rotación espontánea e inducida por drogas[144;171;179] en el modelo de lesión por 6-OHDA. Mientras que la reinervación del caudado-putamen ventral y lateral mejora la coordinación sensorimotora así como la respuesta del lado contralateral al trasplante[149;150;180-182]. En el caso de primates y pacientes parkinsonianos la pérdida de la inervación dopaminérgica sobre el putamen parece correlacionar mejor con los signos parkinsonianos, haciendo de este núcleo el blanco principal para el trasplante en humanos[119;167;183].

Se han propuesto dos grupos de mecanismos, independientes pero complementarios, para explicar la mejoría inducida por el trasplante: aquellos relacionados con la viabilidad e integración de las células trasplantadas y aquellos resultantes de una respuesta secundaria de las células estriatales, relacionada con procesos de activación, reparación y modificación de los circuitos de los GB del receptor[29]. A su vez, dentro de estos grupos se han postulado varios mecanismos[136;172;173;176;184]:

1. Descarga y liberación de DA espontánea por las células trasplantadas. El trasplante restaura hasta un 30% de las concentraciones normales de DA.
2. Desarrollo de proyecciones axonales por las células trasplantadas, preferencialmente dentro de las áreas blanco de proyecciones dopaminérgicas. Las neuronas trasplantadas establecen conexiones sinápticas primariamente con espinas dendríticas de las células del estriado hospedero.
3. Liberación de factores tróficos.
4. Han sido identificadas sinapsis de neuronas hospederas sobre células trasplantadas.
5. Otros cambios que se observan dentro del cuerpo estriado son también correlacionados con la efectividad del trasplante: incremento en el patrón de descarga de las neuronas estriatales, retorno a la normalidad de los niveles de encefalinas y receptores D₂, retorno a la normalidad los niveles de actividad colinérgica y gabaérgica, efectos inflamatorios inespecíficos, efectos quirúrgicos, tales como la ruptura de la BHE y los efectos de la lesión en el caudado/putamen.

Por otra parte, existen evidencias electrofisiológicas que apuntan a que el crecimiento de fibras procedentes del trasplante y las conexiones sinápticas que se establecen entre las células trasplantadas y las estriatales hospederas, normalizan la frecuencia de descarga de las células estriatales; que en condiciones de estriado denervado muestran un incremento anormal[185].

Adicionalmente a los mecanismos de acción antes explicados, en la literatura se describen otros mecanismos alternativos. En 1990, el grupo de Bankiewicz demostró la disminución en la conducta de giro en monos hemiparkinsonianos sometidos a trasplante intraestriatal de tejido fetal no dopaminérgico (cerebelo y médula espinal fetal)[186]. Estos autores encontraron además, la existencia de crecimiento de fibras dopaminérgicas no dañadas por MPTP hacia el estriado hospedero, luego de haber practicado una cavidad en este núcleo[187]. Estos hallazgos permitieron a los autores sugerir que factores de crecimiento de nervio liberados en el sitio del implante desde las células hospederas, las células implantadas o los astrocitos reactivos, participan en los mecanismos de recuperación después del trasplante[188].

A pesar de los incuestionables avances obtenidos hasta la fecha, los procedimientos actuales resultan en una reinervación incompleta del estriado(en el orden de 10-40%); junto a una recuperación funcional también incompleta[189]. Estas evidencias han propiciado en los últimos años la introducción de modificaciones a la técnica clásica de trasplante. En 1994, se introduce el microtrasplante para la colocación de las células del tejido mesencefálico ventral fetal en el estriado denervado[190;191]. Esta técnica permite distribuir en un área grande del blanco estriatal múltiples volúmenes de fracción de microlitros ubicados en pequeños depósitos, con un daño tisular mínimo. Entre los resultados más importantes obtenidos con esta técnica se cuentan una menor invasión de macrófagos y gliosis reactiva junto a una reducción significativa del sangramiento y la necrosis. Este elemento facilita la difusión de los nutrientes y la vascularización del trasplante por parte de los vasos sanguíneos del hospedero. El mejoramiento de las condiciones locales en el sitio del implante puede ser particularmente importante durante la fase inicial de crecimiento y proliferación de las neuronas trasplantadas. Al mismo tiempo, se

ha demostrado que el crecimiento de fibras TH+ procedentes del microtrasplante es significativamente mayor que en los procedimientos tradicionales de trasplante, lo cual produce una recuperación de las concentraciones de DA a lo largo de grandes áreas del estriado[191].

En la actualidad, se trabaja intensamente en la búsqueda de otros núcleos, que alternativa o simultáneamente con el estriado, puedan servir de blanco para el trasplante de tejido e induzcan una recuperación funcional cualitativa y cuantitativamente superior al trasplante clásico ubicado sólo en caudado-putamen[30]. Si bien el trasplante dopaminérgico intraestriatal es capaz de reinervar al cuerpo estriado[172;192], es incapaz de restaurar los circuitos nigroestriatales[30], y de inervar otras estructuras como el NST, el GPI, etc[30].

Núcleo Subtalámico

El NST, se localiza en la superficie interna de la porción peduncular de la cápsula interna, inmediatamente por debajo de la región ventrolateral del tálamo, del que queda separado por la zona incerta y el fascículo lenticular. Está formado por una agrupación de neuronas de proyección de mediano tamaño, y escasas interneuronas pequeñas[86]. Su forma es de lente biconvexa, con un eje máximo entre 10 y 15 mm en el humano. Como parte de los GB, tiene un importante papel en el control motor[3;26;86].

La mayor parte de las aferencias que recibe el NST provienen de las neuronas gabaérgicas del GPI, cuya región rostral proyecta principalmente sobre las regiones medial y central de los 2/3 rostrales del NST, mientras que la región central, lo hace sobre el tercio lateral del NST (proyección pálido-subtalámica)[4]. Al igual que el cuerpo estriado, recibe aferencias excitadoras glutamatérgicas, directas y monosinápticas de la corteza ipsilateral, y conexiones contralaterales de tipo oligosinápticas, topográficamente organizadas[125]. Estas aferencias proceden de las áreas precentral, premotora y prefrontal, así como del área motora suplementaria y terminan en la región central y lateral del núcleo[60]. En esta distribución somatotópica de las aferencias, convergen en la misma región del NST, la información proveniente de la corteza motora y del GPI. Además el NST recibe aferencias directas desde el tálamo (complejo nuclear centromediano-parafascicular) y el núcleo pedúnculo-pontino (NPP) desde donde salen eferencias gabaérgicas y colinérgicas al NST[193;194]. Se han señalado aferencias menos importantes desde el núcleo dorsal del rafe, *locus coeruleus* y formación reticular (sistema dopaminérgico incerto-hipotalámico). Por último, se ha descrito, tanto en monos como en ratas, la presencia de aferencias dopaminérgicas en NST provenientes de la SNc[50].

La principal eferencia del NST en primates no humanos y humanos se dirige hacia el GPm, atravesando la porción peduncular de la cápsula interna en dirección ventrolateral[87;195;196]. Varios autores indican que esta proyección, en la rata, emite colaterales hacia SNr (proyecciones subtálamo-nígricas), mientras

que en primates parece que existen diferentes poblaciones celulares que inervan al GPM y a la SNr[50;87;197-199]. Las proyecciones al GPM son unidireccionales, mientras que las eferencias subtalámicas al GPI terminan en regiones de este núcleo que envían proyecciones recíprocas al subtálamo[50;200]. La organización somatotópica de las eferencias del NST tiene gran importancia funcional y es la base anatómica de la asociación de las áreas dorsolaterales del NST con el sistema motor; y del tercio ventromedial con el sistema límbico y óculomotor. Se han descrito conexiones eferentes del NST que van hacia el núcleo dorsal del rafe, *locus coeruleus*, NPP, sustancia gris periacueductal y tálamo ventrolateral[50;201].

Para comprender cómo el NST puede contribuir en la neurodegeneración presente en los GB en la EP, y cómo la restauración de la inervación dopaminérgica a esta estructura, puede resultar en una mejoría importante de los síntomas y signos de dicha enfermedad, es esencial el conocimiento de la existencia de una proyección dopaminérgica entre la SNc y el NST y una proyección recíproca, glutamatérgica, entre el NST y la SNc.

La SNc recibe inervación glutamatérgica proveniente no sólo del NST, sino también del NPP, de la corteza cerebral y de la Amígdala[199;202-205]. Los subtipos de receptores glutamatérgicos presentes en la SNc son primariamente NMDA-R1 y GLuR2 y están preferentemente localizados en su región ventral[206]. Para la mayor parte de las sinapsis glutamatérgicas de la SNc los receptores NMDA median los efectos proveniente del NST y de la corteza cerebral, mientras que los receptores AMPA-Kainato están involucrados en mediar efectos provenientes de eferencias del NPP[207;208].

Una serie de evidencias avalan que el NST ejerce un efecto regulatorio sobre el patrón de descarga de las neuronas de la SNc y, alternativamente, la SNc influye en la actividad del NST. La microestimulación del NST induce una respuesta excitatoria ortodrómica de corta latencia en la SNc que se acompaña de un incremento en la liberación de dopamina[209;210]. Sin embargo, la respuesta individual de las neuronas de la SNc a la estimulación o inhibición del NST no es uniforme. La microinyección tanto de antagonistas como de agonistas gabaérgicos en el NST, inducen respuestas mixtas o bifásicas en la SNc, donde se observan frecuencias de descarga que aumentan en la mitad de las células y disminuyen en la otra mitad[211;212]. En la explicación de este fenómeno se han implicado fibras provenientes de la SNr. De igual manera, existen hallazgos que sugieren la participación del NST como mediador de efectos de origen cortical sobre la SNc[213].

La capacidad de la DA para modular la actividad neuronal en el NST se conoce hace ya algunos años. La administración sistémica de agonistas dopaminérgicos induce un marcado incremento en la utilización de glucosa en el NST, la cual puede ser bloqueada por haloperidol[26;195]. Aunque estos resultados pueden ser explicados por una acción indirecta de la dopamina sobre el cuerpo estriado, más que por un efecto

directo sobre el NST, estudios posteriores que muestran que la aplicación directa de dopamina sobre las neuronas del NST induce un incremento dosis dependiente del rango de descarga de estas (el cual es atenuado por antagonistas dopaminérgicos) avalan la afirmación anterior[26;195;205].

Por otro lado, existen también evidencias de proyecciones dopaminérgicas de la SNc hacia el NST. En estudios publicados en 1966, Hornykiewicz y colaboradores notaron la presencia de ácido homovanílico en el NST de cerebros humanos[81]. Estudios anatómicos en ratas describen la presencia de fibras catecolaminérgicas en el NST que se origina en la SNc[214]. Subsecuentemente, en estudios inmunohistoquímicos, también se ha observado la presencia de neuronas dopaminérgicas las cuales expresan transportador de dopamina, tirosina hidroxilasa y receptores dopaminérgicos D₁, D₂ y D₃[26;215].

La administración de agonistas de receptores D₁ (SKF 38393 y SKF 82958) es capaz de aumentar la descarga de las neuronas en el NST de ratas, efecto este bloqueado por el antagonista D₁ SCH 23390[126;216;217]. La estimulación de receptores D₂ en el NST no altera su patrón de descarga, sin embargo, es capaz de bloquear el aumento en las descargas inducido por agonistas D₁[217]. Todos estos resultados evidencian la existencia de un control dopaminérgico sobre el patrón de descarga de las neuronas del NST.

De lo anteriormente expuesto, es posible concluir que el NST ocupa una ubicación estratégica dentro de la organización funcional de los ganglios basales por varias razones. En primer lugar, es el único núcleo dentro de los ganglios basales formado por neuronas excitadoras glutamatérgicas, lo cual hace que la influencia de sus eferencias, sea cualitativamente diferente a la del resto de los núcleos de los GB. En segundo lugar, recibe de la corteza cerebral una aferencia monosináptica glutamatérgica ipsilateral y aferencias contralaterales de tipo oligosinápticas. Finalmente, este núcleo influye tanto sobre las vías tálamo-corticales (ascendentes) como sobre estructuras del tallo cerebral relacionadas con el control de la musculatura axial y de la marcha (descendentes), lo cual le confiere la propiedad de modificar simultáneamente la actividad cortical, de estructuras diencefálicas y del tallo cerebral.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Diseño experimental

De los objetivos específicos que nos trazamos en este trabajo se derivaron una serie de tareas que aparecen enumeradas a continuación (Fig. 4) en relación con los objetivos:

Tareas vinculadas con los Objetivos:

Objetivo 1: Desarrollar un modelo experimental de disquinesias inducidas por levodopa, en ratones con lesión neurotóxica de la *substantia nigra pars compacta* por 6-OHDA.

Tareas

1.1.- Evaluación de la presencia de movimientos involuntarios anormales asociados al tratamiento crónico con levodopa en ratones con lesión unilateral de la vía nigroestriatal por la inyección de 6-OHDA en cuerpo estriado (de aquí en adelante ratones hemiparkinsonianos).

1.2.- Evaluación de la pérdida de neuronas y terminales dopaminérgicas en la SNc y en el estriado de ratones hemiparkinsonianos, mediante estudios de hibridación *in situ* para tirosina hidroxilasa.

1.3.- Evaluación de la expresión de neuropéptidos: encefalina y dinorfina en el núcleo estriado de ratones hemiparkinsonianos, tratados crónicamente con levodopa, mediante cuantificación de sus respectivos mensajeros con estudios de hibridación *in situ*.

Objetivo 2: Determinar si el tratamiento mantenido con levodopa en ratones hemiparkinsonianos que carecen de receptores dopaminérgicos D₂, es capaz de provocar disquinesias.

Tareas

2.1.- Evaluación de la presencia de movimientos involuntarios anormales asociados al tratamiento crónico con levodopa en ratones hemiparkinsonianos que carecen de receptores dopaminérgicos D₂.

2.2.- Evaluación de la pérdida de neuronas dopaminérgicas y de sus terminales axónicos, en la SNc y el cuerpo estriado de ratones hemiparkinsonianos que carecen de receptores dopaminérgicos D₂, mediante estudios de hibridación *in situ* para tirosina hidroxilasa.

2.3.- Evaluación de la expresión de los genes que codifican los neuropéptidos estriatales: encefalina y dinorfina en el núcleo estriado de ratones hemiparkinsonianos, que carecen de receptores dopaminérgicos D₂, con tratamiento crónico con levodopa, mediante estudios de hibridación *in situ* y compararlos con sus respectivos ratones salvajes.

Grupos a estudiar para dar respuesta a estos objetivos:

- a.) Ratones genotipo salvaje (C57/BL6) hemiparkinsonianos, tratados crónicamente con Levodopa/ Benserazida (n=10).
- b.) Ratones genotipo salvaje (C57/BL6) hemiparkinsonianos, tratados crónicamente con solución salina (n=10).
- c.) Ratones genotipo salvaje (C57/BL6) con falsa lesión, tratados crónicamente con solución salina (n=10).
- d.) Ratones genotipo salvaje-D₂ hemiparkinsonianos, tratados crónicamente con Levodopa/ Benserazida (n=10).
- e.) Ratones mutantes hemiparkinsonianos que carecen de receptores dopaminérgicos D₂ (KO-D₂), tratados crónicamente con Levodopa/ Benserazida (n=10).
- f.) Ratones mutantes que carecen de receptores dopaminérgicos D₂ (KO-D₂) hemiparkinsonianos, tratados crónicamente con solución salina (n=10).

Objetivo 3: Evaluar el efecto de la lesión unilateral con 6-OHDA en núcleo subtalámico de ratas, sobre la conducta de giro y las habilidades motoras de las extremidades anteriores.

Tareas

3.1.- Caracterización del modelo de lesión unilateral completa de la SNc por inyección de 6-OHDA, en dicha estructura, en ratas.

Grupos a estudiar:

- a.) Ratas con lesión completa de la SNc por inyección unilateral de 6-OHDA en dicha estructura, Apo+/Anfe+: En este grupo fueron incluidas las ratas que exhibieron en su conducta rotatoria al menos 630 vueltas completas hacia el lado de la lesión en 90 min. después de la inyección de D-anfetamina y 150 vueltas completas contralateral al lado de la lesión en 45 min. después de la inyección de apomorfina (n=24).
- b.) Ratas con lesión de la SNc por inyección unilateral de 6-OHDA en dicha estructura, Anfe+: Ratas que cumplieron el criterio del número de vueltas completas para la D- anfetamina y no para la apomorfina (n=22).
- c.) Ratas con lesión de la SNc por inyección unilateral de 6-OHDA en dicha estructura, Apo+: Ratas que cumplieron el criterio del número de vueltas completas para la apomorfina y no para la D- anfetamina (n=14).
- d.) Ratas con lesión parcial de la SNc por inyección unilateral de 6-OHDA en dicha estructura, poco rotadoras: Ratas que no cumplieron con el criterio del número de vueltas completas ni para la apomorfina, ni para la D-anfetamina (n=17).
- e.) Ratas sanas: Animales no lesionados (n=20).

3.2.- Estudio del efecto de la denervación dopaminérgica del núcleo subtalámico inducida por inyección de 6-OHDA en dicho núcleo, sobre la conducta de giro en respuesta a estimulación dopaminérgica y las habilidades motoras de las extremidades anteriores de ratas.

Grupos a estudiar:

- a.) Ratas con lesión completa de la SNc por inyección unilateral de 6-OHDA en dicha estructura (n=20).
- b.) Ratas con pérdida de la innervación dopaminérgica del núcleo subtalámico por inyección unilateral de 6-OHDA en dicho núcleo (n=30).
- c.) Ratas sanas (n=20).

Objetivo 4: Evaluar las modificaciones funcionales y morfológicas provocadas por el trasplante de células dopaminérgicas fetales en el núcleo subtalámico de ratas con lesión neurotóxica de la vía nigroestriatal y los mecanismos responsables de estas.

Tareas

- 4.1.- Evaluación del efecto funcional del trasplante de células mesencefálicas fetales de ratas, en cuerpo estriado y núcleo subtalámico, sobre la conducta rotatoria inducida por agonistas dopaminérgicos y las habilidades motoras de las extremidades anteriores, en el modelo de lesión por 6-OHDA.
- 4.2.- Evaluación desde un punto de vista cualitativo y por métodos morfométricos las características de los trasplantes y la supervivencia del tejido trasplantado en el cerebro hospedero.
- 4.3.- Evaluación del efecto del trasplante de células mesencefálicas fetales sobre las concentraciones séricas de Factor de Crecimiento de Nervio.

Grupos a estudiar:

- a.) Ratas hemiparkinsonizadas, por lesión de la SNc con 6-OHDA, a las cuales se les realizó trasplante de células dopaminérgicas fetales en el cuerpo estriado (n= 20).
- b.) Ratas hemiparkinsonizadas, por lesión de la SNc con 6-OHDA, a las cuales se les realizó trasplante de células dopaminérgicas fetales en el núcleo subtalámico (n= 20).
- c.) Ratas hemiparkinsonizadas, por lesión de la SNc con 6-OHDA, a las cuales se les realizó trasplante de células dopaminérgicas fetales simultáneamente en el núcleo subtalámico y en el cuerpo estriado (n= 20).
- d.) Ratas hemiparkinsonizadas, por lesión de la SNc con 6-OHDA, a las cuales se les administró en lugar de células el vehículo en el que se prepararon las suspensiones celulares (falsos trasplantes) en el cuerpo estriado (n= 10).
- e.) Ratas hemiparkinsonizadas, por lesión de la SNc con 6-OHDA, a las cuales se les realizó un falso trasplante en el núcleo subtalámico (n= 10).
- f.) Ratas hemiparkinsonizadas, por lesión de la SNc con 6-OHDA, a las cuales se les realizó un falso trasplante simultáneamente en el núcleo subtalámico y el cuerpo estriado (n= 10).
- g.) Ratas hemiparkinsonianas (n= 20).
- h.) Ratas sanas (n= 20).

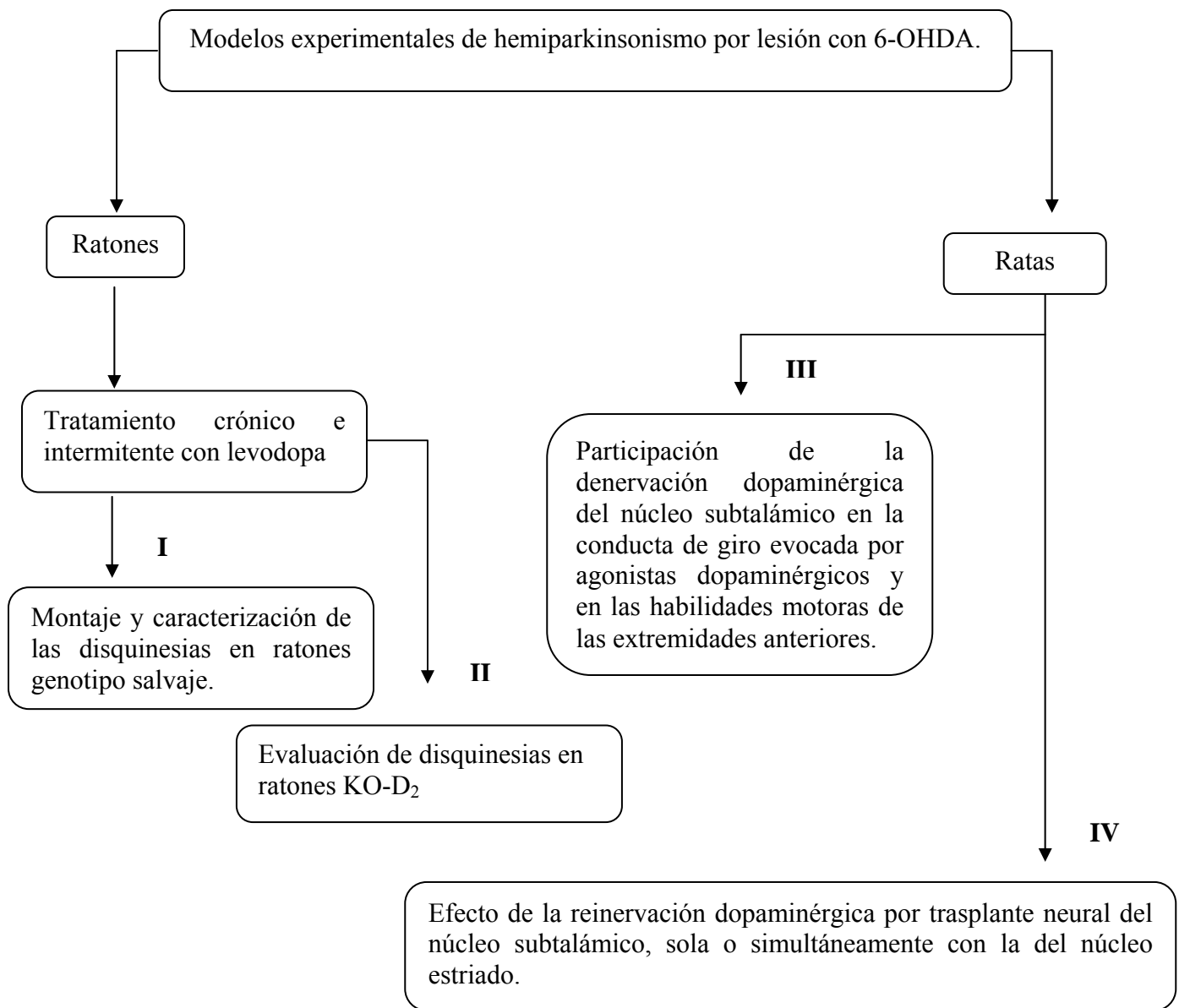


Figura 4. Diseño experimental. Los números romanos sobre los cuadrantes representan los experimentos realizados correspondientes a los objetivos. Los experimentos I y II plantearon el estudio del papel de los receptores dopaminérgicos D_2 en la inducción de disquinesias mediante la estimulación intermitente y crónica con levodopa; mientras que los experimentos III y IV indagaron en el efecto de la reinervación dopaminérgica por trasplante neural del núcleo subtalámico sobre la conducta motora de ratas hemiparkinsonianas.

II. Materiales

A. Animales de experimentación

En los experimentos relacionados con las disquinesias, se utilizaron ratones machos adultos con genotipo salvaje (C57/BL6) con pesos entre 22 y 30 gramos al comienzo del experimento y ratones mutantes, machos adultos de peso similar que carecen de receptores dopaminérgicos D₂ (“Knock out”, KO-D₂). Los animales provinieron del animalario del Instituto Cajal (Madrid, España). Todos fueron mantenidos en pequeñas cajas plásticas traslúcidas (entre 4 y 6 animales por caja), ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, temperatura media de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, condiciones de humedad controladas y libre acceso a comida y agua.

En los experimentos III y IV se utilizaron ratas machos adultas Wistar, con pesos entre 200 y 250 gramos al comienzo del experimento, provenientes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Ciudad de La Habana, Cuba. Los animales fueron mantenidos en el bioterio del Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN), en cajas plásticas traslúcidas a una temperatura media de 23°C ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), con suministro de alimentos y agua *ad libitum* y períodos de luz y oscuridad de 12 horas. Las ratas fueron mantenidas en grupos de cinco por caja, al inicio del experimento, y una vez que los animales fueron trasplantados se mantuvieron tres por caja.

B. Criterios de Exclusión

1. En el caso de los estudios realizados en ratones fueron excluidos todos aquellos sujetos experimentales que no mostraron una pérdida de neuronas dopaminérgicas mayor del 70 %.
2. Fueron excluidos además ratones con genotipo heterocigótico (+/-), para la expresión del receptor dopaminérgico D₂.
3. En el caso de los estudios realizados en ratas, fueron excluidos del experimento aquellos sujetos experimentales que pasado 1 mes de la lesión con 6-OHDA **no alcanzaron** al menos 630 vueltas completas hacia el lado de la lesión en 90 min. después de la inyección de D- anfetamina y 150 vueltas completas contralateral al lado de la lesión en 45 min. después de la inyección de apomorfina (este constituyó un criterio de exclusión sólo para aquellos grupos experimentales donde se incluyeron animales con lesión unilateral completa de la vía nigroestriatal)
4. Aquellos animales, pertenecientes a cualquiera de las especies y de los grupos experimentales que mostraron en cualquier momento: infecciones severas, lesiones en los ojos que les dificulten la visión o atrofia marcada de alguna extremidad aislada.

C. Consideraciones éticas

En este estudio, se respetaron todas las normas establecidas en el código para la ética de la experimentación animal. Se garantizó la autenticidad genética de los animales, lo cual se logró adquiriendo los animales en centros de cría reconocidos. Este proceder evita la utilización de animales

genéticamente contaminados. La importancia de la calidad genética para las investigaciones, desde el punto de vista biológico, radica en que los resultados de cualquier experimento pueden ser reproducibles en cualquier otro lugar donde se repita y desde el punto de vista ético, se garantiza la utilización de un menor número de animales.

Tanto el cuidado como las pruebas conductuales realizadas en ratones fueron llevadas a cabo acorde con las regulaciones bioéticas para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Comunidad Europea, aprobadas por el comité ético local del Instituto Cajal (Madrid, España).

Los experimentos realizados en ratas se hicieron siguiendo los procedimientos normalizados de operación del vivario del CIREN, para el uso y mantenimiento de animales de laboratorio; los cuales contemplan normas establecidas en: “Guide to the care and use of experimental animals”; “Standard Operating procedures, Vol. 1. Toxicology” y “Guide to the care and use of experimental animals. National Institute of Health-NIH Publication. No. 85-23”[218].

Durante la investigación, los animales estuvieron bajo condiciones de alojamiento óptimas. Fueron mantenidos a una temperatura de 23°C, la cual entra en el rango de compromiso establecido en zonas tropicales (22±2°C). El control de la temperatura es importante si se tiene en cuenta que las altas temperaturas provocan estrés en los animales y una temperatura mayor de 38°C puede causar su muerte. Los períodos de luz y oscuridad, a los que se expusieron, fueron de 12 horas, pues la fotoperiodicidad controla el ritmo circadiano, ritmos bioquímicos y hormonales, ya sea de manera directa o indirecta.

Después de trasplantadas, las ratas fueron mantenidas en grupos de tres por caja, pues la densidad poblacional también ejerce un efecto sobre el bienestar físico y conductual del animal. Se controlaron además otros factores externos como los ruidos, el encamado, la ventilación y la humedad relativa. Todos los sujetos experimentales tenían acceso libre a los alimentos y al agua.

Por otro lado, se llevó a cabo el control de la calidad higiénica, dado que esta influye directamente sobre la validez del experimento, al reducir la variabilidad de los resultados y por ende la posibilidad de cometer errores. Para ello en el curso de la investigación, los animales fueron manipulados y atendidos por un personal calificado, buscando disminuir al máximo el estrés, dado que este provoca alteraciones en la homeostasis del animal y por lo tanto una variabilidad en las respuestas fisiológicas y conductuales. En todos los casos, los experimentos fueron realizados por más de un evaluador y se utilizaron los métodos menos cruentos posibles para cada maniobra en particular, minimizando el dolor, el número de animales empleados y garantizando una muerte incruenta por eutanasia.

D. Estudio genotípico de los ratones

La selección de animales con genotipo salvaje (+/+) y mutantes que carecen de receptores D₂ (-/-), fue realizada a partir del genotipaje de camadas de ratones provenientes del cruce de ratones heterocigotos (+/-) para la expresión de receptores dopaminérgicos D₂, por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP). En nuestros grupos experimentales con ratones sólo fueron incluidos animales salvajes (+/+) y mutantes carentes de receptor dopaminérgico D₂ (-/-).

- Extracción del ácido desoxirribonucleico a partir de las colas de los ratones

Fueron obtenidos fragmentos de cola, de aproximadamente 1 cm de longitud, mediante un corte transversal de su porción distal. Los fragmentos fueron colocados en viales Eppendorf. Se añadió 0.5 ml de una solución de lisis para digerir el material (Tris 100 mmoles/L (pH 8.0), NaCl 200 mmoles/L, SDS 0.2 %, EDTA 5 mmoles/L, proteinasa K 200 µL/ml). Las muestras fueron mantenidas, en la solución de lisis, durante toda la noche en un horno de hibridación a 55°C en agitación, para ayudar a la digestión. Posteriormente, fueron centrifugadas durante 20-30 minutos a 15 000 r.p.m. fue recogido el sobrenadante el que se trasladó a un tubo nuevo y fue descartado el precipitado. Fueron añadidos 500 µL de isopropanol 100% y la mezcla fue agitada, para conseguir formar las cadenas de ácido desoxirribonucleico (ADN), que fueron recogidas con pinzas quirúrgicas. Al ADN, así obtenido, le fueron añadidos 150-300 µL de agua destilada, y se dejó en el horno de hibridación o en baño de agua con agitación a 50°C durante la noche. Las muestras de ADN obtenidas fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

- Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de la presencia de ácido desoxirribonucleico que codifica para el receptor D₂

La concentración de ADN en las alícuotas obtenidas en la extracción fue determinada mediante medición de absorbancia. La reacción fue llevada a cabo en una mezcla que contenía: 5.6 µL de H₂O destilada, 3.0 µL de tampón RCP, 3.0 µL de dNTPs (2.5 mM), 2.4 µL de MgCl₂ (2 mmoles /L vol_{final}), 3.0 µL de Primer I₇ (10 µmoles /L), 3.0 µL de PrimerWT(10 µmoles/L) y 3.0 µL de PrimerKO(10 µmoles/L); de esta solución fue añadido un volumen de 23 µL en cada tubo de RCP. Posteriormente, se añadió 1-2 µL de ADN (a una concentración de 0.3 µg/µL) a cada tubo, tomando precauciones para evitar que las muestras se contaminen.

La primera fase de la reacción fue realizada en un equipo diseñado especialmente para realizar RCP una vez alcanzados 80°C, fueron añadidos 5 µL de la mezcla de reacción a cada tubo (4.0 µL de H₂O destilada, 0.5 µL de RCP Buffer (10X) y 0.5 µL de Taq Polimerasa). Esta reacción tuvo lugar en aproximadamente 3 horas y 50 minutos.

Al finalizar, los productos del ADN fueron corridos electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.0%, a un voltaje de 150 mV y comparados con el patrón de peso molecular (Fig. 5). El estudio genotípico de los ratones nos permitió conocer qué animales eran portadores de un genotipo salvaje (+/+), cuáles eran

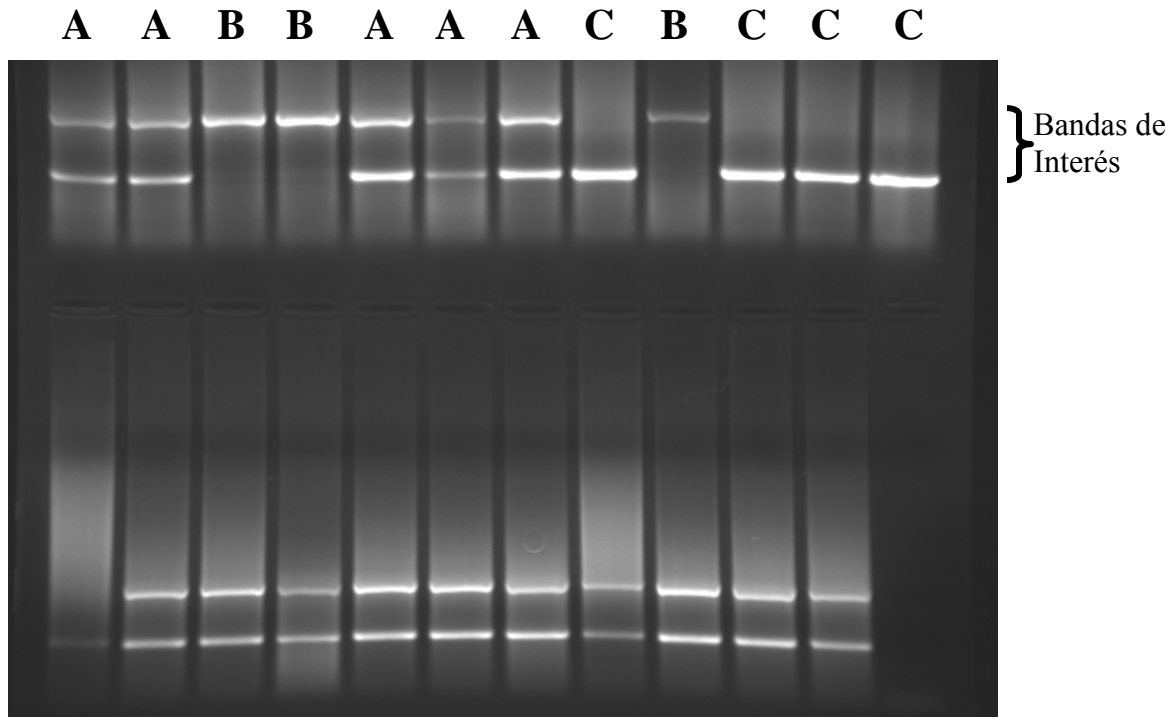


Figura 5. Muestra de un gel de electroforesis de ADN perteneciente a ratones con genotipo salvaje (+/+), heterocigotos (+/-) y mutantes que carecen del receptor D_2 (-/-). Los que tienen las dos bandas son animales +/- (A), los que tienen sólo una banda arriba son +/+ (B) y los que sólo tienen una banda abajo son -/- (C).

heterocigotos para el gen del receptor dopaminérgico D_2 (+/-) y cuáles se correspondían con ratones mutantes, que carecen del receptor D_2 (-/-). En nuestros grupos experimentales, sólo fueron incluidos animales salvajes (+/+) y mutantes carentes de receptor dopaminérgico D_2 (-/-).

III. Método de lesión, tratamiento crónico con L-DOPA y evaluación conductual en modelos experimentales de hemiparkinsonismo diseñados en ratones

A. Lesión unilateral de la SNc por inyección de 6-Hidroxidopamina en el cuerpo estriado

El modelo de hemiparkinsonismo en ratón fue obtenido a partir de la inyección de la neurotoxina 6-OHDA en el cuerpo estriado. Con el objetivo de prevenir la degeneración de neuronas noradrenérgicas, 30 minutos antes de la inyección de 6-OHDA los ratones fueron tratados con Desipramina (Desipramine Hydrocloridre, Sigma, EE.UU.), un inhibidor de los mecanismos de recaptura de noradrenalina, a razón de 20 mg/kg de peso corporal (intraperitoneal (i.p)).

Los ratones fueron anestesiados con 2,2,2-tribromoetanol 99 % disuelto en solución salina fisiológica (200 mg/kg, i.p., Sigma, EE.UU.) y colocados en un marco para cirugía estereotáctica que poseía un adaptador especial para ratones (David Kopf Instruments, EE.UU.). Fueron inyectados 10 µg/4 µl de 6-OHDA-hidrobromide (6-OHDA-HBr) (Sigma, EE.UU.) distribuidos en dos sitios separados del cuerpo estriado izquierdo. La neurotoxina estaba disuelta en solución salina fisiológica (Cloruro de Sodio 0.9 %) que contenía 0,01% de ácido ascórbico y fue inyectada utilizando una jeringuilla Hamilton de 5 µl (Hamilton Bonaduz AG, Switzerland), a una velocidad de flujo de 1µl/minuto. Las coordenadas fueron calculadas tomando como punto de referencia Bregma (punto de unión de las suturas parietales y frontales) acorde con el atlas para ratón de Franklin y Paxinos[219] y se refieren en la Tabla 2.

Tabla 2: Coordenadas estereotácticas expresadas en mm con respecto a Bregma (con excepción de la dorsoventral que se refirió a la superficie dural).

Coordenadas	Sitio 1	Sitio 2
Anteroposterior (AP)	+0.5	+0.5
Mediolateral (ML)	2.4	2.4
Dorsoventral (DV)	4.0	3.0

Una vez inyectada la neurotoxina, la jeringuilla fue mantenida en el sitio hasta 5 minutos después de finalizada la inyección. Posteriormente la piel fue suturada y los animales fueron colocados sobre mantas eléctricas calefactoras hasta su recuperación de la anestesia. En el grupo de animales, falsos lesionados, fue realizado el mismo proceder anteriormente mencionado, pero una vez que la aguja estuvo colocada en las coordenadas de lesión, se mantuvo en el sitio hasta 5 minutos y no se inyectó nada.

B. Efectos del tratamiento con levodopa en ratones con lesión de la vía nigroestriatal. Evaluación conductual

De tres a cuatro semanas después de la inyección de 6-OHDA en el cuerpo estriado izquierdo de ratones salvajes C57/BL6, los sujetos experimentales comenzaron a recibir 20 mg/kg de peso (i.p.) de levodopa (metil ester de L-DOPA; Sigma-Aldrich, AB) combinada con 10 mg/kg de Benserazida (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, EE.UU.), un inhibidor de la enzima DOPA-descarboxilasa; dos veces al día durante 23 días. Ambos medicamentos fueron disueltos para su administración en solución salina fisiológica (levodopa: 2.5 mg/ml y Benserazida: 1 mg/ml). En el grupo de animales controles fueron administradas en el mismo horario y con la misma frecuencia inyecciones intraperitoneales de solución salina fisiológica.

Durante este período fueron registrados los movimientos involuntarios anormales (MIA) y las rotaciones, inducidas por L-DOPA, en días alternos, dos veces por semana (Fig. 6).

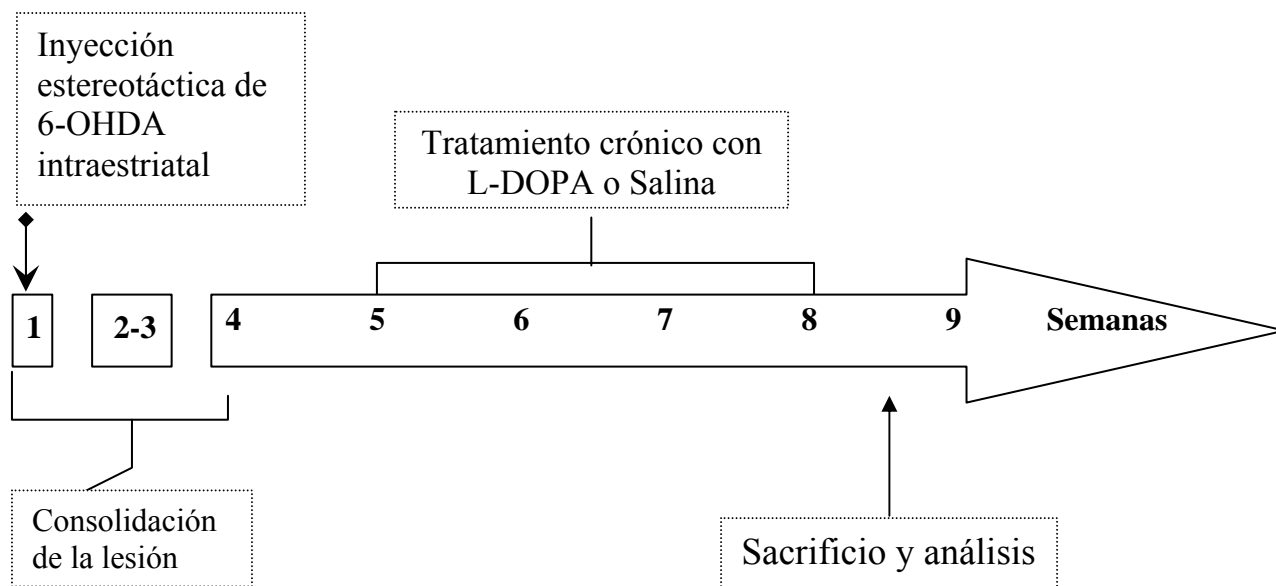


Figura 6. Representación esquemática del cronograma del experimento.

Fueron consideradas disquinesias o MIA aquellos movimientos no deseados, sin un propósito definido que no pudieron ser atribuidos a ningún movimiento voluntario o normal del animal. Para el estudio de los MIA nosotros los dividimos en 4 subtipos diferentes y la frecuencia e intensidad de cada uno de estos subtipos de movimientos fue cuantificada utilizando la misma escala de evaluación descrita previamente para ratas[18] (Anexo 1):

1. **Disquinesias o movimientos involuntarios anormales orofaciales:** Movimientos en el eje vertical de la mandíbula (apertura y cierre) con ligera desviación hacia el lado contralateral a la lesión (derecho). Movimientos masticatorios vacíos. Protrusión de la lengua.
2. **Disquinesias o movimientos involuntarios anormales de las extremidades anteriores:** Movimientos de la extremidad contralateral al lado lesionado de naturaleza coreica o bállica, en sacudidas.
3. **Disquinesias o movimientos involuntarios anormales locomotores:** Conducta locomotora circular en dirección al lado contralateral a la lesión. El giro debe ser muy cerrado, el animal contrae los músculos paravertebrales contralaterales al hemisferio lesionado.
4. **Disquinesias o movimientos involuntarios anormales axiales:** desviación lateral de la cabeza, cuello y tronco hacia el lado contralateral a la lesión, postura torcida mantenida del tronco y extremidades.

Las disquinesias inducidas por L-DOPA fueron evaluadas en días alternos (dos veces por semana), después de 15, 30 y 60 minutos de la inyección de L-DOPA/Benserazida por dos evaluadores mediante la

observación directa de la conducta. Para poder llevar a cabo la observación de los movimientos, los ratones fueron introducidos en cilindros de cristal de unos 4 cm de diámetro y fueron observados durante 2 minutos para evaluar la presencia e intensidad de las disquinesias orofaciales. Posteriormente, los sujetos experimentales fueron colocados en dispositivos de cristal de mayor diámetro (9.5 cm) y se utilizaron otros 2 minutos para evaluar el resto de los subtipos de movimientos involuntarios.

Evaluación de la conducta rotatoria

La conducta rotatoria fue evaluada en un sistema de rotómetros automáticos que contabilizan solamente los giros de 360°. Los ratones fueron colocados en los minitanques del rotómetro y asegurados a los dispositivos contadores por un arnés torácico (Anexo 2). Los sujetos experimentales tuvieron 5 minutos de habituación en los minitanques y posteriormente fueron registradas las rotaciones en ambos sentidos (derecha e izquierda) durante 120 minutos después del tratamiento con L-DOPA/Benserazida. Finalmente, fueron calculadas las rotaciones netas hacia la derecha (rotaciones hacia la derecha menos rotaciones hacia la izquierda).

Todas las mediciones conductuales fueron llevadas a cabo entre las 9:00 y las 15:00 horas, en habitaciones con luz artificial (cuatro lámparas de 40 W que se encontraban en el centro del techo de una habitación de 2,5 m X 3 m, a una altura de 2,6 m) y aislada de ruido ambiental.

C. Evaluación de la expresión de neuropéptidos ratones

Se realizaron estudios de expresión de RNAm prodinorfina y pre-proencefalina estriatal por hibridación *in situ*, sobre secciones coronales que contenían tejido estriatal proveniente de ratones falsamente operados, ratones hemiparkinsonianos tratados con salina y ratones hemiparkinsonianos tratados crónicamente con L-DOPA/Benserazida que desarrollaron disquinesias.

- Obtención y preparación del tejido

Una vez finalizada la etapa de evaluación, en el día 23 de tratamiento, todos los ratones fueron sacrificados por rápida decapitación. Los cerebros fueron extraídos, congelados inmediatamente en hielo seco, envueltos adecuadamente y almacenados a -80°C durante al menos dos días antes de ser cortados en un criostato de congelación (Leica, Wetzlar, Alemania).

Se obtuvieron series rostro-caudales completas de secciones histológicas coronales de 12 µm de grosor de estriado y sustancia negra. Las muestras fueron colocadas en láminas portaobjeto, se dejaron secar al aire y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

- Síntesis y marcaje de las Ribosondas

Se sintetizaron sondas de ARN de 250 pares de bases (pb) que hibridan con el ADN complementario que codifica para la tirosina hidroxilasa de rata (donada por el Dr. Mallet, Hopital de la Pitie Salpetriere,

Paris, Francia). Para los estudios de la expresión de ARNm de neuropéptidos se utilizaron sondas de ARN de 492 pb que hibridan con el ADN complementario que codifica para la pre-proencefalina de rata (donada por el Dr. Sabol, Laboratorio de Bioquímica genética, NIH, Bethesda, Maryland, EE.UU.) y sondas de ARN de 600 pb que hibridan con el ADN complementario que codifica para la prodinorfina de rata (donada por Dr. Douglass, Vollum Institute, Portland, Oregon, EE.UU.)

Todas las ribosondas fueron marcadas con el isótopo azufre 35 (S^{35}) por síntesis con diferentes ARN polimerasas que aparecen enumeradas en la Tabla 3. La síntesis de los ARN complementarios fue llevada a cabo siguiendo los pasos descritos por Freduzzi y colaboradores [221]. Brevemente, un microgramo del ADN cebador apropiado fue incubado con 350 μ Ci de S^{35} -trifosfato de citidina (CTP, 1000 Ci/moles/L, DuPont, NEN, Boston, MA, EE.UU.), 50 μ moles/L de CTP no marcada y 20 mmoles/L de trifosfato de adenosina (ATP), trifosfato de guanosina (GTP) y trifosfato de uracilo. La reacción se comenzó con 15 unidades de la ARN polimerasa adecuada, 100 mmoles/L de Ditiotretitol (DTT) y 20 unidades de ribonucleotidasa (ARN sin inhibidor ARNasas, Promega Corporation, Madison, EE.UU.) en una solución tamponada de transcripción que contenía magnesio. Después de 1 hora de incubación a 37°C, se llevó a cabo la digestión del ADN cebador con una unidad de RQ1 dioxinucleasa a 37°C durante 15 minutos.

Las ribosondas fueron purificadas por precipitación en etanol, a continuación fueron resuspendidas en una solución tamponada (10 mmoles/L Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,6) que contenía 10 mmoles/L de DTT y 40 unidades de inhibidor de ribonucleasa. Finalmente fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

Tabla 3. ARN polimerasas utilizadas para el marcaje de las ribosondas utilizadas.

ADN cebador	Sonda Antisentido	Sonda sentido
tirosina hidroxilasa	T ₇ polimerasa	SP ₆ polimerasa
encefalina	T ₃ polimerasa	T ₇ polimerasa
dinorfina	T ₇ polimerasa	polimerasa

- Hibridación *in situ*

Para realizar los estudios por hibridación *in situ*, secciones de cortes coronales del cuerpo estriado o sustancia negra fueron seleccionadas y fijadas en paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. Posteriormente, los cortes fueron lavados tres veces (5 min. cada vez) en una solución 0.1 moles/L de tampón fosfato que contenía cloruro de sodio (NaCl) al 0.9% (STF), pH 7.4. Luego fueron acetiladas durante 10 min. con solución 0.25% de anhídrido acético en 0.1moles/L de trietanolamina (pH 8.0), lavadas tres veces en STF y deshidratadas por pases en concentraciones ascendentes de etanol (70%, 80%, 95% y 100%) durante 2 min. Seguidamente las secciones fueron inmersas en cloroformo al 100% durante 10 min., rehidratadas por pases en concentraciones decrecientes de alcohol (100%, 95%, 80%, 70%) durante 2 min. y se dejaron secar al aire a temperatura ambiente. Todas las soluciones utilizadas

fueron preparadas con agua bidestilada y dietil-pirocarbonato (DEPC, USD, Cleveland, Ohio, EE.UU.) un inhibidor de la actividad de las ribonucleasas y esterilizadas a 180°C.

Las ribosondas marcadas con S³⁵ fueron mezcladas en una solución de hibridación y aplicadas sobre las secciones histológicas. Se dejaron hibridar durante 12 horas a 55°C en cámara húmeda. La solución de hibridación contenía 50% (v/v) de formamida desionizada (Bethesda Research Labs, BRL), solución de Denhardt's 1 moles/L (0.02% Ficoll, 0.02% polivinil pirrolidona, 10 mg/ml ARNasa-libre de albúmina sérica bovina), 10 % (v/v) de dextrán sulfato (Oncor Inc., Gaithersburg, MD), 0.1% de sodio duodecil sulfato (SDS), 0.1% de tiosulfato de sodio, 100 mmoles/L de DTT y 100 µg/ml de ADN de espermatozoos de salmón (Sigma, St. Luis, MO, EE.UU.), 250 µg/ml de ARN total de levadura, 250 µg/ml ARNtransferencia de levadura.

Las sondas marcadas con el isótopo radioactivo fueron diluidas en la solución de hibridación hasta alcanzar una concentración de 150 000 cpm/µl. Se colocaron 100 µl de la solución de hibridación preparada sobre cada uno de los portaobjetos seleccionados. Después de la hibridación los cortes fueron lavados con solución salina de citrato sódico 2X (0.15 M NaCl, 15 mM citrato sódico) y a continuación con solución salina de citrato sódico 0.1X durante 30 min. a 65°C.

Subsecuentemente los cortes fueron tratados con ribonucleasa A, durante 45 min., a 37°C, a continuación se lavaron con una solución tamponada (0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) durante 15 min. a temperatura ambiente y posteriormente con solución salina de citrato sódico 0.1X durante 30 min. a 65°C, dos veces más. Finalmente, los cortes fueron deshidratados por pases en soluciones con concentraciones ascendentes de etanol (H₂O, 70%, 80%, 95% y 100%) durante 2 min. y se dejaron secar durante toda la noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente, los cortes fueron colocados en casetes y expuestos a un Hyperfilm βMax (Amersham Pharmacia Biotech, Barcelona, Spain) sensible al isótopo de azufre durante 1, 3 ó 10 días para la encefalina, tirosina hidroxilasa o dinorfina, respectivamente. Las películas fueron reveladas con D19 (Eastman Kodak, Rochester, NY, EE.UU.), secadas y procesadas con el sistema analizador de imágenes, Scion Image for IBM PC (Copyright 1998 Scion Corporation, versión 1.1, 1998,). Fueron cuantificados los porcentajes de cambio en la actividad del isótopo radioactivo con respecto al hemisferio sano.

D. Autorradiografía de unión con el radioligando Mazindol[H³]

Los sitios de recaptura de dopamina en el estriado fueron cuantificados usando mazindol[H³], un bloqueador del transportador de la dopamina. Las secciones histológicas fueron descongeladas, se dejaron secar a temperatura ambiente y se preincubaron durante 5 min. a 4°C en una solución 50 mmoles/L de Tris-HCl, pH 7.4 que contenía 120 mmoles/L NaCl y 5 mmoles/L de KCl para eliminar el ligando endógeno. Posteriormente, los cortes fueron incubados durante 60 min. con 5 nmoles/L de mazindol[H³]

(21.0 Ci/mmol/L; PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, EE.UU.) en una solución de 50 mmoles/L de Tris-HCl que contenía 0.3 moles/L de NaCl, 5 mmoles/L de KCl y 0.3 μ moles/L de desipramina (Sigma Química SA, Madrid, España) para bloquear al transportador de noradrenalina.

Después de incubados, los cortes fueron lavados dos veces durante 45s cada vez, en solución de incubación (50 mmoles/L Tris-HCl, 300 mmoles/L NaCl, 5 mmoles/L KCl , pH 7.4), luego en agua helada (10s) y secados al aire. La unión no específica fue determinada en secciones controles que fueron incubadas en presencia de 100 μ moles/L de nomifensina (Sigma Química SA, Madrid, España), un bloqueador de los sitios de recaptura de la dopamina y la noradrenalina. Las láminas con los cortes histológicos fueron colocadas en casetes y expuestas a Hyperfilm-³H (Amersham Pharmacia Biotech, Barcelona, España), durante tres semanas. Estándares de tritium y secciones controles (para la unión no específicas) fueron expuestas en cada película utilizada.

IV. Métodos de lesión y técnicas neurorestaurativas en modelos experimentales diseñados en ratas

A. Lesión unilateral de la Substantia nigra pars compacta por inyección de 6-Hidroxidopamina en ratas

Con el fin de proceder a la denervación dopaminérgica unilateral del cuerpo estriado (hemisferio derecho), las ratas fueron anestesiadas con Hidrato de Cloral [0.42 g/kg de peso, i.p., Merck (Darmstadt, Alemania)] y colocadas en un marco diseñado para cirugía estereotáctica (David Kopf Instruments, EE.UU.), donde se les inyectó dentro de la *substantia nigra pars compacta* derecha la neurotoxina 6-OHDA-HBr (8 μ g/3 μ L de solución salina, la cual contenía además 0.2 mg/ml de ácido ascórbico como anti-oxidante). Las coordenadas fueron calculadas tomando como punto de referencia Bregma acorde con el atlas de Paxinos y Watson[222], y se refieren en la Tabla 4.

Tabla 4. Coordenadas estereotácticas expresadas en mm con respecto a Bregma (con excepción de la DV que se refirió a la superficie dural).

	Coordenadas
AP	-4.4 mm
ML	1.2 mm
DV	7.8 mm
Barra Incisiva	-2.4 mm por debajo de la línea interaural

Una vez en el lugar, la neurotoxina fue inyectada lentamente, a una velocidad de flujo de 1 μ l/min, con una jeringuilla Hamilton (5 μ l), que se mantuvo *in situ* 5 min. después de finalizada la inyección.

B. Lesión unilateral del núcleo subtalámico por inyección de 6-Hidroxidopamina en ratas

Las ratas fueron anestesiadas y colocadas en el marco para cirugía estereotáctica como se describió en el inciso anterior. Se inyectaron 3 μ l de la neurotoxina 6-OHDA-HBr, dentro del núcleo subtalámico derecho, utilizando las coordenadas que se refieren en la Tabla 5[222].

Tabla 5. Coordenadas estereotácticas expresadas en mm con respecto a Bregma (con excepción de la DV que se refirió a la superficie dural).

	Coordenadas
AP	-3.8 mm
ML	2.2 mm
DV	8.1 mm
Barra Incisiva	-2.4 mm por debajo de la línea interaural.

Al igual que en la lesión unilateral de la SNc una vez en el lugar, la neurotoxina se inyectó lentamente, a una velocidad de flujo de 1 µl/min, con una jeringuilla Hamilton (5 µl), que se mantuvo *in situ* 5 min. después de finalizada la inyección.

C. Evaluaciones Conductuales en ratas con lesión inducida por inyección de 6-OHDA

- Conducta de giro inducida por agonistas dopaminérgicos

La actividad rotatoria inducida por D-anfetamina [5 mg/kg de peso (i.p.), Sigma, (St. Luis, MO, EE.UU.)] y por apomorfina [0.05 mg/kg de peso (s.c.), Sigma, (St. Luis, MO, EE.UU.)] fue evaluada para medir el grado de la lesión.

Las ratas fueron colocadas en los tanques después de la inyección con los agonistas dopaminérgicos mencionados y tuvieron 5 min de habituación antes de comenzar a registrar las rotaciones. La evaluación de la efectividad de la lesión fue realizada 1 mes después de inyectar la neurotoxina. Con excepción de los grupos experimentales relacionados con la caracterización del modelo de lesión unilateral completa de la SNc por inyección de 6-OHDA, solamente fueron incluidos en los experimentos aquellos animales que exhibieron en su conducta rotatoria al menos 630 vueltas completas (360°) ipsilaterales a la lesión (hacia el lado derecho) en 90 minutos, después de la inyección con D-anfetamina y 150 vueltas completas contralaterales al hemisferio lesionado (hacia el lado izquierdo) en 45 minutos, después de la inyección con la apomorfina.

El número de vueltas completas que dieron los animales fue registrada en un Rotómetro electrónico (ROTORCID, ICID, Cuba) que cuantifica automáticamente los giros que realiza el animal hacia la derecha y/o izquierda durante el tiempo determinado para cada droga. Todas las mediciones conductuales fueron llevadas a cabo entre las 9:00 y las 15:00 horas, en habitaciones con luz artificial (dos lámparas de 40 W que se encontraban en el centro del techo de una habitación de 1,5 m X 2,5 m, a una altura de 2,6 m) y aislada de ruido ambiental. Se dejaron transcurrir 7 días entre la evaluación con D-anfetamina y con apomorfina. Estos criterios de inclusión, según la rotación con ambos agonistas, se corresponden con una denervación nigroestriatal de más del 80%[137;140;145].

- Habilidades Motoras de las Extremidades Anteriores

En las ratas de todos los experimentos fueron evaluadas las habilidades motoras de las extremidades anteriores. En los grupos experimentales a los cuales se les realizó trasplante, la evaluación se hizo antes de realizarse y tres meses después de este. Para ello se utilizó la “Prueba de Habilidad Manual”[14;150].

Caja experimental

En la evaluación de la conducta sensorimotora en los animales de experimentación, se emplearon cajas de acrílico rojo (3 mm de espesor) de 28 cm de largo (Anexo 3); 6.6 cm de ancho y 6.8 cm de altura (Fabricadas en el Taller de Prototipo, CIREN). Aproximadamente los dos tercios anteriores de la caja, están ocupados por una plataforma central de 4.7 cm de alto y 2.9 cm de ancho, con espacios a ambos lados para insertar una escalerilla móvil de seis escalones en cada uno de los extremos. Cada escalón y el nivel inferior (piso de la caja) poseen una pequeña concavidad, donde se sitúan dos trozos de alimento (pellets) con sabor diferente al que normalmente ingieren, por lo cual el animal dispone de catorce pellets a cada lado. La plataforma central impide que el animal alcance el alimento de un lado con la extremidad contraria. La base del extremo posterior de la caja posee una abertura que posibilita el acceso de la rata al compartimiento interior.

Seis días antes de la realización de la prueba las ratas se sometieron a un régimen de alimentación restringida (10-12 g de alimento diario por animal). Tres días después de comenzado este, los animales se colocaron dentro de las cajas experimentales una vez por día durante 15 min.; con el propósito de que se familiarizaran con las condiciones experimentales.

Una vez comenzadas las sesiones experimentales las ratas se introdujeron en las cajas de prueba, una vez al día, durante 15 min., por 6 días consecutivos. Al final de cada sesión se retiraron las escaleras de las cajas experimentales y se contabilizaron los trozos de alimentos que no fueron comidos, de cada lado (derecho e izquierdo) de manera independiente.

D. Microtrasplantes de células mesencefálicas fetales en los diferentes grupos experimentales

- Preparación de las suspensiones celulares

La preparación de las suspensiones celulares ricas en células dopaminérgicas se realizó, bajo condiciones de asepsia, acorde con la técnica de microtrasplante descrita por Nikkhah[190]. El tejido mesencefálico fetal se obtuvo a partir de fetos de 14 días (longitud corona-cola de 10-11 mm). El mesencéfalo ventral fue disecado, fragmentado e incubado en una solución de medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (MEMD) con 0.1% tripsina a 37°C durante 20 min.; seguido por cuatro lavados con 300µl de una solución de MEMD con ADNasa I al 0.01%. La disociación mecánica de las piezas del tejido se realizó en 250 µl de la misma solución mediante pipeteos sucesivos con pipetas Pasteur de diámetros internos decrecientes, hasta obtener una disociación completa del tejido. La suspensión celular obtenida

se centrifugó a 600 r.p.m. durante 5 min. a 4°C y el botón celular se resuspendió en una solución de MEM con 0.01% de ADNasa I. La viabilidad celular se determinó mediante la técnica de exclusión con azul de tripano y conteo celular en cámara de Neubauer. En todos los casos la viabilidad celular antes del trasplante fue mayor del 98% y la concentración celular de la suspensión a trasplantar, se ajustó mediante dilución en una solución de MEM con 0.01% de ADNasa a $1.5 \text{ ó } 3 \times 10^5$ células/ μl .

- Procedimiento quirúrgico

Las ratas fueron anestesiadas con Hidrato de Cloral [(0.42 g/kg de peso, i.p., Merck (Darmstadt, Alemania)] y colocadas en el marco estereotáctico (David Kopf Instruments, EE.UU.). Las coordenadas fueron calculadas acorde con el Atlas de Paxinos y Watson[222].

Las suspensiones celulares se inyectaron mediante una cánula de vidrio de diámetro externo entre 70 y 90 μm , confeccionadas a partir de un capilar estirado por el efecto del calor a través de un equipo estirador de pipetas y cortado mecánicamente. La cánula se acopló por medio de un pequeño tubo de polietileno, a una jeringuilla Hamilton de 5 μl . Con el objetivo de obtener mayor reinervación de las estructuras trasplantadas, se colocaron volúmenes de 0.25 μl de la suspensión celular en cada depósito realizado en el cuerpo estriado y el NST. Las coordenadas utilizadas se refieren en la Tabla 6.

Tabla 6. Coordenadas de depósito de las suspensiones celulares en las estructuras blanco. Las coordenadas estereotácticas aparecen expresadas en mm con respecto a Bregma (con excepción de la DV que se refirió a la superficie dural).

Estructuras a trasplantar	No. de depósitos	Coordenadas			
		AP	ML	DV ₁	DV ₂
Caudado- putamen	2.....	+1.70	+2.20	-4.00	-5.50
	2.....	+1.10	+2.40	-4.00	-5.00
	2.....	+0.48	+3.00	-4.00	-5.40
	1.....	-0.30	+3.40	-4.50	
	1.....	-0.80	+4.00	-5.00	
NST	2.....	-3.80	+2.10	-8.10	-8.20
	2.....	-3.80	+2.30	-8.00	-8.10

DV₁: coordenada 1 dorsoventral; DV₂: coordenada 2 dorsoventral

En los trasplantes colocados en el cuerpo estriado se pusieron 2 μl de suspensión celular a una concentración de 1.5×10^5 células/ μl , mientras que en el NST, se colocó 1 μl de la suspensión celular a una concentración de 3×10^5 células/ μl .

El tiempo quirúrgico máximo empleado en las distintas sesiones de trabajo nunca fue mayor de 4 horas y durante este tiempo las suspensiones celulares se mantuvieron a 4°C. Previo a la colocación de las suspensiones celulares en las distintas estructuras, estas fueron resuspendidas varias veces mediante

pipeteo, para garantizar la homogeneidad en la concentración celular en las distintas inyecciones y evitar la formación de agregados celulares. Al finalizar cada sesión de trabajo se midió nuevamente la viabilidad celular, encontrándose en todos los casos una viabilidad mayor que el 80%.

E. Evaluación Conductual Posterior al Trasplante

- Conducta de giro inducida por agonistas dopaminérgicos

La actividad rotatoria inducida por D-anfetamina [5mg/kg de peso, Sigma, (St. Luis, MO, EE.UU.)] administrada i.p. fue evaluada al finalizar el 1^{er}, 2^{do} y 3^{er} mes, en todos los grupos experimentales posterior a la realización del trasplante de células dopaminérgicas, excepto el grupo de controles sanos. En el 3^{er} mes del experimento se evaluó, además, la actividad rotatoria inducida por apomorfina (0.05 mg/kg de peso) administrada subcutáneamente (Fig. 7).

- Habilidades motoras de las extremidades anteriores

Las habilidades motoras de las extremidades anteriores fueron evaluadas al finalizar la prueba de la conducta rotatoria inducida por apomorfina al 3^{er} mes post-trasplante. Se aplicó la “Prueba de Habilidad Manual”, siguiendo un esquema similar al realizado previo al trasplante (Fig. 7).

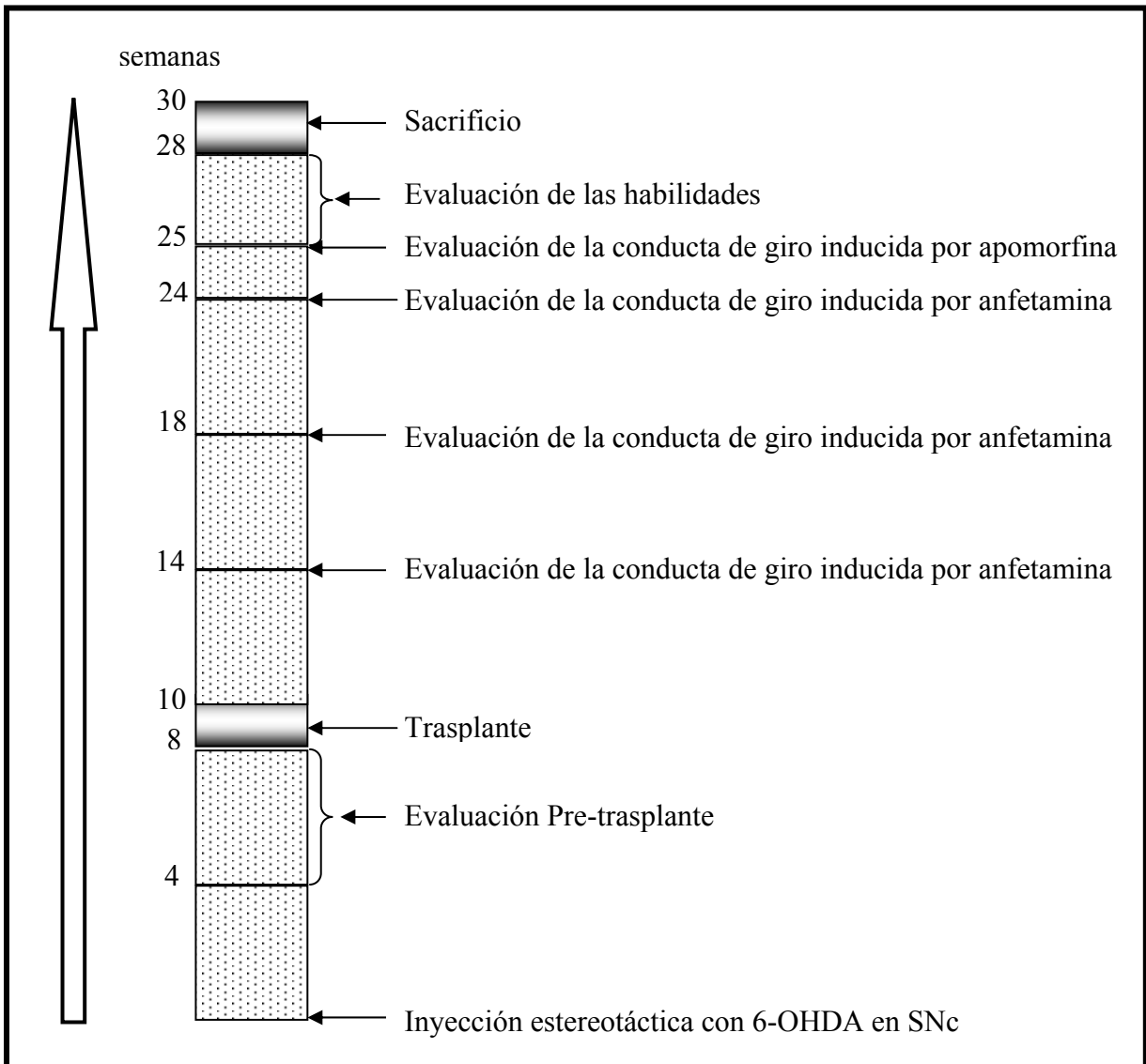


Figura 7. Representación esquemática del cronograma del experimento de trasplante.

V. *Cuantificación de Factor de Crecimiento de Nervio en suero de ratas con lesión de la vía nigroestriatal y trasplante de células mesencefálicas fetales*

Obtención de las muestras de suero: Los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (0.42 g/kg de peso corporal, i.p) y se obtuvo una muestra de sangre por punción cardíaca. La sangre obtenida se centrifugó, se extrajo el suero y se conservó a -20°C hasta su uso.

- Ensayo Inmunoenzimático para la Cuantificación de Factor de Crecimiento de Nervio en muestras de suero

La concentración de factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés: nerve growth factor) fue evaluada a través de un ensayo inmunoenzimático (EIE)[223].

Para el EIE fueron utilizadas placas negras de 96 pocillos (Dinatech, Microfluor, EE.UU.) las cuales fueron recubiertas con el anticuerpo monoclonal 27/21 anti β -NGF murino (Boehringer Mannheim, Alemania) diluido en solución tamponada de carbonato 0.05 moles/l pH 9.6. A su vez fueron recubiertos pocillos controles con inmunoglobulina G normal de ratón. A la placa, después de ser incubada durante la noche en cámara húmeda a temperatura ambiente, la fue añadida albúmina sérica bovina (ASB) diluida al 1% en esta misma solución tamponada. Fue lavada con Tris 0.002 moles/l, NaCl 0.5 moles/l pH 7.3-7.5 (solución tampón de tris, STT) al cual se le adicionó 0.5% de Tween-20 y $MgCl_2$ 2nmol/l y se aplicaron las muestras diluidas: volumen a volumen en STT con 0.5% de Tween-20 y 0.2% de ASB. En pocillos paralelos, y como muestras controles de especificidad del ensayo, fueron montadas las mismas muestras de suero a las cuales se les añadió un exceso de anticuerpo monoclonal anti- β -NGF (concentración final 500 ng/ml). Las muestras se incubaron durante la noche en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se utilizaron como estándar muestras de β -NGF de ratón (Sigma, EE.UU.) diluidas en la misma solución tamponada de las muestras (100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 ng/ml). Las placas fueron lavadas extensamente en STT y les fue adicionado el anticuerpo monoclonal 27/21 conjugado con β -galactosidasa, 1:200 en STT con 0.05% de Tween-20, 1% de ASB y 2 nmoles/l de $MgCl_2$. Las placas fueron incubadas a 37° C, lavadas y finalmente la reacción de la enzima se produjo añadiendo 0.2 nmoles/l de metilumbeliferil- β -galactósido (MUG). La acumulación de metilumbeliferona ($\lambda_{excitación} = 365nm$ y $\lambda_{emisión} = 450 nm$) 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 (fmoles MUG por minuto).

VI. *Obtención, preparación y procesamiento del tejido cerebral de ratas*

Determinación de la concentración de dopamina en estriado y sustancia negra

A. Obtención de las muestras

Al concluir los tratamientos y evaluaciones las ratas (con lesión de la SNc) fueron anestesiadas (hidrato de cloral 0.42 g/kg de peso corporal, i.p.) y decapitadas. Sus cerebros fueron extraídos, lavados con NaCl 0.9 % frío (4° C) y las áreas cerebrales: cuerpo estriado y sustancia negra fueron disecadas. Los tejidos se congelaron, pesaron y conservaron a -70 °C hasta su análisis.

B. Homogenización de las muestras

Las muestras fueron homogenizadas en una vasiija de vidrio-teflón y disueltas en 400 μ l de solución de homogenización que contenía metabisulfito de sodio 4.4% en $HClO_4$ 0.1moles/l. Posteriormente, se centrifugaron a 14 000 rpm durante 15 min a 4°C. Se extrajo el sobrenadante utilizando una jeringuilla de 1ml con su aguja y se filtró por una membrana de poro 0.22 μ m. La muestra fue filtrada y 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 y se inyectó en el sistema de cromatografía líquida previamente equilibrado.

C. Cromatografía líquida de alta resolución con detector electroquímico

La concentración de dopamina fue determinada utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés: High Performance Liquid Chromatography) y detección electroquímica. El sistema de HPLC consistió en una bomba (Philips, PU 41000, EE.UU.) acoplada a un detector electroquímico (Amor Spark, Holanda). La separación de la DA 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.

Evaluación de células inmunorreactivas a la tirosina hidroxilasa

A. Perfusión y extracción de los cerebros de las ratas, post-fijación, congelación y conservación de las muestras

Las ratas fueron anestesiadas con Hidrato de Cloral (0.42 g/kg i.p) y perfundidas por inyección transcardiaca con 500 ml de una solución de lavado (cloruro de sodio al 0.9%) y 500 ml de una solución fijadora que contenía Paraformaldehído al 4%. A continuación los cerebros fueron extraídos y colocados en la solución fijadora por un período adicional de 1 hora. Posteriormente, fueron pasados por una solución tamponada de fosfato 0.1 moles/l pH 7.4 para eliminar el exceso de sustancia fijadora y las muestras fueron colocadas en soluciones consecutivas crecientes de sacarosa al 7, 15 y 30% durante 12 horas cada una. Finalmente las muestras fueron congeladas en N₂ líquido y almacenadas a -70°C para ser procesadas posteriormente.

Se obtuvieron secciones histológicas de 20µm de grosor (**t**), por cortes con el criostato (Leitz-1780, Alemania), del área del trasplante a temperatura de corte de -20°C. Las secciones histológicas fueron colocadas en láminas portaobjetos previamente recubiertas con gelatina-alumbre de cromo.

B. Procesamiento inmunohistoquímico para la visualización de las células inmunorreactivas a la tirosina hidroxilasa

Las láminas con las secciones histológicas fueron lavadas en solución tampón de fosfato tres veces durante 10 min. cada vez. Se incubaron durante 20 min. con una solución que contenía 20% de Suero Fetal de Ternera (SFT) y 0.25% de Tritón X-100 diluidos en tampón fosfato, para bloquear las uniones inespecíficas y permeabilizar la membrana celular, respectivamente. Las muestras fueron incubadas durante toda la noche, en cámara húmeda a 4°C, con el anticuerpo monoclonal anti-tirosina hidroxilasa, (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) diluido 1:100 en STF que contenía 1% de SFT y 0.125% de Tritón X-100. Las láminas fueron incubadas con el anticuerpo anti-IgG de ratón biotinilado durante 1 h (1:500, diluido en STF que contenía SFT 1% y Triton X-100 0.25%). Para amplificar la reacción las

secciones fueron incubadas con el Complejo Streptavidina-peroxidasa-biotina (Dako, Dinamarca) a una dilución de trabajo de 1:100, durante 1 hora. Después de todas las incubaciones, las muestras fueron lavadas tres veces en STF durante 10 minutos. En el revelado se utilizó una solución que contenía peróxido de hidrógeno como sustrato y la Diaminobenzidina Tetrahidrocloruro (DAB) como cromógeno. La reacción se detuvo con agua corriente durante 5 minutos (una vez que se obtuvo la intensidad de coloración deseada) y luego los cortes fueron lavados con agua destilada. Finalmente, las láminas se deshidrataron utilizando una serie de alcoholes de concentraciones crecientes (70%, 80%, 90%, 95%, 100%) y aclaradas en Xilol. Como medio de montaje se utilizó el DPX (Sigma-Aldrich, EE.UU.).

C. Procesamiento Morfométrico.

- Estimación del Volumen Total del trasplante. Principio de Cavalieri.

Este principio proporciona un método para la obtención de un estimado no sesgado del volumen total de cualquier estructura. La zona que contenía el trasplante de células mesencefálicas fue cortada, transversalmente, con un grosor de corte constante (20µm). En dependencia de la distancia entre el primer y último corte donde se visualizaba trasplante (tamaño de la estructura), se fijó para cada caso el número de cortes que debía existir entre las secciones a seleccionar, incluyendo la precedente (**k**), de tal manera que estas fueran 10 para cada animal. Un valor de **i** igual a 10 secciones por estructura, proporciona un estimado eficiente con un coeficiente de error menor o igual a un 5%[224]. Posteriormente se seleccionaron, al azar y sistemáticamente, un conjunto de 10 (**i = 10**) de estas secciones. La primera sección fue escogida al azar entre 1 y el número de cortes (**k**). Los cortes seleccionados fueron utilizados para la medición del área (**A**) ocupada por el trasplante en cada corte, mediante la utilización de un sistema automatizado de imágenes (DIGIPAT, ECISOFT, Cuba). La sumatoria de estas áreas multiplicada por la distancia (**d**) entre los cortes nos dió un estimado del volumen total del trasplante (**V_T**)[224] (Fig. 8).

$$V_T = d \times \sum_{n=1}^{n=i} A_n$$

$$d = t \times k$$

t = grosor del corte

A. Estimación de la Densidad Neuronal y el Número Neuronal Total.

El conteo neuronal se realizó en las 10 secciones seleccionadas previamente. El cálculo de la densidad neuronal (**N_{VR}**) y la estimación del número total de neuronas (**N_T**) se hizo mediante la siguiente expresión:

$$N_{VR} = [\text{número total de neuronas contadas} / (\sum_{n=1}^{n=i} A_n \times t)] \times FC$$

FC (Factor de corrección de Abercrombie) = $t / (t + dm)$

t = grosor del corte

dm = diámetro medio neuronal.

Se determinó un **FC** para cada una de las estructuras trasplantadas: cuerpo estriado y núcleo subtalámico[225].

$$N_T = V_T \times N_{VR}$$

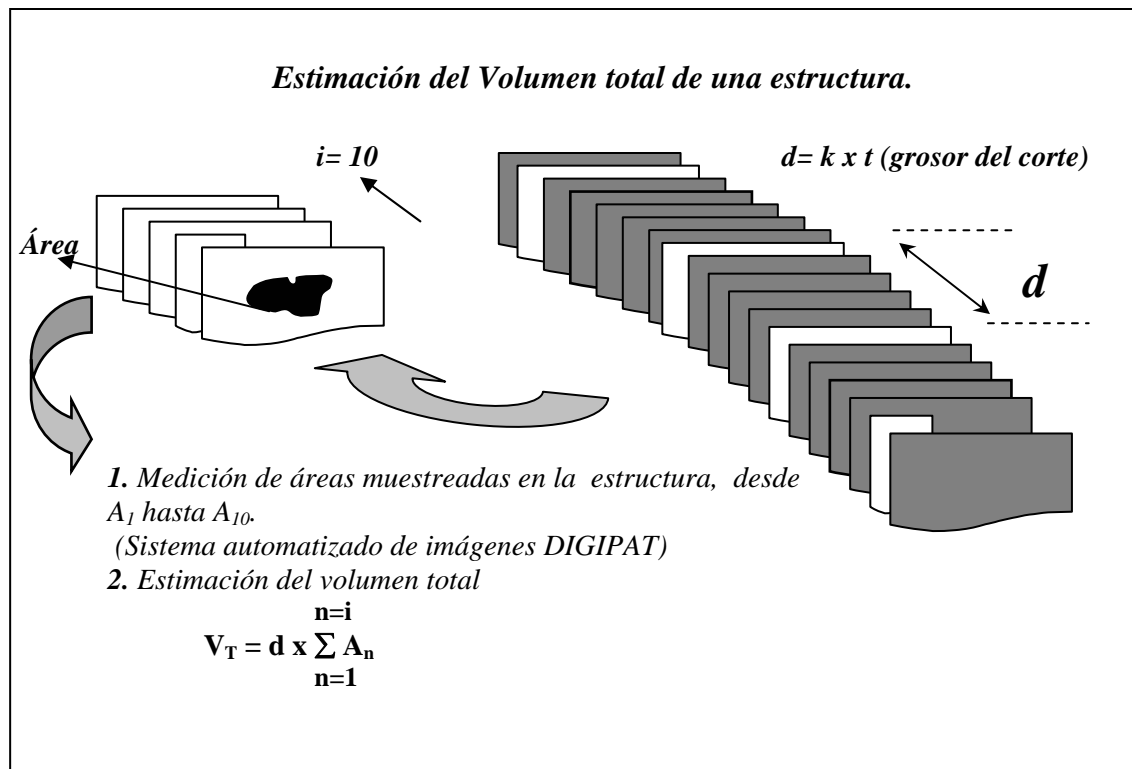


Figura 8. Representación esquemática del método empleado en la toma de muestras para estimación del volumen total del trasplante.

VII. Procesamiento Estadístico

Con vista a conocer de manera general el comportamiento de los grupos en las diferentes evaluaciones se realizó estadística descriptiva y se procesó toda la información recogida mediante el software profesional Statistica para Windows. Versión 6.0, Copyright Statsoft, Inc. 1996.

Se verificó la distribución normal mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza por la prueba de Levene, en los casos en que esta se cumplía se utilizó la prueba *t* de Student para comparar las medias entre grupos. Los datos obtenidos de la evaluación de las habilidades motoras de las extremidades anteriores fueron comparados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de

clasificación doble con mediciones repetidas. En estos casos, los factores tenidos en cuenta fueron: grupo y tiempo. Las diferencias entre los grupos se establecieron con la prueba de comparación múltiple Newman-Keuls. En los casos en que los datos no cumplieron con la homogeneidad de varianza, nos auxiliamos de la aplicación de la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas. Para el estudio comparativo de la actividad rotatoria inducida por drogas, entre meses y grupos experimentales, se realizó análisis de varianza de rangos de una vía Kruskal –Wallis, seguido de una prueba de Dunn o de una prueba suma de rangos U de Mann-Whitney, para determinar si existió diferencia entre los grupos. Para el estudio de las variables morfométricas analizadas se utilizó la prueba t de Student. Se consideraron diferencias significativas cuando la p fue menor de 0.05.

RESULTADOS

I. Lesión con 6-OHDA, tratamiento crónico con L-DOPA y evaluación conductual en modelos experimentales de hemiparkinsonismo diseñados en ratones

A. Lesión con 6-Hidroxidopamina

No todos los ratones mostraron igual sensibilidad a la inyección estereotáctica de la neurotoxina 6-OHDA-HBr en el cuerpo estriado. Aproximadamente el 50% de los ratones tratados mostraron una pérdida casi completa de las células dopaminérgicas TH⁺ en la SNc del hemisferio izquierdo donde fue inyectada la neurotoxina, y la desaparición de terminales dopaminérgicas en el cuerpo estriado (Fig. 9A y B). Sólo fueron incluidos en el análisis de las diferentes variables los resultados de aquellos animales en los cuales fue posible demostrar una pérdida de neuronas dopaminérgicas mayor del 70 % en la SNc.

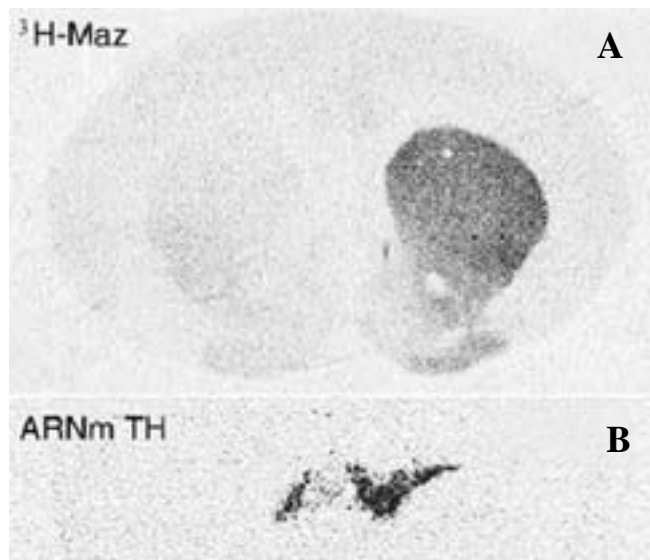


Figura 9. Evaluación de la lesión de la Substantia nigra pars compacta inducida por la neurotoxina 6-OHDA. (A) Se muestran resultados del estudio por la técnica del mazindol. Obsérvese la pérdida de terminales dopaminérgicas en el cuerpo estriado ipsilateral a la inyección de la neurotoxina. En la porción inferior de la fig. (B) se muestra la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNc de ratones con lesión unilateral por 6-OHDA-HBr, a través del estudio de la expresión de ARNm para TH. (A- 10X)(B-40X)

B. Tratamiento crónico con L-DOPA en ratones hemiparkinsonizados y evaluación conductual

El tratamiento crónico con L-DOPA (20 mg/kg, dos veces al día durante 23 días), indujo de manera gradual el desarrollo de movimientos involuntarios anormales. Observamos y cuantificamos 4 tipos diferentes de MIA: movimientos orofaciales, movimientos de las extremidades, disquinesias locomotoras y axiales. Estos movimientos se manifestaron con un patrón repetitivo que tuvo diferencia de un animal a otro.

No todos los animales que recibieron tratamiento con L-DOPA desarrollaron disquinesias (7 de los 10 tratados) en el período en que fueron tratados (23 días). Sin embargo, todos los animales que desarrollaron disquinesias mostraron los 4 tipos de movimientos involuntarios anormales, aunque con gran variabilidad en la intensidad. La incidencia e intensidad de los MIA fueron máximas entre los 30 y 60 minutos después de cada administración de L-DOPA. A partir de los 60 minutos las disquinesias inducidas por L-DOPA fueron disminuyendo en intensidad de manera gradual y 120 minutos después de la administración del medicamento no se observaban movimientos involuntarios anormales (datos no mostrados).

En las disquinesias orofaciales (Fig. 10) fueron observados movimientos verticales repetitivos de la mandíbula, similares a movimientos masticatorios vacíos, interrumpidos por el comienzo de cualquiera de los otros movimientos involuntarios anormales de diferente localización topográfica. En ocasiones, estos movimientos verticales de la mandíbula incluían desviación de la mandíbula hacia el lado contralateral a la lesión (derecho). La protrusión de la lengua fue observada en algunos animales pero con muy baja frecuencia, en muchas ocasiones no fue posible observar esta conducta durante el período de evaluación (Fig. 10). Las disquinesias de las extremidades anteriores sólo fueron observadas cuando los animales estaban en posición vertical (bípeda), y con frecuencia aparecieron simultáneamente con disquinesias axiales (Fig. 10). Aunque se observaron movimientos que semejaban movimientos coreicos en las extremidades anteriores, las disquinesias de extremidades se manifestaron principalmente como movimientos de tipo bállico.

Las disquinesias axiales fueron observadas, después del tratamiento con L-DOPA, cuando los animales estaban tanto en posición vertical como horizontal; y generalmente se manifestaron como una desviación lateral del tronco, por fuerte contracción de los músculos laterales (Fig. 10). Los animales que mostraron fuertes disquinesias axiales también mostraron movimientos repetitivos de la cabeza hacia el lado contralateral a la lesión (Fig. 10).

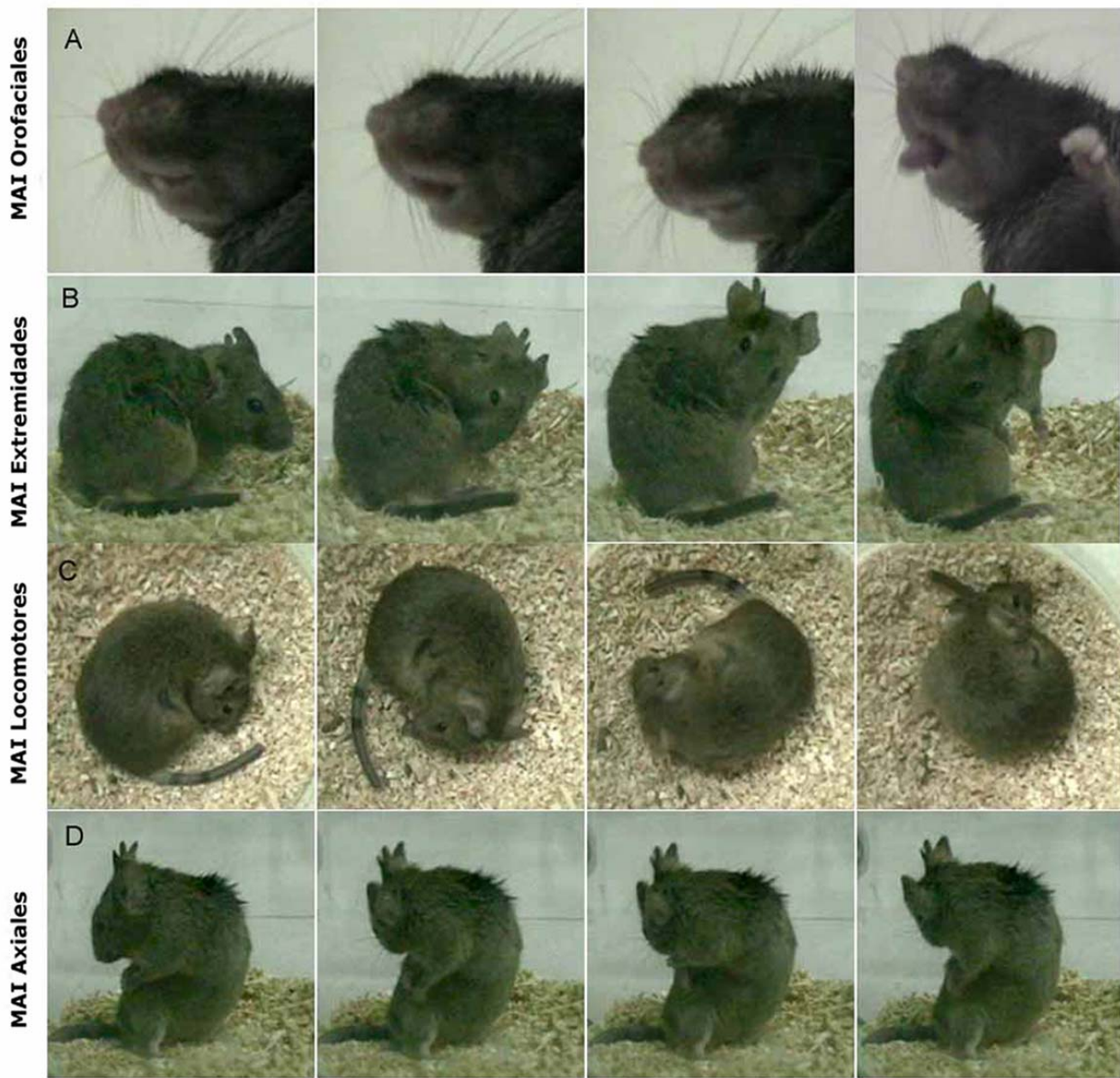


Figura 10. Fotografía secuencial de los distintos movimientos involuntarios anormales estudiados en ratones con genotipo salvaje C57/BL6. A. Disquinesias orofaciales, B. Disquinesias de extremidades, C. Disquinesias locomotoras, D. Disquinesias axiales.

Las disquinesias locomotoras estuvieron caracterizadas por la presencia de múltiples giros muy cerrados, en sentido contralateral al hemisferio lesionado (izquierdo). Los movimientos disquinéticos de las extremidades y las disquinesias locomotoras fueron mutuamente excluyentes; para observar las disquinesias de las extremidades se necesita que los animales se encuentren en posición vertical; mientras que las disquinesias locomotoras requieren que las cuatro extremidades estén en contacto con el piso.

Todos los movimientos involuntarios anormales evaluados incrementaron en frecuencia y severidad durante los primeros 9 días de tratamiento consecutivo con L-DOPA (Fig. 11A). A partir de este momento la intensidad de los movimientos permaneció estable durante el resto del período de evaluación (20 días).

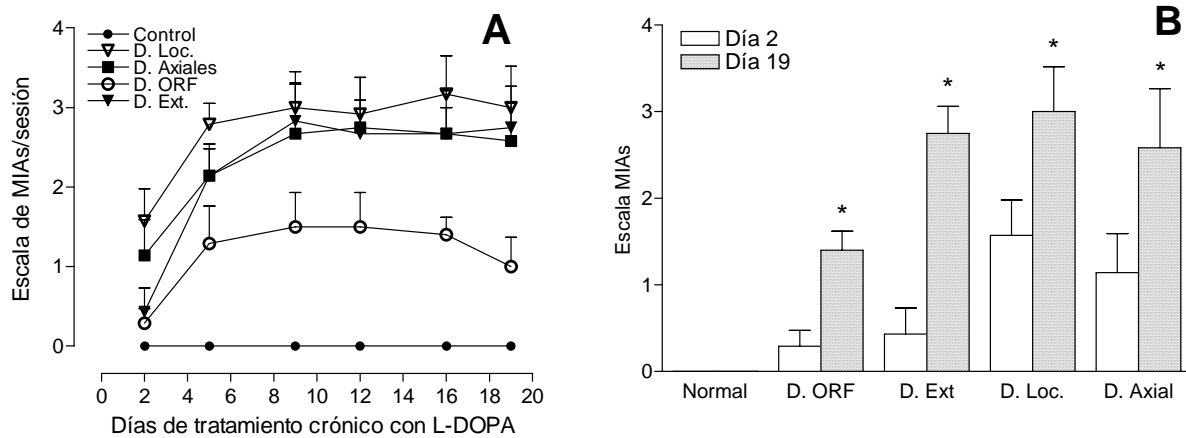


Figura 11. Evolución en el tiempo de la presencia e intensidad de movimientos involuntarios anormales inducidos por tratamiento crónico con L-DOPA en ratones hemiparkinsonizados. **A.** Los puntos de las curvas representan los valores medios \pm error estándar de la media (ESM) para cada variable estudiada. El grupo control representa animales con lesión de la vía nigroestriatal tratados con solución salina en lugar de L-DOPA. **B.** Comparación de los valores de escalas para cada MIA evaluados dos y diecinueve días después de iniciado el tratamiento. Las barras representan los valores medios \pm ESM para cada variable. (* $p < 0.05$ ($Z=2.00$, $Z=2.201$, $Z=2.2$, $Z=2.02$), Wilcoxon para muestras pareadas ($n = 7$)).

Encontramos que, las disquinesias de extremidades, locomotoras y axiales fueron más severas que las disquinesias orofaciales (Fig. 11A y B). Los análisis estadísticos revelaron, diferencias significativas en la intensidad de las disquinesias (cuantificada a través de la escala), entre el primero y último día de evaluación para los cuatro subtipos de MIA evaluados (Fig. 11B). No obstante, estas diferencias fueron más marcadas para las disquinesias de extremidad que para el resto.

C. Sensibilización conductual por tratamiento crónico con L-DOPA en ratones hemiparkinsonianos

Como medida de la sensibilización conductual inducida por el tratamiento crónico con L-DOPA/Benserazida, fue evaluada la conducta de giro contralateral al hemisferio lesionado (izquierdo), durante 120 min. después de la administración del medicamento. La administración intraperitoneal de L-DOPA/Benserazida (20 mg/kg, dos veces por día) induce una conducta de giro contralateral al lado de la lesión, en animales hemiparkinsonianos que se diferencia significativamente de lo observado en animales lesionados tratados con solución salina fisiológica ($p < 0.05$, análisis de varianza de rangos de una vía Kruskal –Wallis). El número de giros inducidos por la L-DOPA se incrementó gradualmente, alcanzando un valor máximo aproximadamente 8 días después de comenzado el tratamiento. Los valores de rotaciones permanecieron elevados durante el resto del período evaluado (Fig. 12), lo cual indica una marcada sensibilización conductual a la administración de L-DOPA. El grupo de animales lesionados tratados con solución salina fisiológica, mostró una escasa conducta de giro, muy similar a la conducta de giro espontánea, que permaneció baja durante todo el período de evaluación.

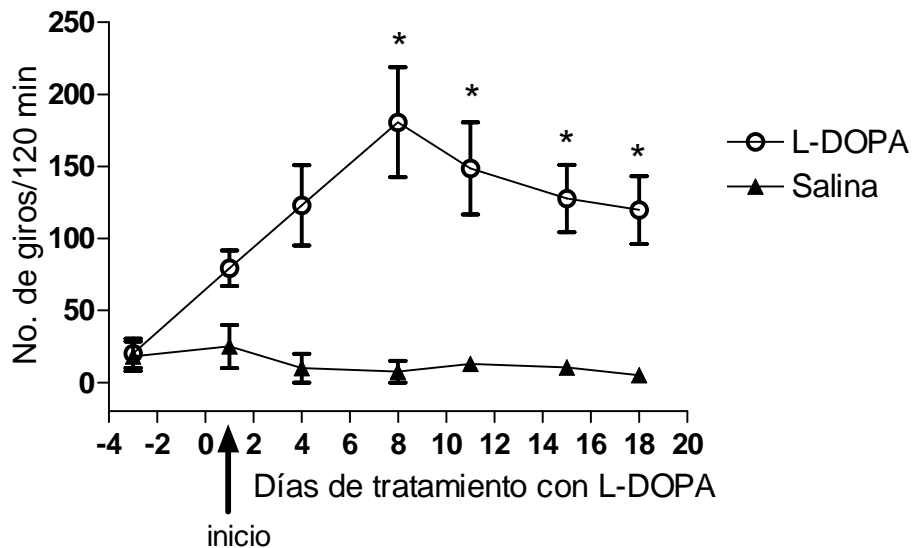


Figura 12. Cuantificación de la conducta de giro inducida por el tratamiento crónico con L-DOPA. Se observa un incremento en esta conducta en dirección contraria al lado lesionado. Fueron cuantificadas las rotaciones netas hacia la derecha durante 120 minutos después de administrado el medicamento. Los puntos representan los valores medios \pm ESM de las rotaciones netas (giros en sentido contralateral menos giros en sentido ipsilateral) (* $p < 0.05$ comparado con el primer día de tratamiento, Wilcoxon para muestras pareadas ($Z = 2.21, 2.0, 1.96, 1.96$; $n = 7$)).

El desarrollo de sensibilización conductual al tratamiento crónico con L-DOPA y otros agonistas dopaminérgicos, produce un incremento en el número de rotaciones que se hace más temprano a medida que avanza el tratamiento. Con el objetivo de poder observar este fenómeno, se cuantificaron las rotaciones netas en sentido contralateral al hemisferio lesionado, durante los primeros 20 minutos después

de la administración de L-DOPA. La administración repetida de L-DOPA, indujo un incremento sostenido en el número de rotaciones hacia la derecha (contralateral al hemisferio lesionado) durante los primeros 20 minutos después de aplicado el tratamiento en animales hemiparkinsonianos (Fig. 13). Este incremento en el número de rotaciones inducidas en los primeros 20 minutos, se hace estadísticamente significativo once días después de iniciado el ciclo de tratamiento. El grupo control tratado con solución salina no mostró cambios significativos en su conducta de giro durante el período de evaluación. Además, se observó en el grupo tratado con L-DOPA/Benserazida, una disminución en el tiempo necesario para alcanzar la máxima respuesta motora después de la administración del medicamento (respuesta de pico de dosis). De conjunto, estos datos demuestran una sensibilización conductual de los ratones hemiparkinsonianos tratados crónicamente con L-DOPA.

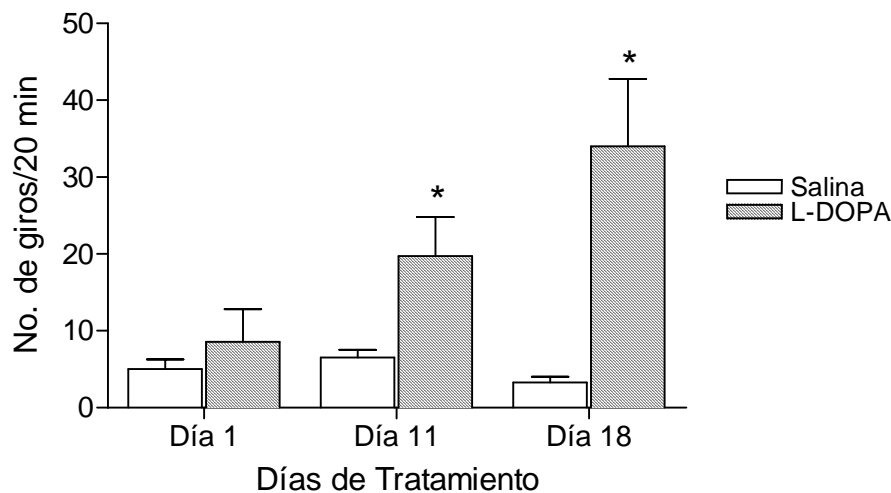


Figura 13. Cuantificación de las rotaciones 20 min después de inyectada la L-DOPA o la solución salina. Pasados 11 días de tratamiento, aparece un incremento significativo en el número de rotaciones inducidas por la L-DOPA. Las barras representan la media \pm ESM (* $p < 0.05$ Wilcoxon para muestras pareadas ($Z = 1.94, 2.01$) comparado con el primer día de tratamiento, $n = 7$).

D. Expresión de ARNm de neuropéptidos en tejido cerebral de ratones hemiparkinsonianos tratados crónicamente con L-DOPA

Como en nuestro estudio se utilizaron animales hemilesionados, los cambios en la expresión de ARNm para los neuropéptidos estudiados en el cuerpo estriado lesionado, se expresan como porcentaje (\pm ESM) de la expresión en el cuerpo estriado contralateral (no lesionado) del mismo animal.

- Expresión de ARNm para la prodinorfina en el cuerpo estriado

La distribución de ARNm para la prodinorfina en el cuerpo estriado de ratones controles (falsos operados) fue altamente heterogénea. Esta distribución heterogénea fue observada en el estriado de animales

hemiparkinsonizados, tanto los tratados con salina como los tratados crónicamente con L-DOPA que desarrollaron disquinesias.

En el grupo de animales con lesión unilateral de la vía nigroestriatal por 6-OHDA, se observó una disminución en la expresión de ARNm para la prodinorfina en el cuerpo estriado ipsilateral a la lesión, en comparación con el lado contralateral. Esta disminución fue estadísticamente significativa cuando se analizó el cuerpo estriado como un todo ($p < 0.05$) (Fig. 14). Además, fue evidente una heterogeneidad en la expresión de ARNm para la prodinorfina entre las diferentes partes de los núcleos caudado-putamen.

La expresión de ARNm para este neuropéptido en la región medial del cuerpo estriado no mostró diferencias significativas entre los dos hemisferios de un mismo animal, ni entre los distintos grupos evaluados. Sin embargo, en la porción lateral del cuerpo estriado ipsilateral a la lesión, particularmente en las zonas de este núcleo donde fue inyectada la neurotoxina, se observó una disminución de la expresión de ARNm para la prodinorfina en comparación con esa misma región en el hemisferio contralateral (75%) (Fig. 14). Por otro lado, esta disminución fue altamente significativa cuando se compararon los niveles de transcripción para la prodinorfina entre los animales lesionados con 6-OHDA y los falsos operados ($p < 0.05$). Estos resultados nos hacen pensar que existe una relación topográfica entre la denervación dopaminérgica del cuerpo estriado y la disminución en la expresión de prodinorfina en esta región.

El tratamiento crónico con L-DOPA, revierte las modificaciones en la expresión de ARNm para la prodinorfina inducidas por la lesión con 6-OHDA (Fig. 14). Al igual que en los grupos controles: falsos operados y lesionados, en este grupo los niveles de transcripción de prodinorfina en la porción medial y lateral del cuerpo estriado mostraron una respuesta heterogénea. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de ARNm para la prodinorfina en la región medial del cuerpo estriado después del tratamiento crónico con L-DOPA. Al examinar la región lateral de esta estructura, se observó un incremento en la expresión de ARNm después del tratamiento crónico con L-DOPA que fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) al compararlo tanto con el grupo falso operado como con el lesionado (Fig. 14).

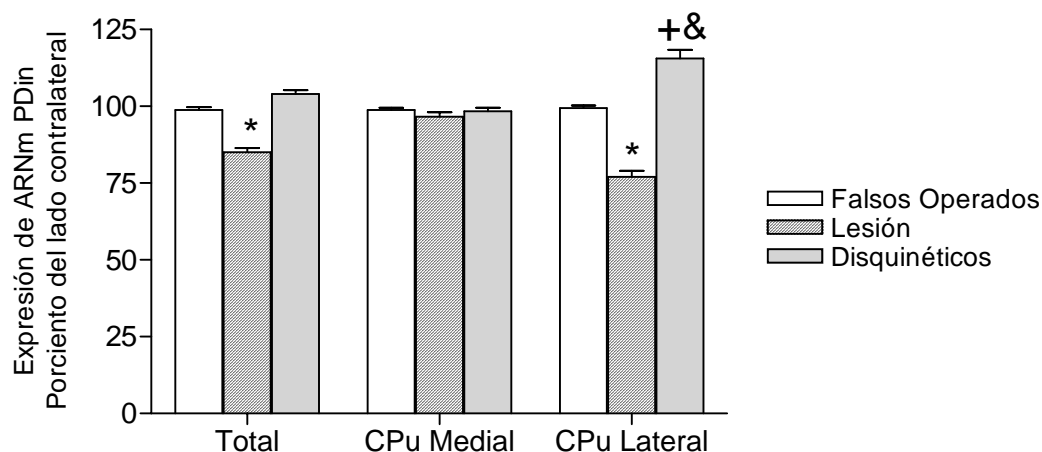


Figura 14. Expresión de ARNm para la prodinorfina en el cuerpo estriado. El tratamiento crónico con L-DOPA/Benserazida en ratones con lesión de la vía nigroestriatal incrementa la expresión de ARNm para la prodinorfina en el cuerpo estriado. Las barras representan los valores medios \pm ESM (* $p < 0.05$, $t = -2.28$ (Total: Lesión vs Falsos Operados), $t = 3.446$, (CPu Lateral: Lesión vs Falsos Operados) (prueba t); + $p < 0.05$, $T = 96$ (Prueba de suma de rangos Mann-Whitney, Disquinéticos vs Falsos Operados); & $p < 0.05$, $t = -3.166$ (CPu Lateral: Disquinéticos vs Lesión) (prueba t). (G. Falsos Operados $n = 12$; G. Lesión $n = 12$; G. Disquinéticos $n = 24$). Cpu: caudado/putamen.

- Expresión de ARNm para la pre-proencefalina en el cuerpo estriado

La expresión de ARNm para la pre-proencefalina en el cuerpo estriado del grupo control (falsos operados) mostró un ligero gradiente rostrocaudal, teniendo mayor densidad en la parte rostral de este núcleo. No se observaron diferencias en la transcripción para la pre-proencefalina, entre los diferentes grupos experimentales, cuando el cuerpo estriado ipsilateral a la lesión fue estudiado en su totalidad (Fig. 15).

Cuando las cuantificaciones fueron hechas topográficamente (región medial y región lateral), no se encontraron cambios en la intensidad de la señal de la región medial del cuerpo estriado de estos dos últimos grupos al compararlas con el grupo control. De manera similar en la porción lateral de este núcleo el grupo lesionado y tratado con solución salina tampoco mostró diferencias significativas en la expresión de ARNm para la pre-proencefalina en relación con el grupo falso operado. Sin embargo, en esta última región, en el grupo lesionado y tratado crónicamente con L-DOPA, se encontró un aumento estadísticamente significativo ($118 \pm 2.4\%$, $p < 0.05$) de la transcripción de este neuropéptido en el cuerpo estriado ipsilateral a la lesión al compararlo con el grupo control (falsos operados) (Fig. 15).

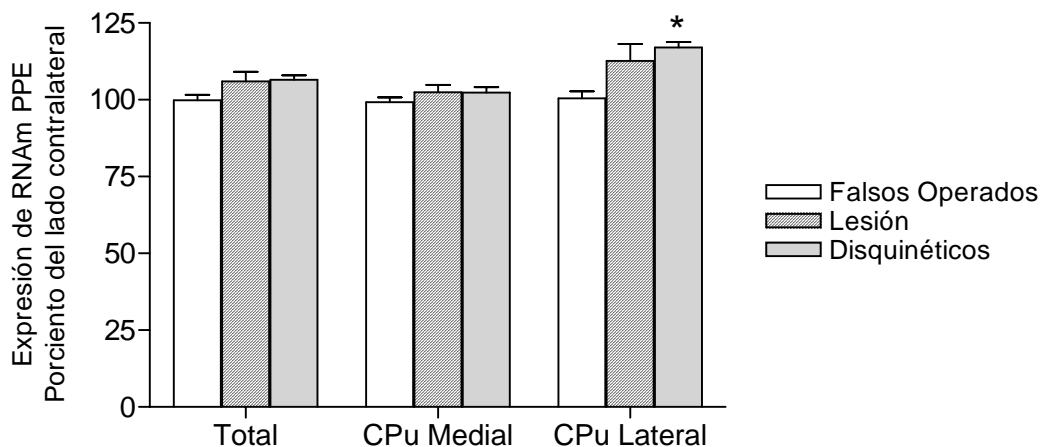


Figura 15. Expresión de ARNm para la pre-proencefalina. El tratamiento crónico con L-DOPA/Benserazida en ratones con lesión de la vía nigroestriatal incrementa la expresión de ARNm para la pre-proencefalina en el cuerpo estriado lateral. Los valores de ARNm para el neuropéptido en el hemisferio lesionado son expresados como porcentaje de los valores del lado contralateral (no lesionado). Las barras representan los valores medios \pm ESM (* $p < 0.05$, $t = -2.696$ comparado con el grupo falso operado, Prueba t). (G. Falso Operado $n = 12$; G. Lesión $n = 12$; G. Disquinéticos $n = 24$). Cpu: caudado/putamen.

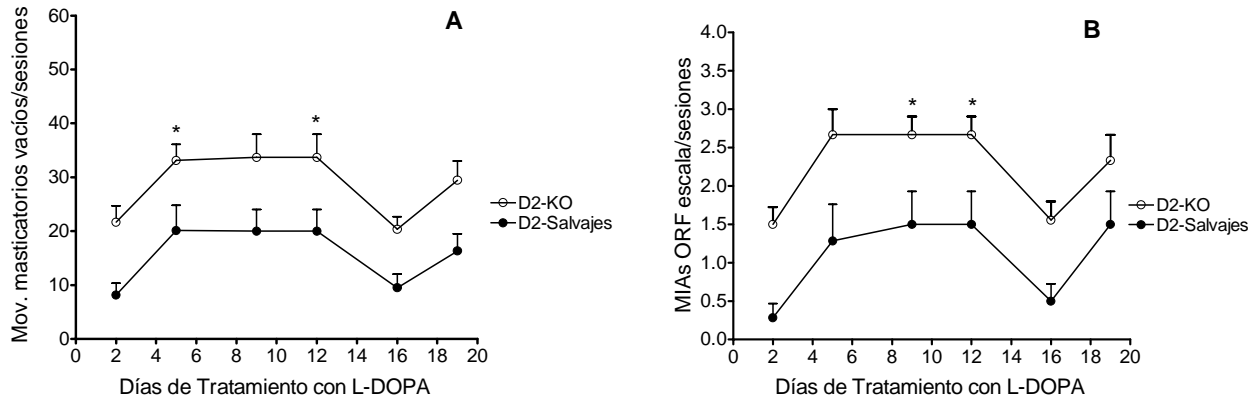
De los resultados hasta aquí expuestos podemos inferir que el tratamiento crónico con L-DOPA, en ratones hemiparkinsonianos induce la aparición de movimientos involuntarios anormales, similares a las disquinesias presentes en el humano y modifica la expresión de neuropéptidos en las neuronas estriatales. Esto hace posible considerar este modelo experimental como adecuado para el estudio de las bases etiopatogénicas de esta importante complicación motora de la EP crónicamente tratada con L-DOPA.

II. Tratamiento crónico con L-DOPA en ratones que carecen de receptores dopaminérgicos D_2 hemiparkinsonizados y evaluación conductual

El tratamiento crónico con L-DOPA/Benserazida, indujo el desarrollo de movimientos involuntarios anormales en los ratones mutantes KO- D_2 , los cuales fueron estadísticamente significativos con respecto a los grupos controles tratados con salina (datos no mostrados).

Al igual que para los ratones genotipo salvaje, no todos los animales que recibieron tratamiento con L-DOPA desarrollaron disquinesias (6 de los 10 tratados) en el período en que fueron tratados (23 días). La incidencia e intensidad de los MIA fueron máximas entre los 30 y 60 minutos después de la administración de L-DOPA. A partir de los 60 minutos, las disquinesias inducidas por L-DOPA fueron disminuyendo en intensidad de manera gradual y 120 minutos después de la administración del medicamento no se observaban movimientos involuntarios anormales.

Al evaluar las disquinesias orofaciales en ratones mutantes, que carecen de receptores D_2 , encontramos un ligero aumento en la frecuencia e intensidad de estos movimientos con los días de tratamiento con L-DOPA/Benserazida. Sin embargo, estos ratones, desde las primeras evaluaciones hasta las últimas,



mostraron una frecuencia e intensidad de movimientos orofaciales mayor que los ratones salvajes ($p < 0.05$) (Fig. 16).

*Figura 16. Movimientos orofaciales inducidos por el tratamiento crónico con L-DOPA en ratones salvajes y mutantes KO- D_2 lesionados previamente con 6-OHDA y su evolución en el tiempo. A Se muestran los valores medios \pm ESM de los movimientos masticatorios vacíos cuantificados durante el período de evaluación en cada sesión de trabajo (Análisis de varianza de rangos de una vía Kruskal – Wallis, $H = 43.78$, * $p < 0.05$, $Q = 4.2$, Método de Dunn). B Se muestran los valores medios \pm ESM de disquinesias orofaciales cuantificadas siguiendo la escala (Análisis de varianza de rangos de una vía Kruskal – Wallis, $H = 41.388$, * $p < 0.05$, $Q = 3.96$, Método de Dunn, comparado con el grupo D2-salvaje). (D2-KO, $n = 6$; D2-salvajes $n = 7$)*

A diferencia de lo encontrado con los movimientos orofaciales, los movimientos de las extremidades, las disquinesias locomotoras y las disquinesias axiales fueron menos evidentes en los ratones mutantes KO- D_2 que en los de genotipo salvaje. En el grupo de ratones mutantes, no se observó un aumento significativo en la frecuencia e intensidad de estos MIAs con el tratamiento crónico con L-DOPA/Benserazida. A partir del quinto día de tratamiento con L-DOPA/Benserazida, se observaron diferencias significativas entre las disquinesias de extremidades desarrolladas por los ratones mutantes y los de genotipo salvaje. Por otro lado, a partir de los días nueve y doce de tratamiento fueron evidentes diferencias significativas entre las disquinesias locomotoras y axiales, respectivamente, desarrolladas por cada uno de los grupos (Fig. 17).

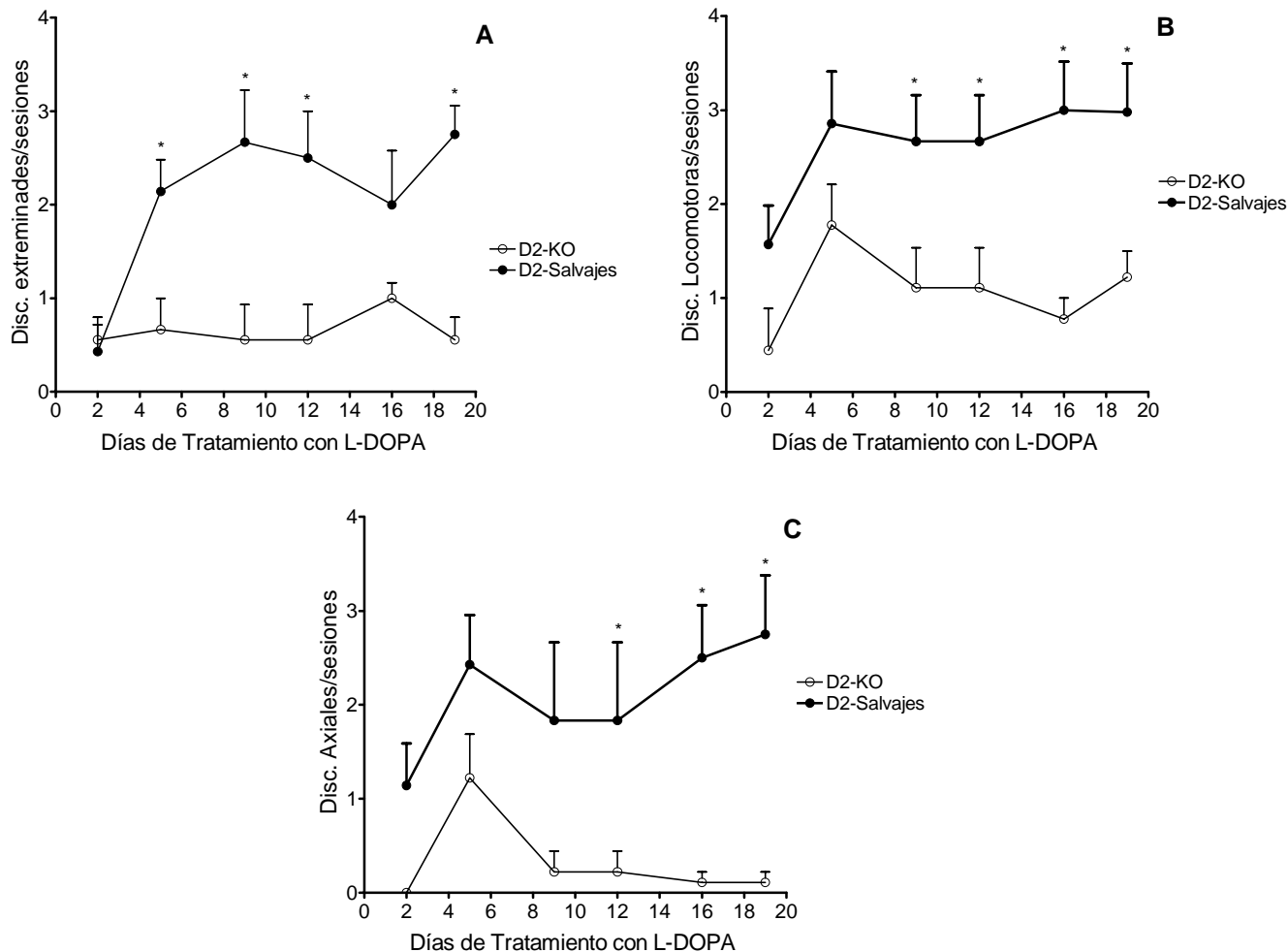


Figura 17. Movimientos involuntarios anormales inducidos por el tratamiento crónico con levodopa en ratones mutantes KO-D₂ hemiparkinsonizados y salvajes. A. Evolución de las disquinesias de las extremidades (Análisis de varianza de rangos de una vía Kruskal–Wallis, $H=35.694$, $*p<0.05$, Método de Dunn). **B.** Se muestran los movimientos anormales locomotores inducidos por el tratamiento crónico con levodopa (Análisis de varianza de rangos de una vía Kruskal–Wallis, $H=29.651$, $*p<0.05$, Método de Dunn). **C.** Aparecen las disquinesias axiales inducidas por el tratamiento crónico con levodopa (Análisis de varianza de rangos de una vía Kruskal–Wallis, $H=34.055$, $*p<0.05$, Método de Dunn, comparado con el grupo D2-KO). (D2-KO, $n=6$; D2-salvajes $n=7$).

Los análisis estadísticos revelaron además, que no existen diferencias significativas en la intensidad de las disquinesias (cuantificada a través de la escala), entre el primero y último día de evaluación para los cuatro subtipos de MIAs evaluados en los ratones mutantes KO-D₂ (Fig. 17). En estos ratones, el tratamiento crónico con L-DOPA/Benserazida indujo solamente un ligero incremento en la intensidad de las disquinesias orofaciales y locomotoras sin apenas modificar las disquinesias axiales y de extremidad. Estos resultados hacen pensar que la estimulación crónica de los receptores dopaminérgicos D₂, está estrechamente relacionada con la aparición de estas disquinesias (Fig. 17).

Cambios en la expresión de ARNm de Neuropeptidos estriales en ratones mutantes D₂ KO disquinéticos

- Expresión de ARNm para la prodinorfina en el cuerpo estriado

Los estudios en cerebros de animales mutantes KO-D₂, no mostraron grandes modificaciones en la expresión de ARNm para la prodinorfina. En este grupo la expresión de ARNm para este neuropeptido al ser cuantificada en el cuerpo estriado como un todo y en la región medial del mismo, no mostró diferencias significativas ni entre los dos hemisferios de un mismo animal, ni entre el grupo lesionado y el grupo tratado crónicamente con L-DOPA (Fig. 18). Por otro lado, en la región lateral del cuerpo estriado de ratones tratados crónicamente con levodopa, tampoco se observó diferencias estadísticamente significativas en la expresión de ARNm para la prodinorfina con respecto al grupo lesionado y tratado con salina.

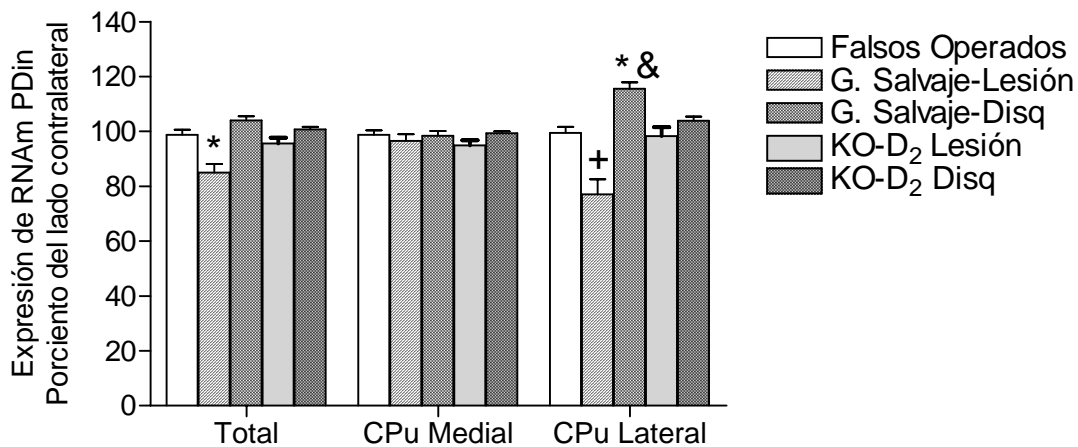


Figura 18. Cuantificación de la expresión de ARNm para la prodinorfina en los distintos grupos experimentales. Los valores de ARNm para el neuropeptido en el hemisferio lesionado son expresados como porcentaje de los valores del lado contralateral (no lesionado). Las barras representan la media \pm ESM (* $p < 0.05$, $t = -2.28$ (prueba t, Total: G. Salvaje-lesión vs falsos operados), $T = 96$ (Prueba de suma de rangos Mann-Whitney, CPu Lateral: G. Salvaje-Disquinéticos vs falsos operados); + $p < 0.05$, $t = 3.446$ (prueba t, G. Salvaje-Lesión vs falsos operados); & $p < 0.05$, $T = -3.166$, (prueba t, CPu Lateral: G. Salvaje-Lesión vs falsos operados). (G. Falsos operados $n = 12$; G. Salvaje-Lesión $n = 12$; G. Salvaje-Disquinéticos $n = 24$, G. KO-D₂ – Lesión $n = 12$; G. KO-D₂ – Disquinéticos $n = 36$). Cpu: caudado/putamen.

- Expresión de ARNm para la pre-proencefalina en el cuerpo estriado.

No se encontraron diferencias significativas en la expresión de ARNm para la Pre-Proencefalina, en los estudios realizados en los grupos de animales KO-D₂ (Fig. 19). La expresión del ARNm para este neuropeptido fue similar en ambos hemisferios (lesionado y no lesionado) tanto en el grupo con lesión como en el tratado crónicamente con L-DOPA.

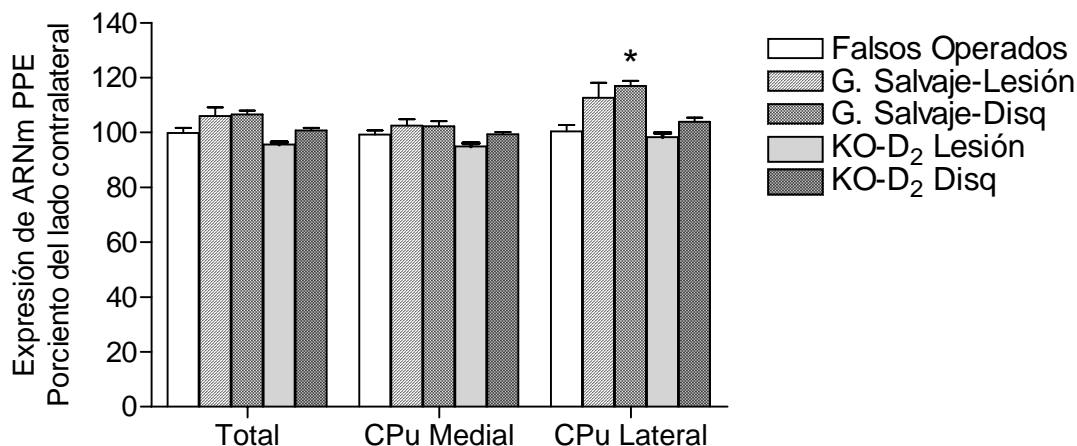


Figura 19. Cuantificación de la expresión de ARNm para la pre-proencefalina en los distintos grupos experimentales. Los valores de ARNm para el neuropéptido en el hemisferio lesionado son expresados como porcentaje de los valores del lado contralateral (no lesionado). Las barras representan la media \pm ESM (* $p < 0.05$, $t = -2.696$ comparado con el grupo falsos operados, Prueba t). (G. Falsos Operados $n = 12$; G. Salvaje-Lesión $n = 12$; G. Salvaje-Disquinéticos $n = 24$, G. KO-D₂ – Lesión $n = 12$; G. KO-D₂ – Disquinéticos $n = 36$). Cpu: caudado/putamen.

III. Métodos de lesión y técnicas neurorestaurativas en modelos experimentales diseñados en ratas

A. Lesión con 6-OHDA en la SNc de ratas

- Evaluación de la conducta de giro inducida por agonistas dopaminérgicos

La conducta rotatoria inducida por D-anfetamina y por apomorfina fue evaluada cuatro semanas después de cirugía, en todos los animales lesionados. La respuesta conductual de las ratas con lesión unilateral de la vía nigroestriatal después de la administración de ambos agonistas dopaminérgicos fue análoga a la que ha sido descrita, de manera frecuente, con anterioridad. La apomorfina (0.05 mg/kg) provocó de manera consistente una conducta rotacional contralateral al hemisferio lesionado; mientras que la administración de D-anfetamina (5.0 mg/kg) indujo rotaciones ipsilaterales. No fue posible demostrar una fuerte correlación ($r = -0.64$, $p > 0.05$) entre las rotaciones inducidas por D-anfetamina y las inducidas por apomorfina (prueba de correlación de Spearman). Existe un grupo de animales que después de inducida una lesión por 6-OHDA muestran una extensa conducta rotacional tras la administración de D-anfetamina y no después de la administración de apomorfina y viceversa (rotan con apomorfina y no con D-anfetamina) aunque esta última variante se observa en menor medida.

Para llevar a cabo la evaluación de las habilidades motoras de las extremidades anteriores en el modelo de lesión unilateral con 6-OHDA, en nuestras condiciones de trabajo, las ratas fueron divididas en 4 grupos experimentales tomando como criterio los resultados obtenidos de la evaluación de la conducta de giro:

I. Apo+/Anfe+: n=24.

II. Anfe+: n=22.

III. Apo+: n=14.

IV. Poco Rotadoras: n=17.

- Evaluación del uso de las extremidades anteriores en ratas con distintos grados de lesión de la vía nigroestriatal por 6- Hidroxidopamina

Ocho semanas después de la fecha de inyección de la neurotoxina 6-OHDA en la SNc fueron evaluadas las habilidades motoras de las extremidades anteriores en los diferentes grupos experimentales de animales lesionados y en un grupo de animales sanos (n= 20). Para evaluar el desempeño de los animales en la caja experimental se tomó como variable el número de trociscos que dejaban los animales después de estar 15 min en las cajas de experimentación.

Los animales sanos fueron capaces de retirar prácticamente todos los trociscos de alimentos a ambos lados de la escalerilla desde el primer día (Fig. 20A y B). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las habilidades motoras de ambas extremidades.

Por otro lado, todos los animales lesionados mostraron dificultad en alcanzar los alimentos con ambas extremidades, aunque el defecto motor fue más pronunciado en la extremidad contralateral (izquierda) al hemisferio lesionado en los grupos Apo+/Anfe+ y Apo+ (Fig. 20A y B).

En los grupos de animales lesionados, la comparación entre las extremidades derecha e izquierda dentro de un mismo grupo, mostró diferencias significativas (ANOVA $F_{4,178} = 58.32104$, $p < 0.05$ combinado con una prueba Newman Keuls) en los grupos: Apo+/Anfe+ y Apo+. En el grupo Anfe+ la diferencia entre las patas alcanzó significación estadística ($p < 0.05$) sólo al 6^{to} día de evaluación. Finalmente, en los grupos de malas rotadoras y sanas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las habilidades motoras de ambas extremidades (Datos no mostrados).

Los análisis estadísticos confirmaron, además, diferencias significativas (ANOVA: $F_{4,89} = 37.16$; $p < 0.05$, combinado con una prueba de Newman Keuls) en el uso de la extremidad izquierda, entre el grupo control sano y todos los grupos de animales lesionados ($p < 0.05$) y entre los grupos Apo+/Anfe+ y Apo+ al ser comparados con los animales del grupo Anfe+ y poco rotadores ($p < 0.05$) (Fig. 20A). Al comparar el uso de las extremidades anteriores derechas, encontramos que los grupos Anfe+ y Apo+, ocuparon una posición intermedia y no se diferenciaron de manera significativa de los grupos: Apo+/Anfe+ y poco rotadores, aunque sí del grupo sano. Sin embargo, el grupo Apo+/Anfe+ mostró diferencias significativas con los grupos poco rotadores y sanas (ANOVA: $F_{4,89} = 22.66$; $p < 0.05$, combinado con una prueba de Newman Keuls) (Fig. 20B).

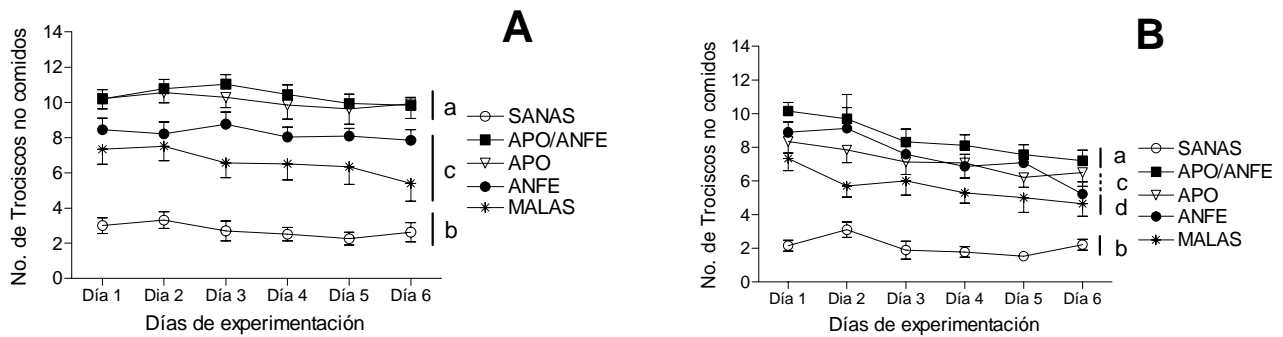


Figura 20. Habilidades manuales de las extremidades anteriores de ratas con lesión unilateral de la SNc. **A.** Comparación del uso de la extremidad izquierda, entre el grupo control sano y todos los grupos de animales lesionados. Las barras representan \pm ESM (ANOVA: $F_{4,89} = 37.16$, $p < 0.05$, combinado con una prueba Newman Keuls). **B.** Comparación del uso de la extremidad derecha (ANOVA $F_{4,89} = 22.66$, $p < 0.05$, combinado con una prueba Newman Keuls) Las barras representan \pm ESM mientras que las letras representan el resultado de la prueba comparativa a posteriori.

- Correlación entre la conducta de giro y la habilidad en el uso de las extremidades anteriores

El análisis de correlación entre los valores de las rotaciones y los resultados de la "Prueba de Habilidades Manuales" (tomando el número total de trociscos dejados por el animal en los 6 días que duró el experimento en cada extremidad) demostró que existe correlación estadísticamente significativa ($r = 0.45$; $p < 0.05$) (prueba de correlación de Spearman), entre la actividad rotatoria inducida por la apomorfina y las habilidades motoras de las extremidades anteriores del lado contralateral a la lesión (Fig. 21); mientras que no se observó una fuerte correlación entre esta última prueba y las rotaciones inducidas por D-anfetamina ($r = -0.7$; $p = 0.09$) (datos no mostrados).

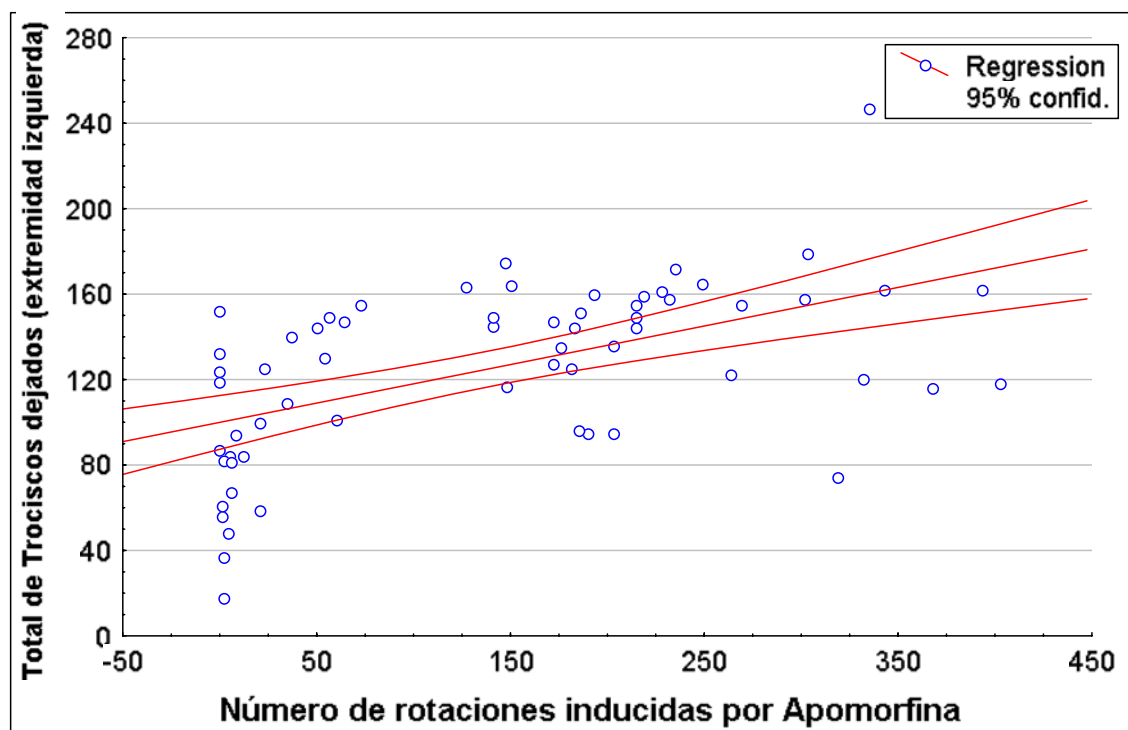


Figura 21. Correlación entre la actividad rotatoria inducida por la apomorfina y la "Prueba de habilidades motoras". Se muestra la extremidad contralateral a la lesión. Se demostró que existe correlación estadísticamente significativa ($r = 0.45$; $p < 0.05$) (prueba de correlación de Spearman), entre la actividad rotatoria inducida por la apomorfina y la "Prueba de habilidades motoras".

- Determinación de la concentración de Dopamina

La lesión completa con 6-OHDA provocó una disminución de la concentración de dopamina en el cuerpo estriado y la *substantia nigra pars compacta* ipsilateral. La media de concentración de dopamina estriatal en el grupo de animales lesionados fue de $0.36 \mu\text{g/g}$ de tejido, mientras que en la SNc fue de $0.28 \mu\text{g/g}$ de tejido, lo cual representa 38.9% y 47% del contenido de dopamina del estriado y la SNc de los animales sanos, respectivamente. Las concentraciones de 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA) de los animales lesionados estuvieron por debajo del límite de cuantificación de la técnica, tanto en el cuerpo estriado como en la SNc. 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 cuerpo estriado y la *substantia nigra*, respectivamente.

- Efecto de la inyección de 6-hidroxidopamina sobre las células que expresan tirosina hidroxilasa en sustancia negra

La inyección estereotáctica con la neurotoxina 6-OHDA en la SNc produjo la pérdida casi completa de células dopaminérgicas en dicha estructura, del hemisferio derecho, donde fue inyectada. Al realizar el estudio inmunohistoquímico, para la detección de células TH+, casi no se observaron células teñidas del lado lesionado, en tanto se evidencia una fuerte tinción en el lado contralateral a la lesión (Fig. 22). Esto confirma la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNc inducida por la inyección de 6-OHDA.

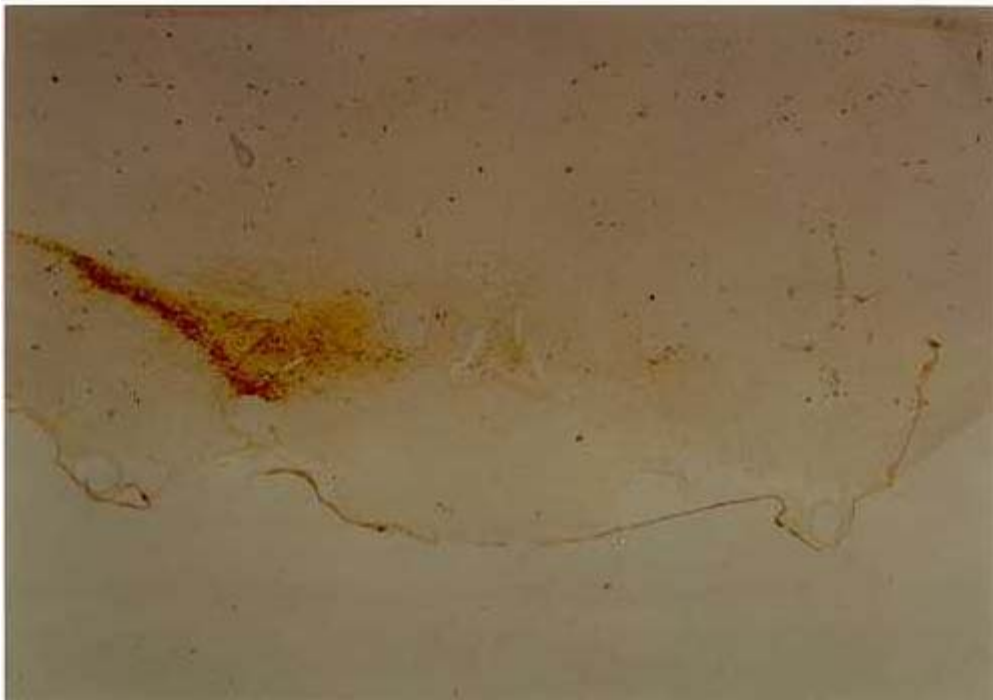


Figura 22. Fotografía de un corte coronal de cerebro de rata después de la inyección de 6-OHDA. Observe la ausencia células inmunorreactivas al anticuerpo anti-TH en la zona correspondiente a la substantia nigra pars compacta del hemisferio derecho. (5X)

B. Efectos de la denervación dopaminérgica del núcleo subtalámico inducida por inyección de 6-Hidroxidopamina en dicho núcleo

- Evaluación de la conducta de giro inducida por agonistas dopaminérgicos

La administración de D-anfetamina en el grupo al cual se le inyectó unilateralmente 6-OHDA en el NST, provocó una conducta de giro similar a la inducida por este mismo agonista dopaminérgico en las ratas con inyección de la neurotoxina en la SNc (Fig. 23A). Los análisis estadísticos no revelaron diferencias significativas entre ambos grupos. Por el contrario el grupo control sano, después de la administración de D- anfetamina, mostró un aumento en la actividad motora general, pero una actividad rotatoria azarosa, donde no hay un predominio de rotaciones en un sólo sentido. Este último grupo mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto a los dos anteriores para esta conducta (Fig. 23A).

La administración de apomorfina evocó una respuesta diferente, en los grupos experimentales (Fig. 23B). Las ratas con lesión de neuronas dopaminérgicas inducida por la inyección de 6-OHDA en la SNc mostraron una conducta de giro intensa en sentido contralateral al hemisferio lesionado, significativamente mayor que el resto de los grupos ($p < 0.05$). Por otro lado, el grupo con lesión en el núcleo subtalámico, no mostró diferencias significativas en la conducta de giro evocada por la apomorfina en relación con el grupo control sano ($p = 0.34$, Prueba de U de Mann-Whitney) (Fig. 23B). El número de rotaciones en el grupo con lesión del NST fue inferior a 150 giros en 45 min., que es el criterio rotacional considerado por muchos autores, de una denervación nigroestriatal mayor del 80%.

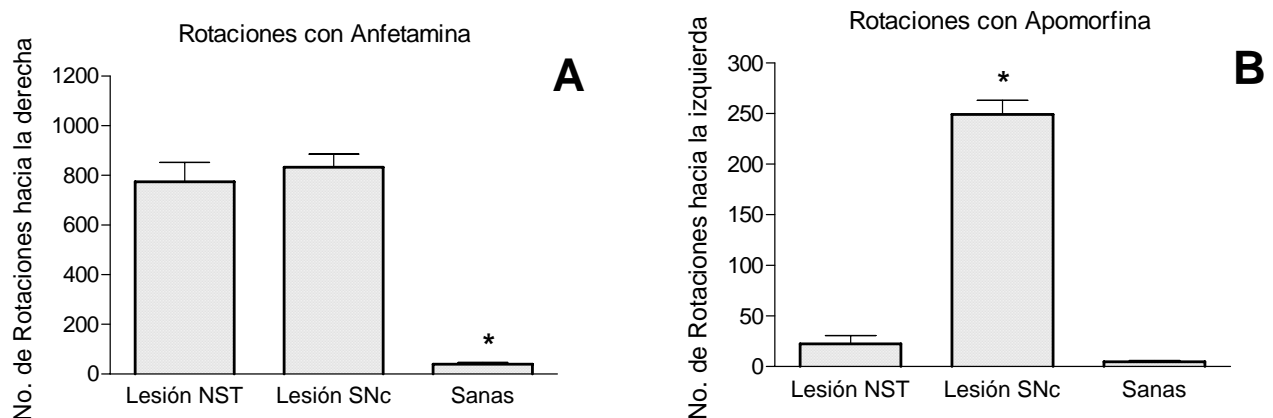


Figura 23. Conducta de giro inducida por agonistas dopaminérgicos en ratas con denervación dopaminérgica secundaria a la inyección unilateral de 6-OHDA en la SNc o el NST. **A** Se muestran las medias \pm error estándar de la media de las rotaciones inducidas por D-anfetamina en todos los grupos experimentales (Análisis de varianza de rangos de una vía Kruskal –Wallis, $H(2, N=72) = 41.33506$, $* p < 0.05$, $U = 13.0$, Prueba de U de Mann-Whitney). **B** Aparecen las medias \pm error estándar de la media de las rotaciones inducidas por apomorfina en todos los grupos experimentales (Análisis de varianza de rangos de una vía Kruskal –Wallis, $H(2, N=71) = 43.01231$, $* p < 0.01$, $U = 0.0$, Prueba de U de Mann-Whitney, grupo lesión en SNc vs grupo con lesión en NST y grupo sanas).

- Evaluación del uso de las extremidades anteriores en ratas con lesión inducida por la inyección de 6-OHDA en el núcleo subtalámico o la *Substantia nigra pars compacta*

Ocho semanas después de la fecha de inyección de la neurotoxina 6-OHDA, fueron evaluadas las habilidades motoras de las extremidades anteriores en ambos grupos experimentales de animales lesionados y en un grupo de animales sanos ($n = 20$).

Al igual que en el experimento anterior los animales sanos fueron capaces de retirar prácticamente todos los trociscos de alimentos en ambos lados de la escalerilla (Fig. 24A y B). La comparación de las habilidades motoras entre las extremidades (derecha e izquierda) dentro de este grupo no mostró diferencias significativas.

Los grupos de animales lesionados por inyección de 6-OHDA, tanto en SNc como en NST, mostraron dificultad en alcanzar los alimentos con ambas extremidades, aunque el defecto motor fue más pronunciado en la extremidad contralateral al hemisferio lesionado (Fig. 24A y B). Los análisis estadísticos confirmaron, diferencias significativas en el uso de la extremidad izquierda, entre el grupo control sano y ambos grupos de animales lesionados ($p < 0.05$) (Fig. 24A).

En el grupo con lesión en la SNc se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las habilidades motoras de la extremidad derecha y la izquierda (ANOVA $F_{1,38} = 17.62425$, $p < 0.05$ combinado con una prueba Newman Keuls); mientras que en el grupo con lesión en el NST no hubo diferencias significativas en el desempeño de ambas extremidades anteriores (ANOVA $F_{1,38} = 0.22606$) (Datos no mostrados).

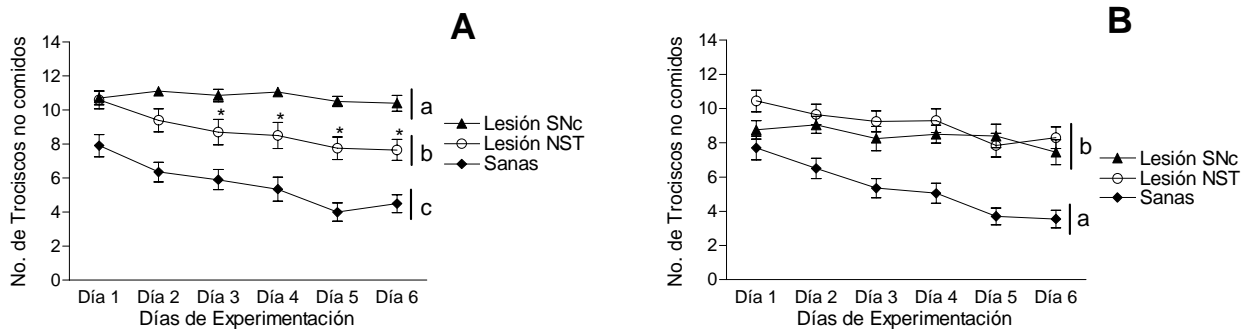


Figura 24. Habilidades motoras de las extremidades anteriores de ratas con lesión unilateral de la SNc o el NST. A. Extremidad anterior izquierda, se muestran los valores medios \pm ESM (ANOVA de dos vías con mediciones repetidas $F_{2,57} = 39.48$, $p < 0.05$ combinado con una prueba Newman Keuls). El grupo con lesión en el NST, a pesar de tener afectación en el desempeño motor, muestra una mejoría, que es significativa, en la ejecución de esta conducta en los días de experimentación (ANOVA de dos vías con mediciones repetidas $F_{5,285} = 13.38$, $p < 0.05$ combinado con una prueba Newman Keuls). B. Extremidad anterior derecha (ANOVA de dos vías con mediciones repetidas $F_{2,57} = 17.93$, $p < 0.05$ combinado con una prueba Newman Keuls).

Finalmente, los grupos de animales lesionados, tanto en NST como en SNc, mostraron dificultad en el uso de la extremidad anterior derecha (ipsilateral al hemisferio lesionado) y se diferenciaron de manera significativa del grupo control sano (Fig. 24B).

- Efecto de la inyección de 6-hidroxidopamina en el núcleo subtalámico sobre las células que expresan tirosina hidroxilasa en sustancia negra

La inyección estereotáctica unilateral de 6-OHDA en el núcleo subtalámico derecho induce una pérdida parcial de células dopaminérgicas TH+ en la *substantia nigra pars compacta* del hemisferio ipsilateral (Fig. 25).



Figura 25. Fotografía de un corte coronal de cerebro de rata después de la inyección de 6-OHDA en NST. Observe la ausencia de células inmunorreactivas al anticuerpo anti-TH en la zona correspondiente a la substantia nigra pars compacta del hemisferio derecho. (5X)

En resumen, los estudios conductuales y morfológicos evidenciaron que la inyección de 6-OHDA (una neurotoxina específica para células catecolaminérgicas) en el NST, induce una pérdida parcial de neuronas en la SNc, evidenciada por una disminución en la inmunoreactividad a la enzima tirosina hidroxilasa, en el hemisferio lesionado. La pérdida de la inervación dopaminérgica del NST provoca una asimetría en la conducta motora de los animales que se traduce en un peor desempeño en las habilidades de la extremidad anterior, que alcanza significación estadística sólo en la extremidad contralateral a la lesión. Además, la administración del agonista dopaminérgico D-anfetamina en estos animales induce una conducta motora rotacional intensa, ipsilateral al hemisferio lesionado. Esta asimetría es similar a la observada después de una lesión completa de la SNc, por inyección de la neurotoxina en dicha estructura. La administración de apomorfina induce una conducta rotatoria contralateral a la lesión que no se diferencia significativamente de la observada en los controles sanos.

C. Trasplante de células dopaminérgicas fetales en el núcleo subtalámico de ratas con lesión neurotóxica de la vía nigroestriatal

- Evaluación conductual anterior al trasplante

La actividad rotatoria inducida por D-anfetamina (5mg/kg, i.p.) y por apomorfina (0.05mg/kg, s.c.), se evaluó un mes después de la inyección intracerebral de 6-OHDA en todos los grupos experimentales excepto en el grupo de controles sanos. Sobre la base de los resultados obtenidos en estas pruebas, se seleccionaron 100 sujetos experimentales que cumplían con los criterios de lesión completa.

Al igual que en experimentos anteriores los animales sanos fueron capaces de retirar prácticamente todos los trociscos a ambos lados de la escalerilla, (como promedio dejaron entre 0 y 4 de un total de 14), y al comparar el uso de ambas extremidades no se encontraron diferencias significativas entre ellas (Fig. 26A y B). Sin embargo, la denervación dopaminérgica unilateral producida por la inyección de 6-OHDA en la SNc derecha, produjo un marcado déficit motor en la extremidad contralateral a la lesión y todos los animales mostraron dificultad en alcanzar los alimentos, lo cual se evidenció en la cantidad de trociscos no comidos (como promedio dejaron entre 8 y 10 de un total de 14) (Fig. 26A).

Aunque el defecto motor fue más pronunciado en la extremidad contralateral al hemisferio lesionado, como consecuencia de la lesión, también se hizo evidente, un déficit motor en la extremidad ipsilateral a la lesión (Fig. 26B). La comparación entre la extremidad derecha y la izquierda, mostró diferencias significativas (ANOVA de dos vías con mediciones repetidas $F_{1,112} = 47.40$, $p < 0.05$ combinado con una prueba Newman Keuls) en todos los grupos experimentales lesionados (Datos no mostrados).

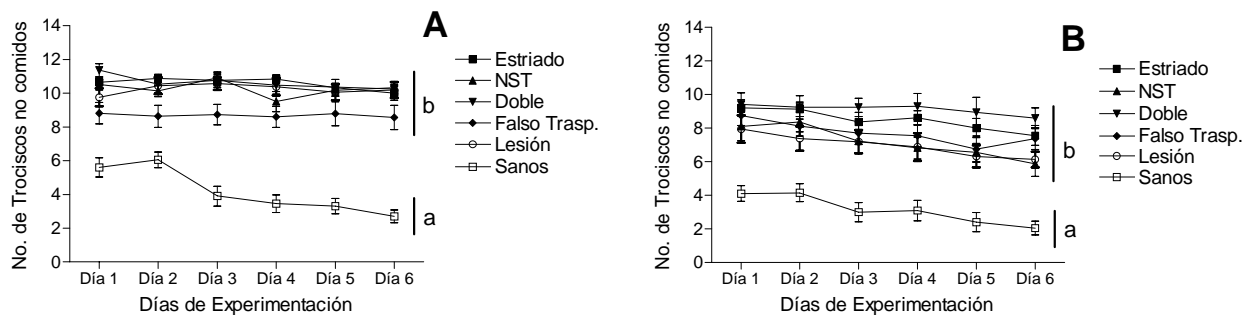


Figura 26. Habilidades motoras de las extremidades anteriores de ratas con lesión unilateral de la SNc (estudio pre-trasplante). A. Se muestra la comparación del uso de la extremidad izquierda entre el grupo control sano y todos los grupos experimentales antes de realizar el trasplante de células mesencefálicas fetales (ANOVA de dos vías con mediciones repetidas $F_{7,111} = 26.10$, $p < 0.05$ combinado con una prueba Newman Keuls). B. Extremidad anterior derecha (ANOVA de dos vías con mediciones repetidas $F_{7,111} = 11.53$, $p < 0.05$ combinado con una prueba Newman Keuls). En todos los casos se muestran los valores medios del número de trozos de alimentos dejados \pm error estándar de la media.

- Evaluación conductual posterior al trasplante

Después de realizadas las evaluaciones pre-trasplante, los distintos grupos experimentales fueron sometidos a los tratamientos (trasplante de células o inyección de medio de cultivo). En las evaluaciones pre-trasplantes los sujetos experimentales pertenecientes a los distintos grupos mostraron un comportamiento similar (rotaciones inducidas por D-anfetamina y apomorfina), no encontrándose diferencias significativas entre ellos (Análisis de varianza de rangos de una vía Kruskal –Wallis, $H_{(6, N=100)} = 5.488127$ $p = .4829$; $H_{(6, N=100)} = 8.194365$ $p = .2242$, D-anfetamina y apomorfina respectivamente). Posterior al primer mes de tratamiento, fue evaluada la conducta rotatoria inducida por la D-anfetamina en todos los grupos experimentales, excepto en el grupo de animales sanos. Los grupos controles con falso trasplante, no mostraron cambios significativos en la conducta de giro inducida por D-anfetamina, con respecto al estado pre-trasplante. La conducta de giro de estos grupos, en los distintos períodos evolutivos, no se diferenció de manera significativa de los resultados obtenidos en el grupo control lesionado (Datos no mostrados). Estos resultados permitieron unificar, para esta evaluación conductual, todos estos animales en un sólo grupo.

Las ratas con trasplante de células mesencefálicas fetales en el cuerpo estriado o simultáneamente en cuerpo estriado y núcleo subtalámico, mostraron una disminución significativa en la conducta de giro inducida por D-anfetamina en todas las evaluaciones posteriores al trasplante (Wilcoxon para muestras pareadas, $Z = 3.97$, $Z = 4.25$, $Z = 3.84$, $p < 0.05$; $Z = 3.46$, $Z = 3.05$, $Z = 3.46$, $p < 0.05$; para trasplante en estriado y simultáneo respectivamente). Esta disminución fue muy evidente en el transcurso del primer mes y se mantuvo con pocos cambios durante los dos meses siguientes de evaluación (Fig. 27).

Sin embargo, las ratas con trasplante de células mesencefálicas fetales en el núcleo subtalámico, no mostraron mejoría en la asimetría motora inducida por la D-anfetamina, en los distintos períodos de evaluación post-trasplante. En este grupo, se observó un ligero incremento en el número de giros inducidos por este medicamento, que sólo alcanzó significación estadística en el segundo mes después del trasplante (Wilcoxon para muestras pareadas, $Z = 1.96$; $p < 0.05$).

Al comparar el comportamiento de los distintos grupos experimentales posterior al trasplante se observó, que los grupos trasplantados en cuerpo estriado y simultáneamente en cuerpo estriado y NST, mostraron diferencias significativas, en todas las evaluaciones, en relación con los grupos controles (lesionados y falsos trasplantados) y trasplante en NST (Fig. 27).

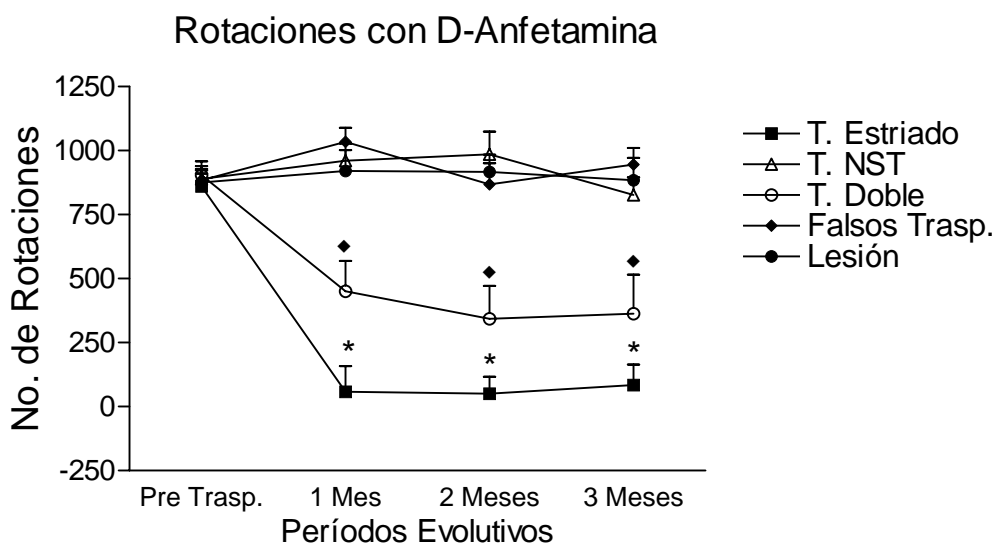


Figura 27. Actividad rotatoria inducida por D-anfetamina (5mg/Kg i.p). Los grupos con trasplante intraestriatal y trasplante simultáneo en cuerpo estriado y núcleo subtalámico se diferenciaron significativamente del comportamiento del resto de los grupos en todos los periodos de evaluaciones posteriores al trasplante (Análisis de varianza de rangos de una vía Kruskal –Wallis, 1^{er} mes: $H_{(6, N=105)} = 55.47$, * $p < 0.05$, $U = 47.0, 19.0, 44.0$ (Estriado); ♦ $p < 0.05$, $U = 15.0, 6.0, 13.5$ (Doble); Prueba de U de Mann-Whitney; 2^{do} mes: $H_{(6, N=100)} = 56.71$, $p < 0.05$, $U = 34.0, 3.0, 14.0$ (Estriado) $U = 16.0, 11.5, 6.5$ (Doble); Prueba de U de Mann-Whitney; 3^{er} mes: $H_{(6, N=100)} = 52.20$, $p < 0.05$, $U = 51.0, 6.0, 21.0$ (Estriado) $U = 26.0, 10.0, 12.0$ (Doble); Prueba de U de Mann-Whitney). Los puntos de la curva representan los valores de la media + error estándar de la media.(estriado $n=24$; NST $n= 21$, doble $n=16$; falsos trasp. $n=27$; lesión $n=16$).

En el 3^{er} mes posterior al trasplante fue evaluada además, la conducta de giro inducida por apomorfina en todos los grupos experimentales. Esta evaluación conductual fue sensiblemente modificada por los trasplantes ubicados en cuerpo estriado y simultáneamente en cuerpo estriado y núcleo subtalámico. En estos grupos, se observó una disminución estadísticamente significativa en el número de giros en relación con la evaluación pre-trasplante (Wilcoxon para muestras pareadas, $Z = 3.78$ y $Z = 3.18$, respectivamente; $p < 0.01$) (Fig. 28).

Por el contrario, el grupo con trasplante de células dopaminérgicas fetales en el núcleo subtalámico, mostró un incremento estadísticamente significativo del número de giros inducidos por este agonista, en relación con su estado previo al trasplante (Wilcoxon para muestras pareadas, $Z = 3.54$; $p < 0.01$) (Fig. 28). Los grupos controles: falsos trasplantados y lesionados, no mostraron cambios significativos en la conducta de giro inducida por apomorfina, con respecto al estado pre-trasplante y mostraron un comportamiento similar entre ellos. Estos resultados permitieron unificar, para esta evaluación conductual, todos los subgrupos de animales con falsos trasplantes, en un sólo grupo experimental. Por

otro lado, la conducta de giro de estos grupos no se diferenció de manera significativa de los resultados obtenidos en el grupo control lesionado (Fig. 28).

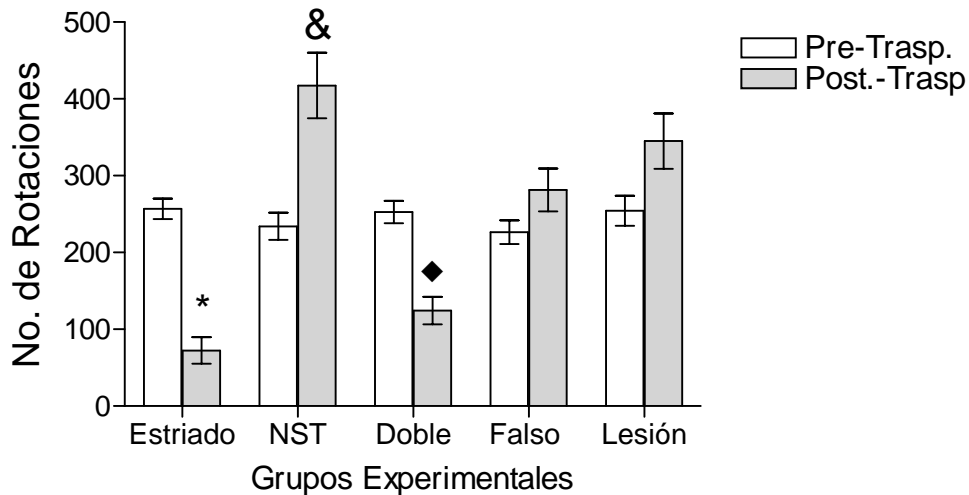


Figura 28. Actividad rotatoria inducida por apomorfina (0,05mg/Kg s.c.) Comparación entre los distintos grupos experimentales; Análisis de varianza de rangos de una vía Kruskal –Wallis, $H_{(6, N= 92)} = 54.09915$, $p < 0.01$; * $p < 0.01$ (estriado vs: NST $U = 26.0$; Doble $U = 24,0$; Falso $U = 20,0$, Prueba de U de Mann-Whitney) & $p < 0.01$ (NST vs:estriado $U = 26.0$; Doble $U = 11$; Falso $U = 148,0$, Prueba de U de Mann-Whitney); ♦ $p < 0.01$. Las barras representan los valores de la media + error estándar de la media. (estriado $n=19$; NST $n= 18$, doble $n=15$; falsos trasp. $n=25$; lesión $n=15$).

Al finalizar las pruebas inducidas por agonistas dopaminérgicos (alrededor de cuatro meses posterior al trasplante), fueron nuevamente evaluadas las habilidades motoras de las extremidades anteriores. Los trasplantes de células dopaminérgicas en el cuerpo estriado, núcleo subtalámico y simultáneamente en ambas regiones, no modificaron de manera importante el defecto motor presente en los animales lesionados, evaluado a través de la “Prueba de Habilidad Manual”. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con trasplante en las distintas estructuras y entre estos y el grupo control lesionado.

Al comparar la cantidad de trociscos dejados en las escalerillas, por la extremidad anterior izquierda (contralateral a la lesión), de los animales con trasplantes en relación con el grupo control sano, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos (ANOVA de dos vías con mediciones repetidas $F_{7, 103} = 34.72$, $p < 0.05$ combinado con una prueba Newman Keuls) (Fig. 29).

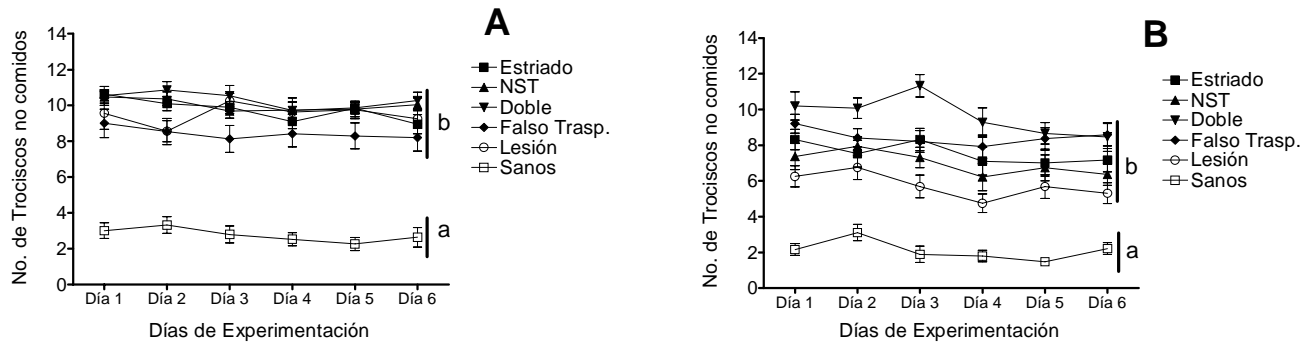


Figura 29. Habilidades motoras de las extremidades anteriores de ratas con lesión unilateral de la SNc y trasplante de células mesencefálicas fetales (estudio 4 meses post-trasplante). **A.** Se muestra la comparación del uso de la extremidad anterior izquierda entre el grupo control sano y todos los grupos experimentales después de realizar el trasplante de células mesencefálicas fetales (ANOVA de dos vías con mediciones repetidas $F_{7,103} = 34.72$, $p < 0.05$ combinado con una prueba Newman Keuls). **B.** Extremidad anterior derecha (ANOVA de dos vías con mediciones repetidas $F_{7,103} = 20.68$, $p < 0.05$ combinado con una prueba Newman Keuls). En todos los casos se muestran los valores medios del número de trozos de alimentos dejados \pm error estándar de la media. (estriado $n=19$, NST $n=19$, Doble $n=15$, falsos trasp. $n=24$, lesión $n=16$, sanas $n=19$)

Estas diferencias también fueron evidentes en la utilización de la extremidad anterior derecha (ipsilateral a la lesión). No obstante, a pesar de que existieron diferencias estadísticamente significativas en la realización de esta prueba con respecto al grupo control sano (ANOVA de dos vías con mediciones repetidas $F_{7,103} = 20.68$, $p < 0.05$ combinado con una prueba Newman Keuls), fue posible observar una ligera mejoría en la utilización de esta extremidad por parte de los animales trasplantados, con respecto al estado pre-trasplante (Fig. 29).

- Cuantificación de Factor de Crecimiento de Nervio

Con el objetivo de estudiar posibles mecanismos de acción de los trasplantes de células mesencefálicas fetales se evaluaron los cambios en las concentraciones de NGF ocurridos después del implante de las células.

La lesión en la SNc con 6-OHDA provocó una disminución de un 84% en los valores de NGF en el suero de ratas hemiparkinsonianas que fue estadísticamente significativa al compararla con los controles sanos ($p < 0.05$). El microtrasplante de células mesencefálicas fetales en cuerpo estriado y núcleo subtalámico, por separado, no revierte la disminución causada por la lesión con 6-OHDA. Por otro lado, el trasplante simultáneo en cuerpo estriado y NST, provoca un incremento estadísticamente significativo en las concentraciones en suero de este factor ($p < 0.05$) al ser comparado con el grupo lesionado (Fig. 30).

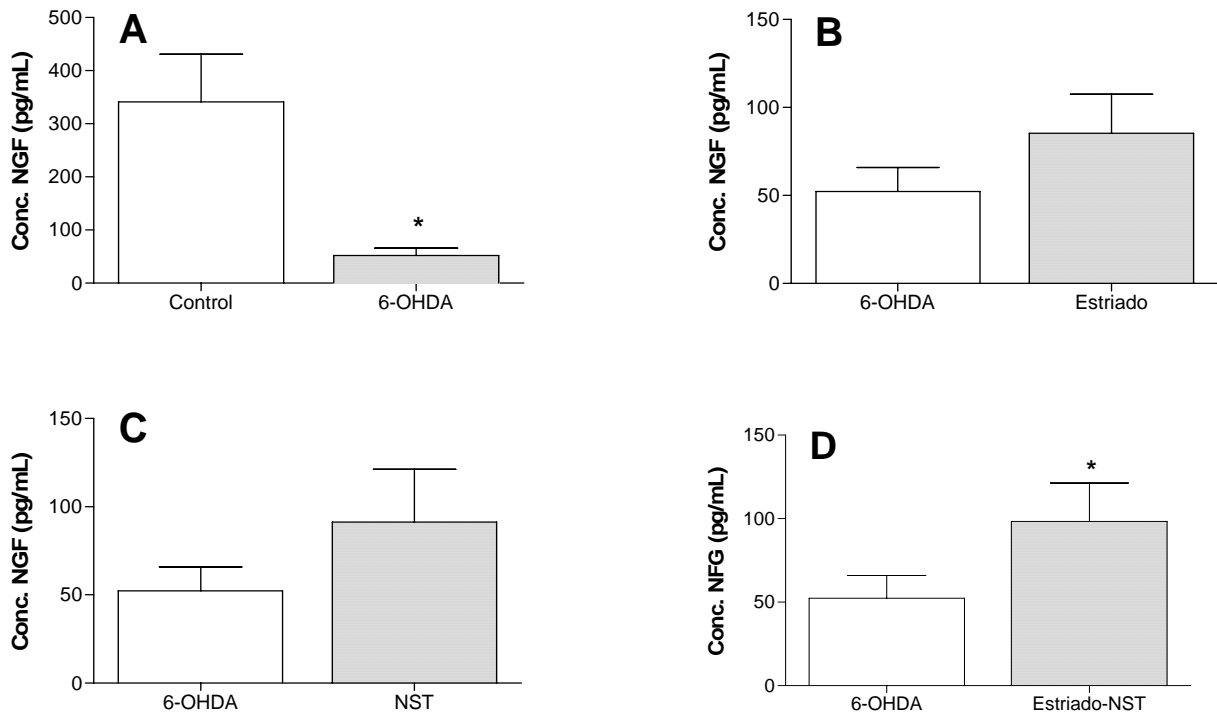


Figura 30. Concentración de factor de crecimiento de nervio en suero de ratas hemiparkinsonianas trasplantadas y controles. **A:** Se muestra la comparación entre el grupo control lesionado(6-OHDA, n=11) y el grupo control sano (Control, n=28). **B:** comparación entre las ratas lesionadas (6-OHDA, n=11) y las ratas lesionadas y trasplantadas en cuerpo estriado (n=20). **C:** como en B pero el trasplante en núcleo subtalámico (NST, n=14). **D:** trasplante en cuerpo estriado y NST (n=6). Las barras representan la media \pm el error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó por la prueba *t* de Student (* $p < 0.05$).

- Identificación de células que expresan tirosina hidroxilasa en el sitio del implante

En todos los grupos experimentales que recibieron trasplante de tejido mesencefálico fetal, tanto en el cuerpo estriado como en el núcleo subtalámico, los cortes de cerebro mostraban abundantes células TH⁺ y numerosas extensiones de fibras en el sitio del implante. En las estructuras trasplantadas, se observó un patrón similar de distribución de las células TH⁺. Las neuronas se agruparon fundamentalmente en la periferia del sitio del implante donde fue posible observar una gran densidad celular; a diferencia de la región central que contenía pocos cuerpos celulares. En la región del trasplante, fue posible observar además una red de fibras positivas a la TH.

Las células mesencefálicas fetales trasplantadas dentro del cuerpo estriado, mostraron una supervivencia notable. Los trasplantes intraestriatales se visualizaron circunscriptos a las áreas de los núcleos caudado-putamen. Se encontraron escasas células en la corteza cerebral y el cuerpo calloso en el trayecto seguido por la cánula de implante en muy pocos sujetos. En todos los casos se observó una gran cantidad de fibras asociadas al tejido implantado, que penetraban en todas direcciones y se integraban en el tejido hospedero, formando un halo de densa inmunorreactividad TH+ alrededor del trasplante (Fig. 31).

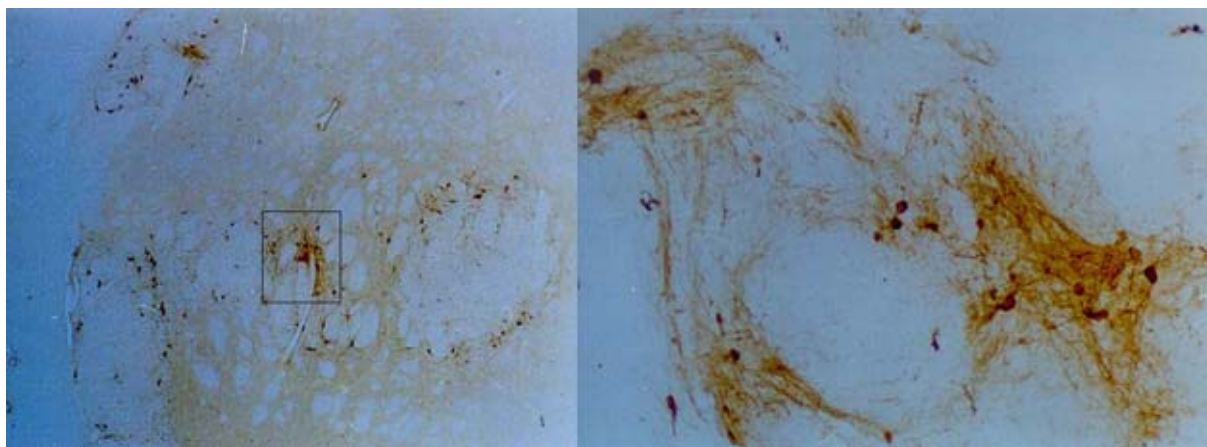


Figura 31. Fotografía de un corte coronal de cerebro de ratas con trasplante de células mesencefálicas fetales en el cuerpo estriado. Observe las células mesencefálicas fetales microtrasplantadas en el estriado inmunorreactivas al anticuerpo anti-TH. (10X)

Las células trasplantadas aparecieron dentro del cuerpo estriado de manera continua siguiendo una dirección antero-posterior, por el crecimiento abundante de fibras procedentes del trasplante, de acuerdo con los sitios previstos en las coordenadas estereotácticas utilizadas. En esta estructura, la distancia entre la primera y la última coordenada anteroposterior fue de 2.5 mm y los trasplantes tuvieron una extensión media de 3.5 mm.

Las células dopaminérgicas fetales trasplantadas dentro del núcleo subtalámico también mostraron una distribución homogénea de las células TH+ trasplantadas, con buena supervivencia (Fig. 32). A diferencia de lo observado en el trasplante en el cuerpo estriado, la tinción al anticuerpo anti-TH fue menos intensa y la supervivencia celular fue también menor que la observada en las células trasplantadas dentro de esta última estructura. En este grupo experimental, se observó una importante migración de células trasplantadas hacia estructuras vecinas a partir del sitio de inyección siguiendo una dirección anteroposterior, que abarcó 2.25 mm. Las células migraron fundamentalmente a través de la cápsula interna, aunque también se encontraron células en el núcleo entopeduncular y el área hipotalámica lateral.

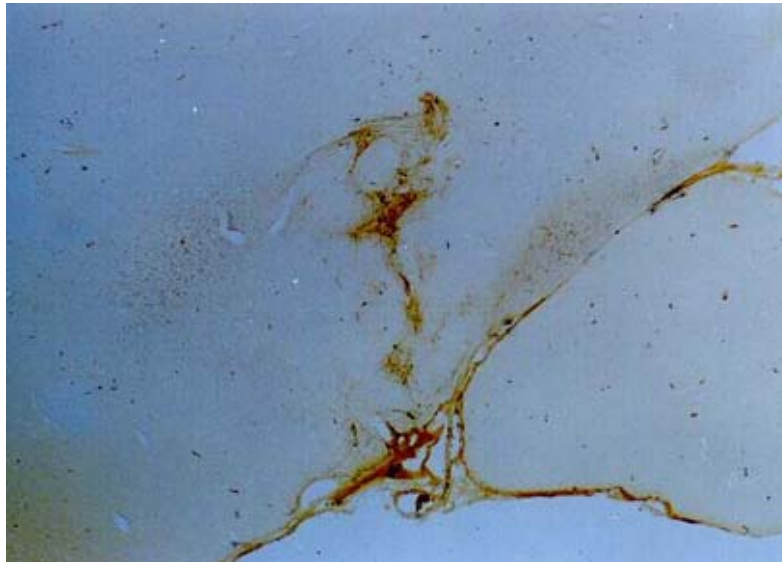


Figura 32. Fotografía de un corte coronal de cerebro de ratas con trasplante de células mesencefálicas fetales en el núcleo subtalámico. Observe las células mesencefálicas fetales microtrasplantadas en el núcleo subtalámico inmunorreactivas al anticuerpo anti-TH. (10X)

- Estimación del volumen del trasplante, densidad, diámetro y número total de células

Fueron seleccionados al azar 10 sujetos experimentales, pertenecientes a cada uno de los grupos con trasplante de células mesencefálicas fetales, para realizar los estudios morfométricos. Estos contemplaron: la determinación del número total de células TH+, el diámetro neuronal, el volumen y la densidad celular del trasplante (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados Morfométricos. Cada valor representa la media \pm DEM. * $P < 0.05$, Prueba t.

Estructura	Volumen del Trasplante (mm ³)	Número de células TH+ por mm ³ .	Número de células TH+.	Diámetro Neuronal.
Caudado-Putamen	1.71 \pm 0.29*	1047 \pm 153*	1832 \pm 450*	17.14 \pm 0.21*
N. subtalámico	1.01 \pm 0.10	472 \pm 54	487 \pm 79	12.68 \pm 0.22

El número de células presentes en el trasplante, así como el volumen y la densidad de este fue significativamente mayor en el grupo con trasplante intraestriatal ($t = -3.47$, $t = -2.84$, $t = -3.68$, $p < 0.05$, Prueba t) que en el trasplante ubicado en el NST. Por otra parte, las células trasplantadas dentro del cuerpo estriado mostraron diámetros neuronales mayores que las colocadas en el NST ($t = 13.79$, $p < 0.05$,

Prueba t), lo cual hace pensar que este constituyó un ambiente más favorable para el desarrollo de las células mesencefálicas fetales.

En resumen, nuestros resultados mostraron que la administración crónica e intermitente de levodopa en ratones previamente parkinsonizados induce la aparición de MIA similares a las disquinesias presentes en el humano. Estos MIA son posibles de inducir en ratones de cepas mutantes que carecen de receptores dopaminérgicos D_2 sometidos a un tratamiento similar. Sin embargo, la distribución somatotópica, la frecuencia e intensidad de estos varían en comparación con los presentes en cepas de ratones salvajes. Los ratones mutantes mostraron solamente un incremento en la intensidad de las disquinesias orofaciales sin apenas modificarse las disquinesias locomotoras, axiales y de extremidad, por el tratamiento crónico con levodopa. Estos resultados hacen pensar que la estimulación crónica de los receptores dopaminérgicos D_2 , está estrechamente relacionada con la aparición de las disquinesias. Por otro lado, se encontró que la pérdida de la innervación dopaminérgica del NST produce una asimetría en la conducta motora de los animales que se traduce en un peor desempeño en las habilidades motoras de las extremidades anteriores, que alcanza significación estadística sólo en la extremidad contralateral a la lesión. Además, la administración del agonista dopaminérgico: D-anfetamina en estos animales induce una conducta motora rotacional intensa, ipsilateral al hemisferio lesionado. Esta asimetría es similar a la observada después de una lesión completa de la SNc, por inyección de la neurotoxina en dicha estructura. Adicionalmente se muestra que las células mesencefálicas fetales trasplantadas en el cuerpo estriado y NST de animales adultos son capaces de sobrevivir, integrarse en el tejido hospedero e inducir modificaciones bioquímicas (incremento en las concentraciones séricas de NGF) y conductuales.

DISCUSIÓN.

I. Lesión con 6-Hidroxidopamina, tratamiento crónico con L-DOPA y evaluación conductual en modelos experimentales de hemiparkinsonismo diseñados en ratones

La 6-OHDA constituye la neurotoxina más frecuentemente empleada para inducir la degeneración de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas en modelos animales de EP en roedores[13;16;83;135-137;145;226;227]. La acumulación selectiva de esta neurotoxina en las neuronas dopaminérgicas causa la muerte celular probablemente por estrés oxidativo[139]. En los últimos años, se ha empleado exitosamente la lesión de la vía dopaminérgica nigroestriatal mediante la inyección intraestriatal de 6-OHDA, en la evaluación de novedosas estrategias neuroprotectoras e intervenciones restaurativas[228-230]. A diferencia del procedimiento convencional de inyección de la neurotoxina directamente en la SNc o en el haz de fibras ascendente de la vía nigroestriatal (vía mesoestriada), la inyección intraestriatal de 6-OHDA produce una degeneración retrógrada de las neuronas DA y por tanto, una disminución dependiente de la dosis, de la densidad de fibras dopaminérgicas que llegan cuerpo estriado[231;232]. Existen una serie de estudios en la literatura que brindan información detallada sobre el defecto conductual producido por la inyección intraestriatal de 6-OHDA en ratas y el tratamiento crónico de estas con L-DOPA. Sin embargo, este modelo ha sido muy poco caracterizado en ratones.

Nuestros resultados demuestran que la inyección intraestriatal de 6-OHDA en ratones produce una degeneración de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, aunque no todos los ratones muestran igual sensibilidad. El efecto de la neurotoxina fue mucho más intenso en la zona correspondiente a la SNc (A9) que en el área tegmental ventral (A8), la cual aparece bastante conservada.

Aunque la lesión nigroestriatal unilateral en ratas puede ser demostrada por la conducta de giro inducida por apomorfina y D-anfetamina[15;140;145;233-235], no existen reportes en la literatura que avalen la utilización de esta prueba en el modelo de hemiparkinsonismo inducido por 6-OHDA en ratón. Por otro lado, observaciones previas realizadas por otros autores muestran una gran variabilidad en la respuesta rotacional, inducida por D-anfetamina en ratas con inyección intraestriatal de 6-OHDA[236]. Por esta razón, nosotros utilizamos como criterio de lesión de neuronas dopaminérgicas y selección de los animales, los resultados de la evaluación de la expresión de ARNm para la tirosina hidroxilasa en la SNc y de la cuantificación de los sitios de recaptura de la DA en el cuerpo estriado. Estos estudios reflejaron un daño de las terminales dopaminérgicas que inervan en el cuerpo estriado y una reducción en el número de células dopaminérgicas de la SNc.

El mecanismo preciso que permite explicar el origen de las disquinesias inducidas por L-DOPA no se conoce en la actualidad. No obstante existe un amplio consenso acerca de que están relacionadas con

estimulación no fisiológica de receptores dopaminérgicos crónicamente denervados, que se acompaña de alteraciones en la expresión de proteínas y genes[71;93;160;237;238].

Nuestros resultados muestran que la administración repetida y pulsátil de L-DOPA en ratones hemiparkinsonizados, con amplia denervación dopaminérgica, induce la aparición gradual de una serie de movimientos disquinéticos y distónicos que afectan la cabeza, el tronco y las extremidades. Estos movimientos son muy similares a los observados en el modelo descrito en ratas y se asemejan a los que aparecen en pacientes parkinsonianos tratados crónicamente con L-DOPA, si bien en los humanos estos movimientos son más complejos[6;8;9;12;18;232;239].

En nuestro modelo en ratones, las disquinesias inducidas por L-DOPA se manifestaron como movimientos involuntarios anormales que aparecieron en el momento de máxima efectividad del tratamiento (pico de dosis). Estos movimientos anormales se desarrollaron gradualmente hasta aparecer en un 70% de los animales hemiparkinsonianos tratados de manera crónica e intermitente con L-DOPA y fueron divididos en varios subtipos de acuerdo a su distribución topográfica.

La distribución topográfica de los MIA fue altamente variable dentro de un mismo grupo de animales, aunque fue consistente en observaciones seriadas en un mismo animal, durante todo el período de tratamiento. Estos resultados son similares a los descritos por otros autores sobre las disquinesias inducidas por L-DOPA observadas en pacientes parkinsonianos[6], monos con parkinsonismo inducido por MPTP y tratados con L-DOPA[130;144;159;238] y ratas hemiparkinsonianas tratadas con L-DOPA[12;18;19;232].

Este trabajo constituye el primer reporte de un modelo experimental de disquinesias en ratón, inducidas por la administración pulsátil y crónica de una dosis constante de L-DOPA. Durante la preparación del reporte inicial del modelo, fue publicado otro modelo de disquinesias en ratones. En este reporte las disquinesias fueron inducidas utilizando dosis crecientes de L-DOPA hasta alcanzar una dosis de 54 mg/Kg de peso en un período de 35 días[240]. Los MIA encontrados por este grupo de trabajo son similares a los descritos por nosotros. Sin embargo, en nuestra serie fue posible demostrar la presencia de un incremento progresivo en la intensidad de los MIA con la duración del tratamiento con L-DOPA. Por otro lado, este incremento en los MIA fue en respuesta a la administración intermitente de la misma dosis de L-DOPA, lo que hace que este modelo se asemeje más al esquema de tratamiento con L-DOPA de los pacientes con EP.

Al igual que otros autores han descrito en el modelo de disquinesias en rata, nosotros encontramos una relación competitiva entre las disquinesias axiales y de extremidades y las disquinesias locomotoras[12;241;242]. Los ratones son animales cuadrúpedos que usan las dos extremidades

anteriores y las dos posteriores para realizar su actividad locomotora, aunque ellos pueden usar sus extremidades anteriores para llevarse los alimentos a la boca o realizar labores de acicalamiento estando en posición bípeda. Las disquinesias locomotoras se expresaron fundamentalmente cuando el animal se encontraba en posición cuadrúpeda, con sus cuatro patas apoyadas y consistían en giros muy apretados, describiendo círculos de pequeño diámetro, similares a los descritos en las ratas[19]. En contraste con esto, las disquinesias axiales y de extremidades se observaron cuando el animal se encontraba parado sobre sus extremidades posteriores o sentado. Esta localización de las disquinesias involucró solamente la extremidad anterior contralateral al cuerpo estriado lesionado. Sin embargo, ambos patrones de movimiento inducidos por el tratamiento crónico e intermitente con L-DOPA, tienen características similares a las disquinesias inducidas por L-DOPA que aparecen en pacientes con enfermedad de Parkinson, en cuanto a que: constituyen MIA, aparecen en el transcurso del tratamiento con L-DOPA, tienen un curso temporal similar, son más intensos durante el máximo efecto de la dosis y la intensidad de las disquinesias de “pico de dosis” aumenta con el tratamiento repetido[6;13;243].

Sensibilización conductual a la dopamina

La intensidad de la respuesta motora inducida por la levodopa puede aumentar después de la administración repetida de esta. Esta variación en la respuesta a la administración repetida de levodopa, se conoce como sensibilización y es uno de los mecanismos que se han implicado en el origen de las disquinesias inducidas por L-DOPA[244]. En nuestro trabajo, la sensibilización a la levodopa, se caracterizó por un incremento en el número de rotaciones contralaterales en respuesta a la L-DOPA y una disminución en el tiempo de comienzo de la respuesta. En el modelo de ratón, la sensibilización ocurrió gradualmente, comenzando alrededor del 4^{to} ó 6^{to} día de tratamiento. La sensibilización conductual se desarrolló paralelamente al desarrollo de las disquinesias. A pesar de que se observó una disminución en el tiempo de comienzo (latencia) de la respuesta a la L-DOPA, el curso temporal de esta fue similar. Estos resultados sustentan la posibilidad de que existan mecanismos fisiopatológicos similares para la sensibilización conductual de la conducta rotatoria y las disquinesias inducidas por L-DOPA.

Se ha planteado que la hipersensibilidad de receptores dopaminérgicos a la dopamina, inducida por denervación, puede ser uno de los mecanismos más importantes que subyacen en la aparición tanto de las disquinesias, como de la respuesta de sensibilización de las rotaciones contralaterales[12;19;245]. Sin embargo, existen reportes en la literatura que han demostrado que la conducta de sensibilización a la dopamina no está acompañada por un incremento en la densidad de receptores para la dopamina en el cuerpo estriado. No obstante, estos trabajos plantean que existen cambios en la cascada de eventos que se desencadenan después de la activación de los receptores dopaminérgicos, que pueden ser responsables de la sensibilización conductual observada[13;18;232;246]. Estos mecanismos han sido observados, además,

en el desarrollo de la sensibilización conductual que se correlaciona con un incremento en la expresión de receptores D₃ y de ARNm para D₃ en las neuronas que expresan receptores D₁[247-249].

Por otro lado, ha sido demostrado que las disquinesias y la sensibilización de la conducta rotatoria comparten mecanismos neuroquímicos similares, que incluyen un incremento en la expresión de dinorfina y encefalina[220;250] y en la expresión de genes de respuesta rápida[251;252] en el cuerpo estriado.

Concentraciones de Neuropéptidos

Estudios realizados en modelos experimentales de parkinsonismo tanto en ratas como en monos, han demostrado que la sensibilización conductual a la L-DOPA y las disquinesias inducidas por L-DOPA están relacionadas con una regulación a la alta del ARNm (up regulation) de precursores opiodes, en las neuronas del cuerpo estriado[18;220;249;253]. El aumento en la expresión de ARNm para la pre-proencefalina, también ha sido detectado en estudios *postmortem*, realizados en los núcleos caudado y putamen de pacientes parkinsonianos tratados crónicamente con L-DOPA[254].

Nosotros encontramos que la distribución de ARNm para la prodinorfina en el cuerpo estriado de ratones controles fue altamente heterogénea, lo cual está en concordancia con reportes previos que aparecen en la literatura[255]. La lesión de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal por 6-OHDA causó una disminución en la concentración de ARNm para la prodinorfina en el cuerpo estriado ipsilateral a la lesión; mientras que modificó muy poco las concentraciones de ARNm para la pre-proencefalina. Estos resultados están en concordancia con estudios previos, en la rata, que demuestran que la denervación de terminales dopaminérgicas del cuerpo estriado causa una disminución significativa en la expresión de ARNm para la prodinorfina con respecto a los controles normales[12;18;256;257]. En relación con los cambios inducidos por la lesión con 6-OHDA sobre la concentración de ARNm para la pre-proencefalina, los hallazgos son menos uniformes. A pesar de que hay autores que reportan un marcado aumento[256;257], otros no encuentran modificaciones significativas en este marcador tras la denervación dopaminérgica del cuerpo estriado[232;258].

La presencia de MIA inducidos por L-DOPA se correlaciona muy fuertemente con marcadores de actividad estriatal modulada por la DA, particularmente con las concentraciones de ARNm para la prodinorfina y la pre-proencefalina[12;18;256].

En nuestro estudio, se evidenció que la expresión de ARNm para la prodinorfina está incrementada en el cuerpo estriado de ratones después de 23 días de tratamiento crónico e intermitente con L-DOPA, con respecto al grupo falso operado y al grupo de animales con lesión de la vía nigro-estriatal. Este incremento fue más pronunciado en la región lateral que en la región medial del cuerpo estriado, lo cual se correspondió con el área de mayor lesión y ocurrió tanto en estriosomas como en la matriz. Un patrón

similar de expresión de ARNm de prodinorfina ha sido encontrado en experimentos de sensibilización conductual con tratamiento crónico con dosis intermitentes de cocaína o anfetamina en ratas[250] o monos[259]. Por otro lado, nosotros también encontramos un incremento significativo en la expresión de ARNm para la pre-proencefalina en la región lateral del cuerpo estriado de animales lesionados con 6-OHDA tratados crónicamente con L-DOPA que mostraban MIA.

El comportamiento de estas variables en los distintos grupos experimentales permite pensar que los cambios neuroquímicos y moleculares presentes en el cuerpo estriado con denervación dopaminérgica se correlacionaron con la aparición de MIA inducidos por la L-DOPA. Estos datos están en concordancia con resultados de estudios previos realizados en ratones lesionados y tratados con bajas dosis de L-DOPA, donde se estudian fenómenos de sensibilización conductual[221], y con estudios en ratas y monos parkinsonizados, tratados crónicamente con L-DOPA y con disquinesias[18;93;144;220].

Las neuronas que expresan ARNm para la prodinorfina, son las neuronas estriatales medianas, que expresan receptores D₁, y proyectan directamente a los núcleos de salida de los GB (vía directa). Alternativamente, las neuronas que contienen pre-proencefalina son neuronas estriatales medianas, que expresan receptores D₂, y afectan la actividad de las neuronas de los núcleos de salida de los GB, a través del globo pálido lateral y del núcleo subtalámico (vía indirecta). Johansson y col. encontraron una correlación negativa entre los niveles de ARNm para la prodinorfina en el cuerpo estriado denervado de dopamina y la densidad de receptores opiodes kappa en esta misma estructura[257]. Sin embargo, no encontraron correlación significativa entre las concentraciones estriatales de ARNm para prodinorfina y la densidad de receptores kappa en la *substantia nigra reticulata*, que constituyen el blanco primario de las neuronas de la vía directa. Además, tampoco encontraron diferencias significativas en el comportamiento de estas variables entre animales disquinéticos y controles lesionados[257]. Estos hallazgos sugieren que los receptores opiodes kappa, que se encuentran en los núcleos de salida de los GB, pueden ser regulados por otros factores además de la dinorfina liberada a partir de las neuronas de proyección del cuerpo estriado. Las neuronas de proyección del NST expresan receptores opiodes kappa[260], de manera que las neuronas estriatales que expresan encefalina pueden alterar la actividad de las neuronas que expresan receptores kappa de los núcleos de salida de los GB por afectación de la actividad de las neuronas del NST. Una explicación alternativa, a la participación de los péptidos opiodes en la modulación de la actividad de los núcleos de salida de los GB, está relacionada con la proyección glutamatérgica proveniente de corteza sensorimotora que reciben las neuronas de la porción lateral del cuerpo estriado. Se ha planteado que la respuesta motora disquinética a la L-DOPA está asociada con alteraciones en la plasticidad sináptica de la vía corticoestriatal que depende de la acción simultánea de la DA y el glutamato sobre las neuronas espinosas de mediano tamaño[13;261].

La aparición de disquinesias inducidas por L-DOPA, puede ser el resultado de poderosos mecanismos compensatorios, por medio de los cuales las neuronas del cuerpo estriado se adaptan a una disminución en la entrada de impulsos dopaminérgicos, tales como: aumento de la liberación presináptica de DA o cambios en la sensibilidad de receptores postsinápticos dopaminérgicos de las neuronas estriatales.

II. *Tratamiento crónico con L-DOPA en ratones hemiparkinsonizados que carecen de receptores dopaminérgicos D₂ y evaluación conductual*

La administración crónica de L-DOPA induce cambios en los receptores dopaminérgicos del cuerpo estriado denervado que podrían ser responsables de la aparición de disquinesias. Los estudios que han valorado la modificación de los receptores dopaminérgicos en monos parkinsonianos después de la administración de agonistas dopaminérgicos, por un tiempo prolongado, han mostrado resultados variables en dependencia del fármaco utilizado y su forma de administración (estimulación continua vs. pulsátil). No obstante, varios autores proponen que las disquinesias inducidas por L-DOPA son resultado de una actividad anormalmente baja de los núcleos de salida de los ganglios basales. De manera que los movimientos anormales estarían relacionados con una marcada inhibición, por parte de los fármacos dopaminérgicos, de las neuronas del cuerpo estriado que proyectan al GPI (vía indirecta), lo cual provocaría una desinhibición de las neuronas de este núcleo, un aumento de la inhibición del NST y subsecuentemente una acentuada disminución en la frecuencia de descarga de las neuronas del GPM[70;158;237;262-265].

Sin embargo, existen varios hallazgos experimentales que no están en total concordancia con esta interpretación fisiopatológica clásica. No se han demostrado diferencias en el grado de inhibición del GPI en el estado disquinético con respecto a la situación de beneficio motor sin disquinesia[64]. Por otra parte, estudios que cuantifican la expresión de ARNm para CO-1 (del inglés: *cytochrome oxidase subunit I*)[266] y de ARNm para GAD (del inglés: *glutamic acid decarboxilase*)[267], realizados mediante hibridación *in situ*, no encuentran aumento en el marcaje del GPI en monos disquinéticos, con respecto a monos parkinsonianos que no habían recibido tratamiento dopaminérgico. Por tanto, existen evidencias electrofisiológicas y metabólicas que no concuerdan con la interpretación clásica y que hacen que no pueda concluirse que el aumento de las aferencias al NST, al igual que su inhibición, ocurre debido a una hiperactividad aferente inhibitoria desde el GPI. Finalmente, tras la ablación del GPI, la administración de agonistas dopaminérgicos, lejos de inhibir el desarrollo de las disquinesias (como se derivaría de la interpretación clásica del modelo), incrementa su aparición[151]. Estos autores describieron, además, que los agonistas selectivos de receptores dopaminérgicos D₂ provocaron disquinesias más graves que las inducidas por los agonistas selectivos D₁ y los mixtos, lo cual resulta aún más contradictorio con la interpretación clásica, si se tiene en cuenta que la acción dopaminérgica sobre la vía indirecta ocurre a

través de receptores D₂. Estas contradicciones reflejan la falta de consenso que existe con respecto al papel que desempeñan los receptores dopaminérgicos en la génesis de las disquinesias.

La reciente generación de ratones mutantes deficientes en receptores dopaminérgicos, brinda una nueva herramienta que permite examinar hipótesis relacionadas con el papel específico de un subtipo de receptor dopaminérgico en la generación de las disquinesias inducidas por L-DOPA. Los resultados de nuestros experimentos indican que el tratamiento crónico con L-DOPA es capaz de inducir la aparición de movimientos involuntarios anormales tanto en ratones de cepas salvajes como en ratones con delección genética de los receptores dopaminérgicos D₂ hemiparkinsonizados, aunque la distribución somatotópica, la frecuencia e intensidad de estos movimientos varían entre estos dos grupos experimentales. Las disquinesias orofaciales estuvieron presentes con mayor frecuencia e intensidad en los ratones mutantes que en las cepas salvajes. Por otro lado, las disquinesias locomotoras, de extremidades y axiales fueron menos evidentes en los ratones con delección genética de los receptores D₂, los cuales mostraron una frecuencia e intensidad significativamente menor de estas. En este sentido resulta interesante señalar, que las disquinesias axiales se detectaron en muy pocos animales de este último grupo a partir del noveno día de evolución (en 1 ó 2 de un total de 7 animales evaluados) y su intensidad y frecuencia fue también muy baja.

En nuestro criterio, estos resultados aportan evidencias de la participación decisiva de los receptores dopaminérgicos D₂ en la génesis y fisiopatología de las disquinesias axiales y de extremidades. Aunque no conocemos otros estudios de este corte realizados en animales mutantes que no expresan receptores dopaminérgicos D₂, nuestros resultados están en concordancia con otros reportes que demuestran que la estimulación crónica con agonistas D₂ es capaz de inducir disquinesias[151;268-271].

Los receptores D₂, como hemos dicho con anterioridad, se encuentran fundamentalmente sobre neuronas del cuerpo estriado que expresan encefalina y proyectan a los núcleos de salida de los ganglios basales (GPm y SNr) indirectamente, a través del GPI y el NST. A pesar de que existe cierta homogeneidad en los resultados de estudios que muestran los cambios que la denervación dopaminérgica induce sobre el número de receptores D₂, los trabajos encaminados a dilucidar los cambios que experimentan estos receptores tras la administración crónica de levodopa y su participación en la génesis de las disquinesias, muestran resultados más variables.

La hipersensibilidad a la dopamina de los receptores dopaminérgicos, inducida por la denervación, ha sido reconocida como el mecanismo más probable de origen de las disquinesias[93]. Estudios *post-mortem* de tejido estriatal de pacientes parkinsonianos no tratados[272;273] y de monos parkinsonizados con MPTP[274;275] han mostrado un incremento en la densidad de receptores D₂. Sin embargo, el incremento en la expresión de receptores D₂ generalmente se normaliza, después de la administración

crónica de levodopa, tanto en pacientes con enfermedad de Parkinson como en monos tratados con MPTP[272;275-278].

El punto más débil de esta teoría está, quizás, en que las disquinesias inducidas por L-DOPA casi nunca aparecen después de la primera dosis del medicamento, cuando los receptores están hipersensibles. No obstante, a pesar de que varias investigaciones fallan en demostrar una correlación significativa entre la hipersensibilidad de los receptores D₂ y las disquinesias, esto no significa que los cambios en los receptores dopaminérgicos no participen directamente en la génesis de las disquinesias. En este sentido, se ha postulado que una vez que la dopamina se ha unido con el receptor, ocurren cambios en los mecanismos de señalización que pueden alterar la respuesta de las neuronas de proyección del cuerpo estriado a la levodopa. Varios estudios han demostrado una alteración en el acoplamiento del receptor de dopamina a la proteína G en las neuronas estriatales de ratas lesionadas con 6-OHDA, que pudiera estar implicada en la hipersensibilidad a la dopamina de los receptores dopaminérgicos con independencia de los cambios en el número de receptores expresados y su síntesis[93]. Kooroor y colaboradores, a través de un estudio en ratones mutantes que no expresan la proteína 9-2 reguladora de la señalización de proteína G, demostraron que esta proteína puede ser un factor clave en la génesis de disquinesias a partir de la estimulación de receptores dopaminérgicos D₂[270]. Adicionalmente, estudios genotípicos en pacientes con enfermedad de Parkinson tratados con L-DOPA (disquinéticos y no disquinéticos), han evidenciado factores genéticos vinculados con polimorfismo localizado en el gen que codifica para el receptor D₂[279].

Por otro lado, la participación de los receptores D₂ en el desarrollo de las disquinesias puede estar relacionada no sólo con su efecto sobre las neuronas de proyección del cuerpo estriado; sino también con su función reguladora de la liberación de glutamato en las terminales corticoestriatales[280]. Se conoce que la interrupción crónica de la vía nigroestriatal causa cambios plásticos en la transmisión glutamatérgica dentro de los ganglios basales, asociada a la alteración en la sensibilidad de receptores pre-sinápticos D₂ que regulan la liberación de glutamato[261;281-283]. El tratamiento con dosis terapéuticas de L-DOPA de animales parkinsonizados, en los cuales se induce una mejoría motora sin disquinesias, restaura la plasticidad sináptica corticoestriatal[284]. Sin embargo, en los animales que mostraron MIA inducidos por el tratamiento con L-DOPA, se observa una alteración en la inversión de la potenciación a largo plazo en las terminales corticoestriatales[13]. Estas observaciones permiten sugerir que alteraciones en la plasticidad sináptica podrían participar en la patogénesis de las disquinesias inducidas por L-DOPA.

A diferencia de lo que ocurrió con las disquinesias locomotoras, axiales y de extremidades en nuestros experimentos, los ratones mutantes que no expresan receptores D₂ tratados crónicamente con L-DOPA, mostraron disquinesias orofaciales de mayor intensidad y frecuencia que los ratones de cepas salvajes.

Este hallazgo nos hace pensar que los receptores dopaminérgicos D₂ controlan la movilidad normal de esta región oral y que su bloqueo tiene que ver con la aparición de disquinesias. En este caso la participación de otros mecanismos, que estarían sujetos a un cierto grado de control ejercido por los receptores D₂ y que pueden incluir: activación anormal de otros receptores dopaminérgicos, de receptores adenosinérgicos, alteraciones en los neuropéptidos, etc. resultan de mayor relevancia. La ausencia de participación directa de los receptores D₂ en los movimientos estereotipados orofaciales ha sido sugerida por otros autores, quienes han mostrado que la frecuencia de aparición de movimientos masticatorios vacíos, inducida por bajas dosis de apomorfin, no se ve afectada en ratones mutantes que carecen de receptores D₂[285;286]. Por otro lado, estudios conductuales realizados en ratones mutantes que carecen de receptores D₁, han vinculado a estos receptores con conductas estereotipadas como los movimientos masticatorios y de acicalamiento[287].

Se ha descrito que la ausencia de ambas copias funcionales del gen que codifica para el receptor D₂, trae como consecuencia el desarrollo de alteraciones neuroquímicas en el cuerpo estriado similares a las observadas en animales parkinsonizados[288]. Al estudiar las modificaciones en la expresión de ARNm para la pro-dinorfina y la pre-proencefalina en los ratones mutantes, tanto en el grupo control lesionado como en los lesionados y tratados crónicamente con L-DOPA, nosotros no encontramos diferencias significativas con el grupo de ratones no mutantes, lesionados. Sin embargo, a diferencia de lo que encontramos en los ratones que expresan receptores dopaminérgicos D₂, los ratones mutantes lesionados y tratados crónicamente con L-DOPA, no mostraron un aumento en la expresión de ARNm para los neuropéptidos. Hasta donde conocemos, no existen otros reportes en la literatura sobre el comportamiento de estos neuropéptidos en ratones mutantes lesionados y tratados con L-DOPA. En nuestro criterio, estos resultados pueden estar relacionados directamente con la incapacidad de estimulación de los receptores D₂ por la L-DOPA en estos animales.

El desarrollo de animales mutantes que carecen de un subtipo de receptor nos ha brindado una herramienta de incuestionable valor para dilucidar aspectos funcionales de los receptores dopaminérgicos *in vivo* y su participación en la fisiopatogenia de las disquinesias. No obstante, varios aspectos deben ser considerados cuando se evalúan resultados obtenidos a partir de estas aproximaciones genéticas al estudio de la función de los receptores dopaminérgicos. Es importante recordar que estos ratones mutantes se desarrollan en ausencia de la proteína funcional del receptor, lo cual constituye una anomalía genética. Además, las cepas de ratones de las que se parte (el fondo genético) y en las cuales son estudiadas las alteraciones genéticas pueden también influir dramáticamente en el fenotipo. Por tanto, el fenotipo de estos animales puede estar significativamente influido por el desarrollo de mecanismos de adaptación a esta perturbación. Es posible que los ratones deficientes en receptores D₂ desarrollen programas

alternativos que impliquen cambios neuroquímicos compensatorios en el cuerpo estriado y otros núcleos de los ganglios basales, especialmente aquellos que forman parte de la vía indirecta.

III. Métodos de lesión y técnicas neurorestaurativas en modelos experimentales diseñados en ratas

A. Modelo de hemiparkinsonismo en ratas inducido por lesión con 6-hidroxidopamina.

En los estudios dirigidos al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, se usan diferentes tipos de modelos experimentales que tratan de simular las características clínicas de esta dolencia del Sistema Nervioso Central. La inyección intracerebral unilateral de 6-OHDA en ratas, es extremadamente utilizada para estudios de degeneración y regeneración del sistema mesencefálico[14-16;289-292].

La enfermedad de Parkinson comienza a manifestarse clínicamente, cuando se han perdido alrededor del 80% de las terminales dopaminérgicas estriatales y aproximadamente el 50% de las neuronas de la SNc. En el trabajo con modelos experimentales de hemiparkinsonismo, un animal se considera completamente lesionado cuando se ha perdido más del 80% de la dopamina estriatal[142].

Las rotaciones inducidas por D-anfetamina y apomorfina, fueron utilizadas en nuestro trabajo, como predictoras de efectividad de la lesión. Existen divergencias entre los autores en cuanto a considerar a estas pruebas conductuales como buenas predictoras de una lesión de la vía dopaminérgica nigroestriatal mayor del 80%. Varios autores han descrito la existencia de animales con lesión parcial de esta vía (disminución en la concentración de dopamina en el cuerpo estriado menor del 80%) que rotan más de 650 vueltas completas en 90 minutos después de recibir una inyección de D-anfetamina; pero no más de 150 vueltas completas en 45 minutos, después de la inyección con apomorfina[140;293]. Por esta razón, se ha sugerido que la apomorfina es un mejor predictor de lesiones completas de la SNc, producidas por 6-OHDA.

La acinesia es uno de los síntomas cardinales de la EP en el humano. Sin embargo; la conducta de giro inducida por agonistas dopaminérgicos, en el modelo de hemiparkinsonismo en ratas, no resulta suficiente para medir el grado de déficit motor presente en estos animales. La “Prueba de Habilidad Manual” ha sido utilizada por varios autores para cuantificar el deterioro motor presente en este modelo[150;293]. La significativa disminución de las habilidades motoras en la extremidad contralateral al hemisferio lesionado observada en los animales, está en concordancia con los resultados de numerosos estudios presentes en la literatura[150;178;180;181;294]. Nosotros mostramos además, una correlación estadísticamente significativa, entre la actividad rotatoria inducida por la apomorfina y las habilidades motoras de las extremidades anteriores del lado contralateral a la lesión; mientras que no se observó una fuerte correlación entre esta última prueba y las rotaciones inducidas por D- anfetamina. En nuestro

criterio, el impedimento que muestran los animales al realizar esta prueba, está directamente relacionado con un defecto motor presente en ellos, aunque podría estar influyendo una incapacidad de los sujetos experimentales para realizar ajustes posturales, tales como mantener el equilibrio sobre la plataforma o una indiferencia hacia estímulos sensoriales procedentes de ese lado.

B. Efectos de la denervación dopaminérgica del núcleo subtalámico inducida por inyección de 6-OHDA en dicho núcleo

Los efectos conductuales de la denervación dopaminérgica aislada del NST han sido poco explorados. Nuestros resultados muestran que la lesión específica de las neuronas dopaminérgicas que inervan al NST, produce una conducta de giro en respuesta a la D-anfetamina similar a la obtenida tras lesión directa de la SNc. Por otro lado, la administración de apomorfina produjo una conducta de giro en el grupo de animales con lesión del NST mayor que en el grupo control sano, pero que fue significativamente menor a la conducta de giro evocada por este mismo medicamento en el grupo con lesión de la SNc. En nuestro criterio, el comportamiento conductual de los animales con lesión dopaminérgica del NST es similar a lo observado en animales con lesiones parciales de la SNc. Esto está relacionado con el hecho de que la inyección de la neurotoxina en el NST causa sólo la degeneración de las células dopaminérgicas (o parte de ellas) de la SNc, que inervan a este núcleo o pasan cerca de él. Sin embargo, el impacto que tiene la pérdida de esta inervación sobre la conducta motora demuestra la importancia de ésta en la génesis de las alteraciones conductuales presentes en el hemiparkinsonismo en ratas. El papel crucial que ejerce la inervación dopaminérgica sobre la actividad neuronal del NST ha sido sugerida por otros autores, a través de experimentos que estudian el efecto de la inyección de dopamina directamente sobre el NST[87;89;195].

C. Trasplante de células dopaminérgicas fetales en el núcleo subtalámico de ratas con lesión neurotóxica de la vía nigroestriatal

Las neuronas del Sistema Nervioso Central del adulto son células extremadamente diferenciadas que han perdido la capacidad de proliferar. Aunque el Sistema Nervioso Central puede mitigar, al menos parcialmente, la pérdida neuronal en virtud de su plasticidad, perturbaciones que sobrepasen ciertos límites tolerables ocasionan deficiencias funcionales irreversibles.

Desde la introducción del procedimiento de trasplante de suspensiones celulares por Björklund y colaboradores en 1983[295] se han desarrollado una gran cantidad de estudios de trasplantes celulares en estructuras profundas del Sistema Nervioso Central. El trasplante de tejido mesencefálico fetal rico en neuronas dopaminérgicas dentro del cerebro de animales adultos y recién nacidos, ha sido utilizado para explorar diferentes estrategias que permitan un mayor recobrado funcional y una reparación estructural del sistema nigroestriatal lesionado[296].

Los estudios de trasplante en roedores, han demostrado que existen casos en los cuales hay reacción de rechazo al trasplante y otros en los cuales no hay evidencias concretas de esta respuesta inmune, a pesar de no haber utilizado ningún esquema inmunosupresor[297;298]. Esta variabilidad en los resultados parece estar relacionada con las diferencias entre las especies donantes y receptoras, los sitios de trasplante[299] y las técnicas de trasplante empleadas[190;300].

A partir de 1994, en que aparecen en la literatura especializada las primeras publicaciones sobre la técnica de microtrasplante[301], se han obtenido resultados cualitativamente superiores a los obtenidos con otras técnicas, pues esta permite inyectar volúmenes de suspensiones celulares en múltiples depósitos, siguiendo diferentes trayectorias. Las suspensiones celulares trasplantadas por nosotros dentro del cuerpo estriado fueron distribuidas a lo largo de 2,5 mm en sentido anteroposterior.

Las células mesencefálicas fetales trasplantadas dentro del cuerpo estriado mostraron una supervivencia notable, observándose una gran cantidad de fibras asociadas al tejido implantado que penetraban en todas direcciones y se integraban en el tejido hospedero, formando un halo de densa inmunorreactividad TH+ alrededor del trasplante. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores, en los cuales se evidencia que esta forma de distribuir el trasplante en varios sitios, con pequeño número de células en cada uno de ellos, contribuye a una mejor integración de éste y disminuye los daños infringidos al hospedero. Todo parece indicar que la buena supervivencia del trasplante que se obtiene a través de este método está relacionada con varios factores. En primer lugar, al aumentar el área del trasplante aumenta el espacio disponible y disminuyen las probabilidades de competencia intercelular por la obtención de factores químicos (generalmente moléculas de naturaleza proteica con actividad trófica)[302]. Por otro lado, la reducción del tamaño de la cánula de implante (con un diámetro externo en el orden de las micras) resulta esencial para el éxito quirúrgico del trasplante. La respuesta celular, en el sitio donde se provoca el daño debido a la colocación estereotáctica de las células mesencefálicas fetales en el cerebro hospedero, puede deberse a varios factores. En primer lugar, la cirugía estereotáctica en sí misma provoca un trauma tisular al parénquima cerebral y una disrupción mínima de la barrera hematoencefálica. En segundo lugar, se ha encontrado que el tejido neuronal fetal tiene una capacidad mínima para la expresión antigénica del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, del inglés: Major Histocompatibility Complex), pues este contiene pocas células astrogiales o microglia que contribuyen a la presentación primaria del MHC en estas células[290;303;304]. El desarrollo de una respuesta celular inflamatoria dificulta el establecimiento de nuevas conexiones entre el implante y el tejido lesionado; así como la irrigación de las células trasplantadas por los vasos sanguíneos del hospedero. En nuestro caso, la utilización de una cánula de vidrio de diámetro externo entre 70 y 90 μm para el implante de las células minimizó considerablemente el trauma, el sangramiento que sufre normalmente el tejido hospedero y la

respuesta reactiva por parte de las células del sistema inmune. Finalmente, las modificaciones que se incorporaron a la preparación de las suspensiones celulares en este estudio, también contribuyen a mejorar la supervivencia del trasplante. Nuestros resultados demuestran, al igual que los de otros autores[190], que las suspensiones que se obtienen con esta técnica presentan un gran número de células disociadas y se reduce en un 20% la variabilidad del número de células TH+ entre implantes hechos con la misma suspensión.

La capacidad de las neuronas dopaminérgicas fetales trasplantadas dentro del cuerpo estriado, de revertir la conducta rotatoria inducida por agonistas dopaminérgicos en ratas hemiparkinsonianas, ha sido extensamente estudiada. Sin embargo, las bases fisiopatológicas que permiten explicar el gran impacto que tienen los trasplantes dopaminérgicos intraestriatales sobre esta conducta, no están totalmente dilucidados. Usualmente este efecto se ha atribuido a múltiples mecanismos tales como la difusión y liberación sináptica de la dopamina producida por las células trasplantadas, la cual causa una disminución en la hipersensibilidad de los receptores dopaminérgicos estriatales, acción trófica del tejido del hospedero y reconstrucción de neurocircuitos[305-308].

En nuestro diseño, los grupos con trasplante de células mesencefálicas fetales en el cuerpo estriado mostraron una disminución significativa en la conducta de giro inducida por D-anfetamina, la cual se mantuvo con pocos cambios durante los meses siguientes de evaluación. En la actividad rotatoria inducida por apomorfina también se observó una disminución significativa en el número de vueltas completas.

Por el contrario, los grupos controles no mostraron cambios significativos en la conducta de giro inducida tanto por D-anfetamina como por apomorfina con respecto al estado pre-trasplante, y mostraron un comportamiento muy similar entre ellos. El comportamiento de la conducta de giro de estos grupos no se diferenció de manera significativa de los resultados obtenidos en el grupo control lesionado. Estos resultados nos permiten afirmar que el efecto obtenido sobre la conducta de giro, inducida por agonistas dopaminérgicos, es consecuencia del trasplante de células dopaminérgicas fetales en el cuerpo estriado.

Numerosos trabajos presentes en la literatura demuestran el establecimiento de conexiones aferentes y eferentes entre las neuronas trasplantadas y las del tejido hospedero[307;309]. De manera general se considera que la dopamina liberada por el trasplante dentro del cuerpo estriado es capaz de normalizar la hipersensibilidad a la dopamina de los receptores dopaminérgicos presentes en este núcleo después de la lesión de más del 90% de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal[310].

Ante la imposibilidad de lograr crecimientos extensos de las neuritas de las células trasplantadas, los trasplantes de células dopaminérgicas en modelos de parkinsonismo se han ubicado preferentemente en el

cuerpo estriado. Este proceder garantiza la interconexión de las células trasplantadas con su principal blanco[172;309;311;312]. Sin embargo, en los últimos años ha aumentado el número de evidencias que muestran que el sistema dopaminérgico ejerce su función no solamente a través de la liberación de dopamina en las terminales axónicas de la unidad caudado-putamen, sino también a través de conexiones con otros núcleos de los ganglios basales. Se ha demostrado que la liberación de dopamina en la SNr a partir de las dendritas de la SNc y en el GPI, GPM y NST a partir de proyecciones eferentes provenientes de esta, puede jugar un importante papel en la regulación de los núcleos de salida de los ganglios basales[24;26;30;88;102;176]. Se han ensayado varias estrategias como: el establecimiento, a través de trasplantes múltiples, de un puente entre las dos estructuras, el trasplante simultáneo en el cuerpo estriado y *substantia nigra* para tratar de reconstruir al menos parcialmente, la vía nigroestriatal en el cerebro adulto[176;183;313-315], así como la extensión de la reinervación a otros núcleos como el globo pálido[313].

Trasplante en NST

Las suspensiones celulares trasplantadas, en el núcleo subtalámico se hicieron cubriendo una distancia de 0.2 mm de este núcleo en sentido lateral.

El NST es una estructura clave en la organización funcional de los ganglios basales y está formado por neuronas excitatorias que usan el glutamato como neurotransmisor[87;316;317]. En condiciones normales existen entre la SNc y el NST, una proyección dopaminérgica y una proyección recíproca glutamatérgica. Recientemente se ha descrito que el trasplante intraestriatal de células dopaminérgicas es capaz de revertir el incremento en la actividad de la citocromo oxidasa presente en el núcleo entopeduncular y en la SNr de ratas hemiparkinsonianas, pero no en el núcleo subtalámico, sugiriendo que este implante es incapaz de normalizar la actividad de este núcleo[173]. La reinervación de este núcleo puede, por tanto, ser importante para lograr mejorar el impacto del trasplante sobre la condición parkinsoniana.

En nuestra experiencia, el grupo con trasplante en el NST no mostró mejoría en la conducta de giro inducida por D-anfetamina en los distintos períodos de evaluación post-trasplante. En relación con esta conducta, este grupo tuvo un comportamiento similar al grupo control lesionado y al falso trasplantado y se diferenció significativamente del comportamiento del grupo con trasplante en el cuerpo estriado. A pesar de que se observó una tendencia al incremento en el número de giros inducidos por D-anfetamina en el grupo con trasplante en el NST, esta no fue significativa. Por otro lado, los animales mostraron un aumento significativo en el número de rotaciones inducidas por apomorfina. En estos animales se observó una importante migración de las células trasplantadas hacia estructuras vecinas: cápsula interna, núcleo entopeduncular y área hipotalámica lateral. Este hecho, unido a la menor supervivencia que tuvieron las células trasplantadas en esta localización con relación a las células trasplantadas en el cuerpo estriado,

sugiere que los resultados encontrados en estas pruebas conductuales pudieran estar mediados, al menos en parte, por la inervación dopaminérgica por parte del trasplante de otras estructuras además del NST.

Varias líneas de evidencias sugieren que el NST ejerce un efecto regulatorio sobre el patrón de descarga de las neuronas de la SNc, y que alternativamente la SNc influye en la actividad del NST[318]. La aplicación directa de dopamina en el NST induce la despolarización de sus neuronas, incrementa su frecuencia de descarga y reduce el impacto de las aferencias gabaérgicas sobre ellas[24;195;319]. Aunque la capacidad de la dopamina para modular la actividad neuronal en el NST se conoce hace ya algunos años[84], la forma en que lo hace aún no está bien dilucidada. La administración sistémica de agonistas dopaminérgicos induce un marcado incremento en la utilización de glucosa en el NST, la cual puede ser bloqueada por haloperidol[320]. Estudios posteriores también mostraron que la aplicación directa de dopamina sobre las neuronas del NST induce un incremento dependiente de la dosis del rango de descarga de estas, el cual es atenuado por antagonistas dopaminérgicos[24;210].

Muchos de los efectos mediados por la dopamina sobre el patrón de descarga de las neuronas glutamatérgicas subtalámicas involucran a receptores D_1 y D_2 [87;89;195;216]. No obstante, la localización exacta de estos receptores es materia de intenso debate actual. Un estudio relativamente reciente en ratas, utilizando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa demuestra, que las neuronas del NST producen ARNm para los receptores de la dopamina: D_1 , D_2 y D_3 ; pero no para D_4 [215;321]. Por otro lado, se ha encontrado que las lesiones de la vía nigroestriatal inducidas por 6-OHDA, incrementan los niveles de ARNm del receptor D_2 y disminuyen los del receptor D_3 [215], mientras que aparece un cambio en la expresión funcional de receptores ionotrópicos glutamatérgicos y un aumento en la expresión de receptores al GABA en el NST[227]. Por tanto, la dopamina puede ejercer sus efectos sobre el NST de ratas hemiparkinsonianas a través de la activación de una amplia variedad de receptores, que pueden tener una localización tanto pre como post-sináptica.

Adicionalmente, la frecuencia de descarga de las neuronas del NST se ve marcadamente afectada por la administración sistémica de agonistas dopaminérgicos, pero no necesariamente en la dirección predicha por el modelo clásico de funcionamiento de circuitos de los GB. La administración de agonistas de receptores D_1 (SKF 38393 y SKF 82958) o de agonistas no específicos D_1 - D_2 , induce un marcado incremento en la descarga de las neuronas en el NST de ratas intactas, efecto éste bloqueado por el antagonista D_1 : SCH 23390[216;217]. Por otro lado, la estimulación de receptores D_2 en el NST no altera, o induce solamente un modesto incremento en el patrón de descarga de estas neuronas, pero es capaz de bloquear el aumento en las descargas inducido por agonistas D_1 [126;319]. Sin embargo, en ratas con lesión unilateral de la vía dopaminérgica nigroestriatal, la administración sistémica de apomorfina

(agonista D₁-D₂) muestra una tendencia a disminuir la actividad de las neuronas subtalámicas, lo cual está en concordancia con lo predicho por el modelo de funcionamiento en circuitos[126;322].

Todos estos resultados de estudios electrofisiológicos permiten ilustrar cómo la pérdida de la innervación dopaminérgica del núcleo subtalámico induce cambios tanto cuantitativos como cualitativos en la respuesta de sus neuronas a la estimulación dopaminérgica, que evidencian la existencia de un control dopaminérgico sobre el patrón de descarga de las neuronas del NST. Por otro lado, estudios sobre el recambio de dopamina en animales con trasplante de células dopaminérgicas en el cuerpo estriado, sustentan la idea de que la actividad de las neuronas trasplantadas está presumiblemente regulada a través de conexiones del tejido hospedero con el trasplante[323]. Sin embargo, esta regulación no siempre es adecuada. Se han publicado alteraciones en el metabolismo del trasplante, que incluyen la liberación excesiva de dopamina y alteraciones en el recambio de esta, así como aumento en la expresión de neuropéptidos y productos de genes de respuesta rápida[307;324]. Al parecer, existen muchas variables que potencialmente pueden ser las responsables de una regulación anormal de la actividad celular.

De lo dicho hasta aquí se desprende, que la liberación de dopamina en el núcleo subtalámico por parte de las células trasplantadas puede inducir importantes modificaciones mediadas por varios tipos de receptores, en la actividad de las neuronas de este núcleo. Los cambios en la actividad de este núcleo conducirían, necesariamente, a una reorganización en el funcionamiento de los ganglios basales, ajustada a esta nueva condición. Las modificaciones observadas en las conductas rotatorias exploradas en nuestro trabajo pudieran ser la expresión de cambios en el funcionamiento de estos circuitos, secundarios a una innervación dopaminérgica del NST, cuando aún se mantiene el cuerpo estriado denervado de terminales dopaminérgicas. Un fallo en el establecimiento de conexiones entre el tejido trasplantado y el hospedero puede ser la causa de una liberación excesiva de dopamina o alteraciones en el recambio de ésta dentro del núcleo. Por otro lado, no existen estudios pormenorizados sobre la magnitud de la innervación dopaminérgica del NST, por tanto, las células trasplantadas que sobrevivieron pudieran ser cuantitativamente superiores a las que existen en condiciones normales y ser las responsables de los cambios conductuales descritos. Finalmente, la amplia migración de células trasplantadas hacia otros núcleos sería otra posible causa que pudiera estar influyendo, al menos en parte, en las características de la respuesta rotatoria exhibida por este grupo frente a la apomorfina.

Las células dopaminérgicas fetales trasplantadas dentro del núcleo subtalámico mostraron una distribución homogénea de células TH⁺, con buena supervivencia. Sin embargo, a diferencia de lo observado con el trasplante en el cuerpo estriado, la tinción al anticuerpo anti-TH fue menos intensa. A pesar de que se trasplantaron cantidades similares de células en ambas estructuras, el número de células que sobrevivieron en los implantes del núcleo subtalámico fue significativamente menor, al igual que la

densidad de células en el área del trasplante. Resulta interesante además, que el diámetro neuronal de las células trasplantadas en esta estructura fue significativamente menor que el de las neuronas encontradas en los trasplantes del cuerpo estriado. En este grupo experimental, se observó una importante migración de células trasplantadas hacia estructuras vecinas a partir del sitio de inyección, siguiendo una dirección anteroposterior que abarcó 2.25 mm. Las células migraron fundamentalmente a través de la cápsula interna, aunque se encontraron células además en el núcleo entopeduncular, zona incerta y el área hipotalámica lateral.

Una posible explicación al pequeño diámetro neuronal y la amplia migración observada en los trasplantes en el NST es la existencia en este núcleo de condiciones ambientales locales que no favorezcan extensos crecimientos de las células mesencefálicas fetales. Las neuronas con diámetros pequeños muchas veces exhiben características morfológicas inmaduras, lo que pudiera estar relacionado con una mayor dificultad para establecer conexiones sinápticas con su estructura blanco. Haber trasplantado dentro del subtálamo, un núcleo extremadamente pequeño, la misma cantidad de células que dentro del estriado, pudiera haber influido de manera decisiva en los resultados obtenidos en este estudio. Esto trajo como consecuencia, probablemente, que las células trasplantadas no tuvieran acceso a una cantidad adecuada de factores tróficos derivados de las células blanco, lo cual se conoce que es indispensable para el correcto crecimiento, desarrollo y diferenciación de las células trasplantadas.

Evaluación de las habilidades motoras de las extremidades anteriores.

Los trasplantes de células dopaminérgicas en el cuerpo estriado y en el núcleo subtalámico no modificaron de manera importante el déficit motor, evaluado a través de la “Prueba de Habilidad Manual”, presente en los animales lesionados. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con trasplante en las distintas estructuras y entre estos y el grupo control lesionado. Al comparar la cantidad de trociscos dejados en las escalerillas, por la extremidad anterior izquierda (contralateral a la lesión), de los animales con trasplantes en el cuerpo estriado y el núcleo subtalámico, con relación al grupo control sano, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Estas diferencias también fueron evidentes en la utilización de la extremidad anterior derecha (ipsilateral al trasplante). No obstante, fue posible observar una ligera mejoría en la utilización de esta extremidad por parte de los animales con respecto al estado pre-trasplante.

A diferencia de las pruebas que exploran rotaciones inducidas por agonistas dopaminérgicos, las cuales monitorean conductas motoras simples y estereotipadas, que se producen por estimulación de receptores dopaminérgicos, la “Prueba de Habilidad Manual” involucra en la exploración, una secuencia realmente compleja de movimientos, que deben de estar muy bien coordinados para culminar en una conducta exitosa (la detección del alimento, su agarre, manipulación para tomarlo, y llevarlo a la boca sin que se

caiga). No todos los trastornos que tienen en común un déficit dopaminérgico son igualmente sensibles a ser modificados por el trasplante de células dopaminérgicas.

Las publicaciones acerca del efecto del trasplante de células dopaminérgicas fetales en ratas hemiparkinsonianas sobre las habilidades motoras no resultan consistentes. Se han publicado, una serie de estudios previos, en los cuales sus autores no pueden demostrar algún efecto beneficioso del trasplante de células mesencefálicas fetales sobre esta conducta[149;325;326]; y sobre la base de estas observaciones, se ha sugerido que el trasplante ectópico de células dopaminérgicas en el cuerpo estriado es insuficiente para restaurar las habilidades motoras, ya que es incapaz de proveer aferencias con capacidad reguladora fisiológicamente relevante[149;325;327]. Por otro lado, hay autores que describen una ligera mejoría en las habilidades motoras, después del trasplante intranigral de células dopaminérgicas en la extremidad contralateral al hemisferio trasplantado[190].

Tanto en humanos, como en primates no humanos y roedores, el cuerpo estriado parece jugar un papel importante en los circuitos neurales que participan en los mecanismos de ejecución, aprendizaje y memoria motora. La transmisión excitatoria córtico-estriatal puede expresar dos formas opuestas de plasticidad sináptica: la depresión a largo plazo (LTD, del inglés: long-term depression) y la potenciación a largo plazo (LTP, del inglés: long-term potentiation). Se ha sugerido que estas formas de plasticidad pueden representar los mecanismos celulares de regulación a largo plazo del cuerpo estriado sobre la actividad de los ganglios basales y de memoria de las habilidades motoras[261]. La pérdida de las neuronas dopaminérgicas que inervan al cuerpo estriado causa dos efectos electrofisiológicos principales sobre la transmisión excitatoria de la vía corticoestriatal: por un lado, incrementa la amplitud y la frecuencia de potenciales sinápticos espontáneos despolarizantes mediados por glutamato; y por otro, implica una pérdida de la plasticidad sináptica corticoestriatal[261;282;284]. Estudios morfológicos demuestran que la denervación de neuronas dopaminérgicas causa cambios estructurales en el cuerpo estriado, capaces de interferir con la generación de la plasticidad sináptica corticoestriatal (LTD y LTP). En particular, después de la lesión inducida por 6-OHDA, se observa una reducción en número de las espinas dendríticas de las neuronas estriatales, las cuales muestran además una forma y tamaño anormal[13;284;328]. Las espinas dendríticas de las neuronas estriatales, han sido propuestas, como el sustrato anatómico de la plasticidad sináptica[261;329]. En nuestro criterio, la integridad de todos estos mecanismos resulta decisiva para la realización de pruebas de exploración motora, como la de habilidades manuales, en las cuales además de una conducta sensorimotora compleja están implícitos fenómenos de memoria y aprendizaje motor. Probablemente, la restauración de los niveles de dopamina en núcleos aislados de los ganglios basales, sea insuficiente para lograr mejorías significativas en conductas motoras

complejas que precisan de un alto nivel de integridad en el funcionamiento de estos núcleos para su ejecución.

A la luz de los conocimientos actuales, existen muchas variables que influyen en la eficacia del trasplante neural como tratamiento de la enfermedad de Parkinson, que resultan susceptibles de ser modificadas. Una variable crucial, sobre la que aún no se tiene completa claridad, es el sitio óptimo dentro de los ganglios basales para colocar el trasplante. Aunque hasta el momento la estrategia principal seguida por la mayor parte de los grupos que trabajan en esta temática, ha sido colocar el trasplante de células dopaminérgicas mesencefálicas fetales en el cuerpo estriado, la restauración de la inervación dopaminérgica de otros núcleos, por separado o simultáneamente con este, puede ser esencial para obtener una mejoría más completa de los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson.

D. Cuantificación de Factor de Crecimiento de Nervio

Informes recientes indican que en la SNc existe inmunorreactividad al NGF y al receptor e cinasa tirosínica A (TrkA), lo cual sugiere una regulación de tipo autocrina/paracrina de este factor[330]. Adicionalmente, se han encontrado concentraciones disminuidas de NGF en el estriado de ratas lesionadas con MPTP, aspecto que Mogi y colaboradores interpretaron como un indicador, conjuntamente con la elevación de la Interleuquina-1, de una relación entre la disminución de NGF y la muerte neuronal que aparece en este modelo de hemiparkinsonismo[331]. Nuestros resultados evidenciaron una disminución de un 84% en los valores de factor de crecimiento de nervio en el suero de ratas hemiparkinsonianas lo que está en concordancia con estos reportes.

Por otro lado, la producción de factores tróficos por las células trasplantadas ha sido propuesta como un posible mecanismo de acción de los trasplantes[29;136;172]. Nosotros encontramos que el microtrasplante de células mesencefálicas fetales induce un aumento en las concentraciones de este factor de crecimiento, lo que sin duda, apoya esta hipótesis.

IV. Consideraciones Finales

La aparición de disquinesias inducidas por L-DOPA, puede ser el resultado de poderosos mecanismos compensatorios, por medio de los cuales las neuronas del cuerpo estriado se adaptan a una disminución en la entrada de impulsos dopaminérgicos, tales como: aumento de la liberación presináptica de DA o cambios en la sensibilidad de receptores postsinápticos dopaminérgicos de las neuronas estriatales.

Los receptores D₂ se encuentran fundamentalmente sobre neuronas del cuerpo estriado que expresan encefalina y proyectan a los núcleos de salida de los ganglios basales (Gpm y SNr) indirectamente, a través del GPI y el NST. Nuestros resultados, especialmente los obtenidos en ratones mutantes

hemiparkinsonianos que no expresan receptores dopaminérgicos D₂ tratados crónicamente con L-DOPA, nos permiten confirmar nuestra hipótesis sobre la participación de estos en el origen de las disquinesias.

Proponemos que los receptores dopaminérgicos D₂, especialmente los que se encuentran sobre neuronas estriatales gabaérgicas espinosas de mediano calibre (origen de la vía indirecta del circuito motor de los ganglios basales) participan de manera decisiva en la génesis y fisiopatología de las disquinesias locomotoras, axiales y de extremidades (Fig. 33). Esta propuesta se basa en los hallazgos que mostraron que ratones con ausencia de receptores dopaminérgicos D₂ presentaron una frecuencia e intensidad de estas disquinesias significativamente menor que los ratones de cepas salvajes. Por otro lado, proponemos que la mayor frecuencia e intensidad de movimientos orofaciales observada en estos ratones mutantes responde al papel que estos receptores juegan en el control de la movilidad normal de la región oral. La ausencia de estimulación de receptores D₂, porque se carece genéticamente de ellos, tiene que ver con la aparición de disquinesias orofaciales. En este caso, la participación de otros mecanismos, que estarían sujetos a un cierto grado de control ejercido por los receptores D₂ y que pueden incluir: activación anormal de otros receptores dopaminérgicos, de receptores adenosinérgicos, alteraciones en los neuropéptidos, etc. resultan de mayor relevancia.

El trasplante neural constituye la alternativa terapéutica más fisiológica para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, al intentar reemplazar las neuronas degeneradas. A la luz de los conocimientos actuales, existen muchas variables que influyen en la eficacia del trasplante neural y resultan susceptibles de ser modificadas. Una variable crucial, sobre la cual aún no se tiene completa claridad, es el sitio óptimo dentro de los ganglios basales para colocar el trasplante.

La relevancia fisiológica de la modulación directa e indirecta de las neuronas del NST por neuronas dopaminérgicas de la SNc deviene en un tema polémico. La lesión de las neuronas dopaminérgicas que inervan al NST, induce una pérdida parcial de neuronas dopaminérgicas nigrales que se traduce en una conducta rotatoria inducida por agonistas dopaminérgicos similar a la observada en animales con lesiones parciales de la SNc. Por tanto, el impacto que tiene la pérdida de la inervación dopaminérgica al NST sobre la conducta motora, demuestra la importancia de ésta en la génesis de las alteraciones conductuales presentes en el hemiparkinsonismo en ratas.

Sin embargo, nuestros resultados no confirmaron la hipótesis de trabajo que nos planteamos al inicio en relación con un efecto, posiblemente beneficioso, del trasplante de células dopaminérgicas en el NST sobre las alteraciones motoras presentes en la enfermedad de Parkinson. Si bien la lesión selectiva de neuronas dopaminérgicas que inervan al NST, se traduce en una conducta similar a la observada en animales con lesiones de la SNc, la liberación de dopamina en el núcleo subtalámico, a través de células mesencefálicas fetales trasplantadas, no es capaz de sustituir el efecto modulador que ejerce, en

condiciones fisiológicas, este neurotransmisor en el NST. Por el contrario induce cambios en la actividad de este núcleo que conducen a una reorganización en el funcionamiento de los ganglios basales, ajustada a esta nueva condición y que es diferente de la normal (Fig. 33).

Nuestros hallazgos confirman y aportan nuevas evidencias experimentales sobre la importancia de la participación de las estructuras que forman la vía indirecta del circuito de los ganglios basales, en la conducta motora del modelo de hemiparkinsonismo en roedores. Muestran sitios potencialmente manipulables dentro de esta vía y su impacto sobre la modulación de la conducta del animal.

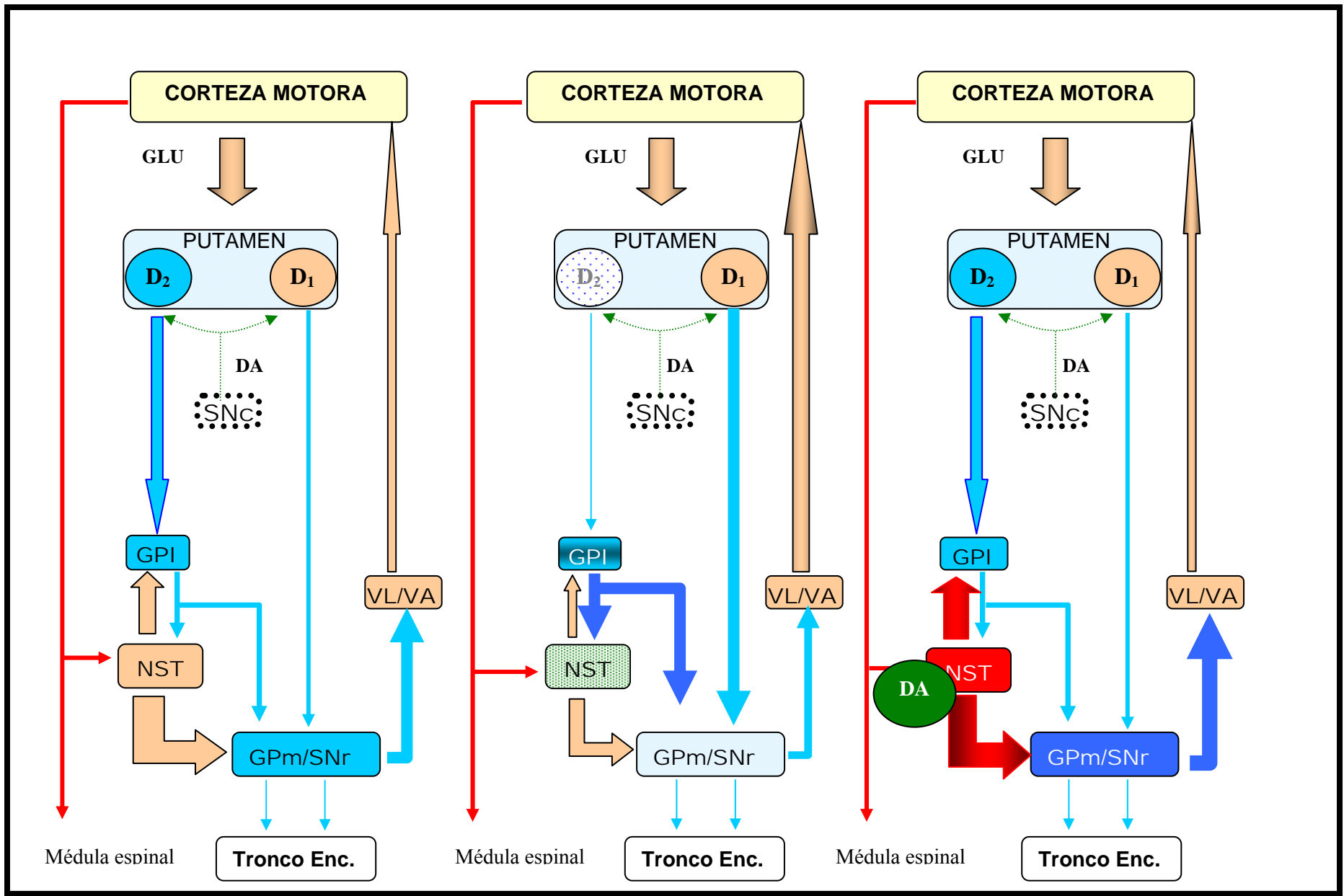


Figura 33. Modelo de funcionamiento del circuito motor de los ganglios basales: A. Condición parkinsoniana; B. Papel de receptores D₂ en el origen de las disquinesias; C. Efecto del trasplante dopaminérgico en el NST sobre la actividad del circuito parkinsoniano. La explicación aparece en el texto. VL: núcleo ventral lateral del tálamo, VA: núcleo ventral anterior del tálamo, D₁ y D₂: receptores dopaminérgicos, GLU: glutamato, DA: dopamina

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. Es posible modelar en ratones hemiparkinsonizados las disquinesias inducidas por L-DOPA en el humano y este modelo experimental resulta adecuado para el estudio de las bases etiopatogénicas de esta importante complicación motora.
2. Los receptores dopaminérgicos D₂ participan de manera decisiva en la génesis y fisiopatología de las disquinesias axiales y de extremidades.
3. La aparición, frecuencia y distribución somatotópica de movimientos involuntarios anormales inducidos por L-DOPA está determinada por la estimulación intermitente de más de un subtipo de receptor dopaminérgico.
4. La pérdida selectiva de la innervación dopaminérgica del NST es responsable, al menos en parte, de las alteraciones conductuales presentes en el modelo de hemiparkinsonismo en ratas.
5. Las células dopaminérgicas fetales trasplantadas dentro del cuerpo estriado y el núcleo subtalámico de animales adultos son capaces de sobrevivir.
6. Los trasplantes de células dopaminérgicas fetales en el núcleo subtalámico de animales hemiparkinsonianos no mejoran las alteraciones motoras de estos animales y reducen el efecto positivo del trasplante en el cuerpo estriado, por lo que éste no parece ser un blanco útil para la ubicación de células dopaminérgicas con fines terapéuticos.
7. La vía indirecta del circuito motor de los ganglios basales, participa de manera esencial en la modulación de la conducta motora de los roedores hemiparkinsonianos; y puede ser manipulada tanto en su estructura de origen a través de los receptores dopaminérgicos D₂ como en su parte final, mediante la modificación de la acción dopaminérgica directa sobre el NST.

Recomendaciones

1. Evaluar el efecto del tratamiento crónico e intermitente con levodopa en ratones hemiparkinsonizados carentes de otros tipos de receptores dopaminérgicos (ratones KO-D₁, ratones KO-D₄).
2. Evaluar el efecto del tratamiento crónico e intermitente con levodopa en ratones hemiparkinsonizados carentes de receptores A_{2a}.
3. Estudiar la expresión de genes de respuesta rápida en el cuerpo estriado y otros núcleos de los ganglios basales, en modelos experimentales de disquinesias en ratones.
4. Estudiar el efecto de la estimulación dopaminérgica directa del NST sobre la actividad eléctrica de las neuronas glutamatérgicas de dicho núcleo y la liberación de neurotransmisores en los núcleos de salida de los ganglios basales, tanto en ratas normales como en el estado parkinsoniano con y sin tratamiento dopaminérgico sistémico concomitante.
5. Realizar el microtrasplante de células dopaminérgicas fetales en el núcleo subtalámico, estableciendo varios grupos experimentales en los cuales se trasplanten diferentes concentraciones de células.
6. Realizar los estudios de las modificaciones de la actividad rotatoria inducida por otros agonistas dopaminérgicos, después del microtrasplante de células dopaminérgicas fetales en el cuerpo estriado y núcleo subtalámico, tomando en cuenta la presencia y densidad de varios subtipos farmacológicos de receptores dopaminérgicos en las poblaciones neuronales de ambos núcleos.
7. Evaluar el efecto del trasplante en el NST, y de la denervación del NST sobre las disquinesias inducidas por levodopa.

ANEXOS

Anexo 1

Escala de cuantificación para la evaluación de la intensidad de las disquinesias inducidas por el tratamiento con L-DOPA.

Disquinesias Masticatorias (Orofaciales):

- 0 = Ausente
- 1 = Incremento de los movimientos masticatorios, aparecen de manera ocasional (menos de 10 veces).
- 2 = Incremento de los movimientos masticatorios, aparecen de manera frecuente (10 - 20).
- 3 = Movimientos masticatorios continuos de pequeña amplitud.
- 4 = Movimientos masticatorios repetitivos y compulsivos, de gran amplitud, frecuentemente asociados a protrusión de la lengua.

Disquinesias de las Extremidades:

- 0 = Ausente
- 1 = Aparecen movimientos bálicos de la extremidad contralateral a la lesión de manera aislada.
- 2 = Movimientos repetitivos, frecuentes e intermitentes de la extremidad contralateral a la lesión.
- 3 = Movimientos de la extremidad contralateral a la lesión repetitivos o distónicos, interrumpidos por distracción sensorial.
- 4 = Movimientos de la extremidad contralateral a la lesión repetitivos o distónicos, que no es posible interrumpirlos por distracción sensorial.

Disquinesias Locomotoras:

- 0 = Ausente
- 1 = Rotación contralateral al lado de la lesión consistente, puede haber aumento de la actividad locomotora general.
- 2 = Rotación contralateral al lado de la lesión presente de manera intermitente.
- 3 = Rotación contralateral al lado de la lesión continua, interrumpidos por distracción sensorial.
- 4 = Rotación contralateral al lado de la lesión continua, que no es posible interrumpirlos por distracción sensorial.

Distonía axial:

- 0 = Ausente
- 1 = Rotación contralateral al lado de la lesión del tronco en posición vertical sobre las extremidades posteriores.
- 2 = De manera intermitente aparece flexión del cuello que acompaña a la torsión distónica del tronco que adopta el animal en posición vertical sobre las extremidades posteriores.
- 3 = Rotación y flexión, contralateral al lado de la lesión, del cuello y el tronco, se mantiene una postura balanceada.
- 4 = Rotación y flexión, contralateral al lado de la lesión, del cuello y el tronco, no se mantiene una postura balanceada.

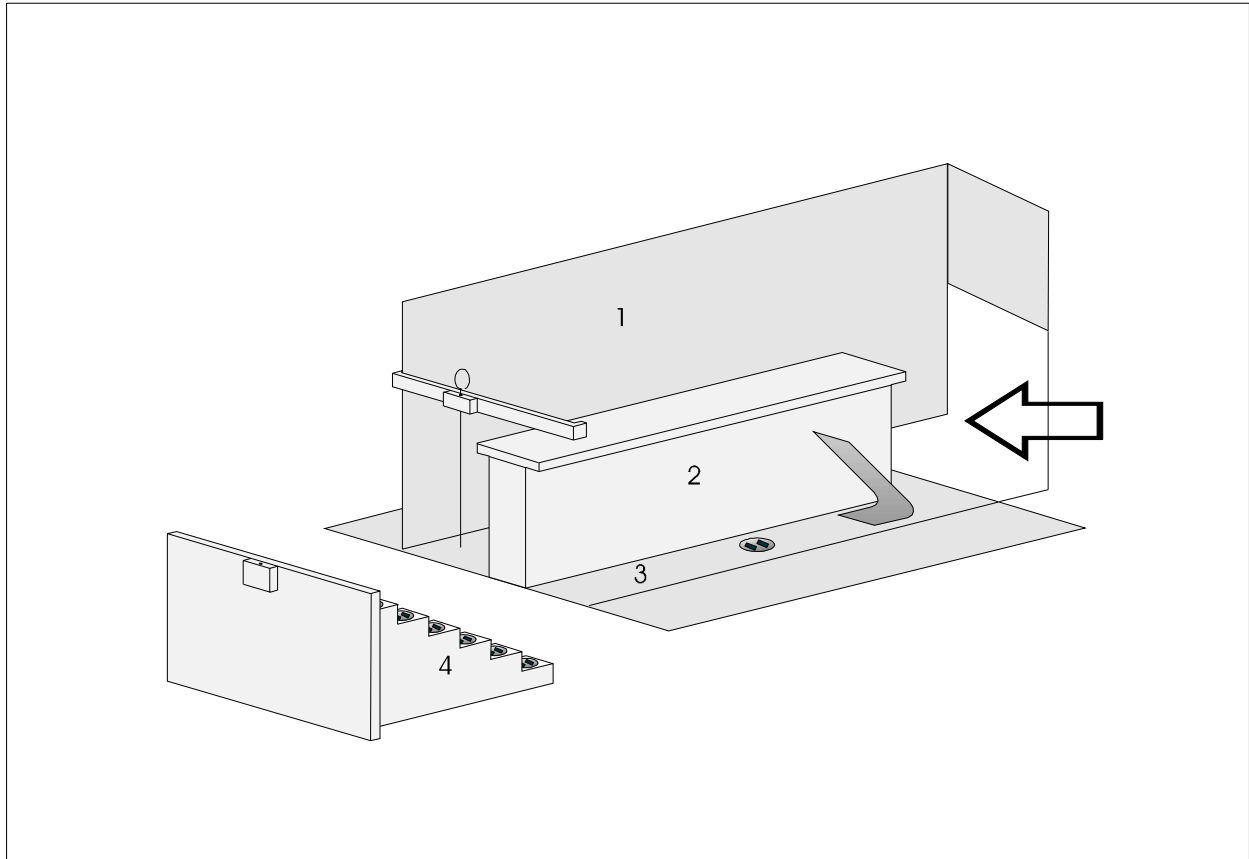
Anexo 2

Minitanques del rotómetro, donde fueron registradas las rotaciones de los animales.



Anexo 3

Representación esquemática de la caja empleada para la realización de la "Prueba de Habilidades Manuales".



- 1.- Caja de Acrílico rojo.
- 2.- Plataforma Central.
- 3.- Espacio a ambos lados para insertar la escalerilla móvil de seis escalones.
- 4.- Escalerilla móvil provista de una pequeña concavidad en cada escalón y en el piso de la caja donde se sitúan dos trozos de alimentos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barraquer,L., Martí,M.J., Barraquer,M.L., and Gil,D., Evolución Histórica del conocimiento de la Enfermedad de Parkinson. In: Obeso,J.A., Tolosa,E.S., Grandas,F.J. (Eds.), Tratado sobre Enfermedad de Parkinson., Laboratorios DU PONT Pharm S.A., 1997, pp. 15-22.
2. Scorttcati,M.C. and Micheli,F., Historia de la Enfermedad de Parkinson. In: Micheli,F.E. (Ed.), Enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados, Editorial Médica Panamericana S.A., Argentina, 1998, pp. 1-7.
3. Obeso,J.A., Rodríguez-Oroz,M.C., Rodríguez,M., Lanciego,J.L., Artieda,J., Gonzalo,N., and Olanow,C.W., Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease., Trends Neurosci., 23 (Suppl. Basal ganglia, Parkinson's disease and levodopa therapy) (2000) S8-S19.
4. Alheid,G.F., Heimart,L., and Switzer,R.C., Basal Ganglia. In: Paxinos,G. (Ed.), The Human Nervous System., Academic Press., San Diego, 1990, pp. 483-582.
5. Rodríguez,M.C., Rodríguez,M., and Obeso,J.A., Organización y función de los ganglios basales. Modelos experimentales. In: Obeso,J.A., Tolosa,E.S., Grandas,F.J. (Eds.), Tratado sobre la Enfermedad de Parkinson, Edición en CD-ROM. Laboratorios DU PONT Pharma S.A. y Ediciones Doyma S.L., 2000, pp. 113-126.
6. Fahn,S., The spectrum of L-dopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease., Ann. Neurol., 47 (Suppl. 1) (2000) S2-S11.
7. Jankovik,J. and Marsden,C., Therapeutic strategies in Parkinson's Disease. In: Jankovik,J., Tolosa,E.S. (Eds.), Parkinson's disease and movement disorders., Williams & Wilkins, Baltimore, 1998, pp. 192-220.
8. Jenner,P., Avoidance of dyskinesia: preclinical evidence for continuous dopaminergic stimulation., Neurology, 62 (2004) S47-S55.
9. Obeso,J.A., Rodríguez-Oroz,M.C., Marin,C., Alonso,F., Zamarbide,I., Lanciego,J.L., and Rodríguez-Díaz,M., The origin of motor fluctuations in Parkinson's disease: importance of dopaminergic innervation and basal ganglia circuits., Neurology, 62 (2004) S17-S30.
10. Guridi,J., Herrero,M.T., Luquin,M.R., and Obeso,J.A., Trasplantes celulares para la enfermedad de Parkinson., Neurología, 6 (1991) 175-183.
11. Obeso,J.A., Grandas,F.J., and Vaamonte,J., Motor complication associate with chronic Levodopa therapy in PD., Neurology, 39 (1989) 11-19.
12. Lee,C.S., Cenci,M.A., Schulzer,M., and Björklund,A., Embryonic ventral mesencephalic grafts improve levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease., Brain, 123 (2000) 1365-1379.
13. Picconi,B., Centonze,D., Hakansson,K., Bernardi,G., Greengard,P., Fisone,G., Cenci,M.A., and Calabresi,P., Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia., Nat Neurosci, 6 (2003) 501-506.
14. Abrous,D.N. and Dunnett,S.B., Paw reaching test in rats: the staircase test., Neuroscience Protocols., 94-010-03-01-11. (1994).
15. Schwarting,R., Bonatz,A., Carey,R.J., and Huston,J.P., Dopamine denervated hemisphere levels of dopamine in 6-OHDA lesion animals are related to different types of rotational movements, Brain Res, 554 (1991) 46-55.
16. Ungerstedt,U., 6-hydroxydopamine induced degeneration central dopamine neurons., J. Pharmacol., 5 (1968) 107-111.

17. Canales,J.J. and Graybiel,A.M., A measure of striatal function predicts motor stereotype., *Nat Neurosci*, 4 (2005) 377-383.
18. Cenci,M.A., Lee,C.S., and Björklund,A., L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA, *European Journal of Neuroscience*, 10 (1998) 2694-2706.
19. Lundblad,M., Andersson,M., Winkler,C., Kirik,D., Wierup,N., and Cenci,M.A., Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease., *Eur. J. of Neurosci.*, 15 (2002) 120-132.
20. Perier,C., Marin,C., Jimenez,A., Bonastre,M., Tolosa,E.S., and Hirsch,E.C., Effect of subthalamic nucleus or entopeduncular nucleus lesion on levodopa-induced neurochemical changes within the basal ganglia and on levodopa-induced motor alterations in 6-hydroxydopamine-lesioned rats., *J. Neurochem.*, 86 (2003) 1328-1337.
21. Albin,R., Young,A., and Penny,J., The functional anatomy of Basal Ganglia disorders., *Tins.*, 12 (1989) 366-375.
22. Wichmann,T. and DeLong,M.R., Functional neuroanatomy of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Adv. Neurol.*, 91 (2003) 9-18.
23. Hikosaka,O., Role of the forebrain in oculomotor function., *Prog Brain Res*, 87 (1991) 101-107.
24. Cragg,S.J., Baufreton,J., Xue,Y., Bolam,J.P., and Bevan,M.D., Synaptic release of dopamine in the subthalamic nucleus., *Eur. J. of Neurosci.*, 20 (2004) 1788-1802.
25. Lewis,D.A. and Sesack,S.R., Dopamine systems in the primate brain. In: Bloom,F.E., Björklund,A., Hökfelt,T. (Eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Elsevier B.V., Amsterdam, 1997, pp. 263-375.
26. Smith,Y. and Kieval,J.Z., Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia., *Trends in Neurosciences.*, 23 (2000) S28-S33.
27. Gauthier,J., Parent,M., Levesque,M., and Parent,A., The axonal arborization of single nigrostriatal neurons in rats., *Brain Research*, 834 (1999) 228-232.
28. Hanley,J.J. and Bolam,J.P., Synaptology of the nigrostriatal projection in relation to the compartmental organization of the neostriatum in the rat., *Neuroscience.*, 81 (1997) 353-370.
29. López,J.J. and Brera,B., Regeneración y restauración del sistema dopaminérgico. Trasplantes neurales. In: Obeso,J.A., Tolosa,E.S., Grandas,F.J. (Eds.), *Tratado sobre la Enfermedad de Parkinson*, Edición en CD-ROM. Laboratorios DU PONT Pharma S.A. y Ediciones Doyma S.L., 2000, pp. 435-454.
30. Mendez,I., Baker,K.A., and Hong,M., Simultaneous intrastriatal and intranigral grafting (double grafts) in the rat model of Parkinson's disease., *Brain Research*, 32 (2000) 328-339.
31. Parkinson,J., *An essay on the shaking palsy*, Whittingham and Rowland for Sherwood, Neely, and Jones, London, 1817.
32. Laurence-Tyler,K., A History of Parkinson's Disease. In: Koller,W.C. (Ed.), *Handbook of Parkinson's Disease.*, Dekker, New York, 1992, pp. 1-34.
33. Trousseau,A., Tremblement senile et paralysie agitante. In: *Clinique médicale de l'Hôtel-Dieu de Paris*. Paris: Bailliere, 1861.
34. Trousseau,A., Senile trembling and paralysis agitans. In: Bazire,P.V. (Ed.), *Lectures on clinical medicine delivered at the Hôtel-Dieu Paris.*, New Sydenham Society, London, 1868, pp. 440-450.

35. Charcot,J.M., Leçons sur les maladies du système nerveux faites à Salpêtrière. In: delahaye et Lecrosnier Paris, 1892, pp. 155.
36. Bielschowsky,M., Weitere Bemerkungen zur normalen und pathologischen Histologie des striären Systems., J. Psychol. Neurol., 27 (1922) 233-280.
37. Jelgersma,G., Neue anatomische Befunde bei Paralysis agitans und bei chronischer Chorea., Neurol Zbl, 27 (1908) 995-996.
38. Lewy,F.H., Zur pathologischen Anatomie der Paralysis agitans, Dtsch Z Nervenheilk, 50 (1912) 50-55.
39. Vogt,C. and Vogt,O., Zur Lehre der Erkrankungen des striären System., J Psychol Neurol, 25 (1920) 627-846.
40. Tretiakoff,C. Contribution à l'étude de l'anatomie pathologie du locus niger de Somemmering avec quelques déductions relatives à la pathogénie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. 1919. Thèse.Paris.
41. Bethlem,J. and Den Hartog Jager,W.A., The distribution of Lewy bodies in the central and autonomic nervous systems in idiopathic paralysis agitans., J Neurol Neurosurgery Psychiatry, 23 (1960) 283-290.
42. Bethlem,J. and Den Hartog Jager,W.A., The incidence and characteristic of Lewy bodies in idiopathic paralysis agitans., J Neurol Neurosurgery Psychiatry, 23 (1960) 74-82.
43. Greenfield,J.G. and Bosanquet,F.D., The brain stem lesions in Parkinsonism., J Neurol Neurosurgery Psychiatry, 16 (1953) 213-226.
44. Hassler,R., Zur Pathologie der paralysis agitans und des postencephalitischen Parkinsonismus., J Psychol Neurol, 48 (1938) 387-476.
45. Díaz,M.B. and Mascitti,T.A., Anatomía de los núcleos de la base y estructuras relacionadas. In: Micheli,F.E. (Ed.), Enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Bogotá, Caracas, Madrid, Mexico, Sao Paulo, 1998, pp. 9-30.
46. Alexander,G.E. and Crutcher,M.D., Functional architecture of Basal Ganglia circuit: Neural substrates of parallel processing., Tins., 13 (1990) 266-271.
47. Graybiel,A.M., Neurotransmitters and Neuromodulatorin the Basal Ganglia., Tins., 13 (1990) 244-254.
48. DeLong,M.R., Primate models of movement disorders of basal ganglia origin, Trends in Neurosciences, 13 (1990) 281-285.
49. Middleton,F.A. and Strick,P.L., Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits., Brain Res. Rev., 31 (2000) 236-250.
50. Parent,A., Sato,F., Wu,Y., Gauthier,J., Lévesque,M., and Parent,M., Organization of the basal ganglia: the importance of axonal collateralization., Trends in Neurosciences., 23 (2000) S20-S27.
51. Smith,A.D. and Bolam,J.P., The neural network of the Basal Ganglia as revealed by the study of the synaptic connection of identified neurons., Tins., 13 (1990) 259-265.
52. Chesselet,M. and Delfs,J.M., Basal ganglia and movement disorders: An update., Trends Neurosci., 19 (1996) 417-422.

53. Joel,D. and Weiner,I., The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum., *Neuroscience.*, 96 (2000) 451-474.
54. Haber,S.N., Fudge,J.L., and McFarland,N.R., Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum., *J Neurosci*, 20 (2000) 2369-2382.
55. Smith,Y., Wichmann,T., and DeLong,M.R., The external pallidum and subthalamic nucleus send convergent synaptic inputs onto single neurones in the internal pallidal segment in monkey: Anatomical organization and functional significance. In: *The Basal Ganglia IV. New ideas and data on structure and function.* New York and London, Plenum Press., 1994, pp. 51-62.
56. Chase,T.N. and Oh,J.D., Striatal mechanisms and pathogenesis of parkinsonian signs., *Ann. Neurol.*, 47(suppl. 1) (2000) 122-130.
57. DiFiglia,M., Pasik,P., and Pasik,T., A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys., *Brain Res*, 114 (1976) 245-256.
58. Parent,A., Côté,P.Y., and Lavoie,B., Chemical anatomy of primate basal ganglia., *Progress in Neurobiology*, 46 (1995) 131-197.
59. Wichmann,T. and DeLong,M.R., Pathophysiology of Parkinson's disease: the MPTP primate model of the human disorder., *Ann NY Acad Sci*, 991 (2003) 199-213.
60. Young,A.B. and Penney,J.B.Jr., Biochemical and functional organization of the basal ganglia. In: Jankovik,J., Tolosa,E.S. (Eds.), *Parkinson's disease and movement disorders.*, Williams & Wilkins, Baltimore, Philadelphia, Hong Kong, London, Munich, Sydney, Tokyo, 1998, pp. 1-14.
61. Yelnik,J., Functional anatomy of the basal ganglia., *Mov Disord*, 3 (2002) S15-S21.
62. Graybiel,A.M., Canales,J.J., and Capper-Loup,C., Levodopa-induced dyskinesias and dopamine-dependent stereotypies: a new hypothesis., *Trends in Neurosciences.*, 23 (2000) S71-S77.
63. Mitchell,I.J., Clarke,C.E., Boyce,S., Robertson,G.S., Peggs,D., Sambrook,M.A., and Crossman,A.R., Neural mechanism underlying parkinsonian symptoms based upon regional uptake of 2-deoxyglucose in monkeys exposed to MPTP., *Neuroscience.*, 32 (1989) 213-226.
64. Rodríguez-Oroz,M.C., Catalán,M.J., and Obeso,J.A., Origen y fisiopatología de las disquinesias en la enfermedad de Parkinson. In: Obeso,J.A. (Ed.), *Controversias en Neurología II: Disquinesias en la enfermedad de Parkinson*, DRUG FARMA,S.L., Madrid, 2000, pp. 9-18.
65. Bergman,H., Feingold,A., Nini,A., Raz,A., Slovín,H., Abeles,M., and Vaadia,E., Physiological aspects of information processing in the basal ganglia of normal and parkinsonian primates., *Trends in Neurosciences*, 21 (1998) 32-38.
66. Gerfen,C.R., Engber,T.M., Mahan,L.C., Susel,Z., Chase,T.N., Monsma,F.J., and Sibley,D.R., D1 and D2 dopamine receptors-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons., *Science Wash DC*, 250 (1990) 1429-1432.
67. Gerfen,C.R., Dopamine-mediated gene regulation in models of Parkinson's disease., *Ann. Neurol.*, 47 (2000) S42-S50.
68. Gerfen,Ch.R., Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways., *Trends Neurosci.*, 23 (2000) S64-S70.
69. Onn,S.P., West,A.R., and Grace,A.A., Dopamine-mediated regulation of striatal neuronal and network interactions., *Trends Neurosci.*, 23 (2000) S48-S56.

70. Vitek, J.L. and Girez, M., Physiology of hypokinetic and hyperkinetic movement disorders model for dyskinesia., *Ann of Neurology*, 47 (2000) S131-S140.
71. Rodríguez-Oroz, M.C., Zamarbide, I., Pavón, N., Grandas, F., and Obeso, J.A., Presentación clínica y fisiopatológica de las complicaciones motoras en la Enfermedad de Parkinson, *Neurología*, 17(Supl 1) (2002) 10-20.
72. Dahlström, A. and Fuxe, K., Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons., *Acta Physiol. Scand.*, 62(Suppl.232) (1964) 1-55.
73. Swanson, L.W., The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat., *Brain Res Bull*, 9 (1982) 321-353.
74. Vicq d'Azir, F., *Traité d'Anatomie et de Physiologie avec des Planches Colorées.*, Didot, Paris, 1786.
75. Castaldi, L. Studi sulla struttura e sullo sviluppo del mesencefalo. *Arch.Ital.Anat.Embriol.* 20, 23-226. 1923.

Ref Type: Journal (Full)

76. Meynert, T., *Psychiatrie. Clinique des maladies du Cerveau Antérieur Basée sur sa Structure, ses Fonctions et sa Nutrition.*, Manceaux, A., Bruxelles, 1888.
77. Mirto, D., Sulla fina anatomia delle regioni peduncolare e subtalamica nell'uomo., *Rivista di Patologia Nervosa e Mantale.*, 1 (1896) 57-60.
78. Holmes, G., The nervous system of the dog without a forebrain., *J. Physiol*, 27 (1901) 1-25.
79. Moore, R.Y., Brain lesions and amine metabolism., *Rev Neurobiol.*, 13 (1970) 67-71.
80. Ehringer, J. and Hornykiewicz, O., Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytryptamin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems., *Klin Wochenstr.*, 38 (1960) 1236-1239.
81. Hornykiewicz, O., Dopamine (3-hydroxytyramide) and brain function., *Pharmacol Rev.*, 18 (1966) 925-962.
82. Ljungdahl, A., Hökfelt, T., Golgstein, M., and Park, D., Retrograde peroxidase tracing of neurons combined with transmitter histochemistry., *Brain Res*, 84 (1975) 313-319.
83. Bentivoglio, M. and Morelli, M. The organization and circuits of mesencephalic dopaminergic neurons and the distribution of dopamine receptors in the brain. [21: Dopamine], 1-107. 2005. Amsterdam, Elsevier B.V. *Handbook of Chemical Neuroanatomy.* Dunnett, S. B., Bentivoglio, M., Björklund, A., and Hökfelt, T.
84. Campbell, G.A., Eckardt, M.J., and Weight, F.F., Dopaminergic mechanisms in subthalamic nucleus of rat: analysis using horseradish peroxidase and microiontophoresis., *Brain Research*, 333 (1985) 261-270.
85. Francois, Ch., Savy, C., Jan, C., Tande, D., Hirsch, E.C., and Yelnik, J., Dopaminergic innervation of the subthalamic nucleus in the normal state, in MPTP-treated monkeys, and in Parkinson's disease patients., *Journal Comparative Neurology*, 425 (2000) 121-129.
86. Hamani, C., Saint-Cyr, J.A., Fraser, J., Kaplitt, M., and Lozano, A.M., The subthalamic nucleus in the context of movement disorders., *Brain*, 127 (2004) 4-20.

87. Hassani,O.K., Francois,Ch., Yelnik,J., and Féger,J., Evidence for a dopaminergic innervation of the subthalamic nucleus in the rat., *Brain Research*, 749 (1997) 88-94.
88. Druga,R., Distribution of the nigropallidal neurons in the rat. (An experimental study using HPR and iron-dextran), *Functional and Developmental Morphology*, 3 (1993) 169-174.
89. Hassani,O.K., Mouroux,M., Bohme,G.A., Stutzmann,J.M., and Feger,J., Riluzole reduces hyperactivity of subthalamic neurons induced by unilateral 6-OHDA lesion in the rat brain., *Movement Disorders*, 16 (2001) 1110-1114.
90. Lindvall,O. and Björklund,A., Dopaminergic innervation of the globus pallidus by collateral from the nigrostriatal pathway., *Brain Research*, 172 (1979) 169-173.
91. Lindvall,O. and Hagell,P., Clinical observations after neural transplantation in Parkinson's disease, *Prog Brain Res*, 127 (2000) 299-320.
92. Yung,K.K.L., Bolam,J.P., Smith,A.D., Hersch,S.M., Ciliax,B.J., and Levey,A.L., Immunocytochemical localization of D1 and D2 Dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: Light and electron microscopy., *Neuroscience*, 65 (1995) 709-730.
93. Calon,F., Grondin,R., Morissette,M., Goulet,M., Blanchet,P.J., Di Paolo,T., and Bédard,P.J., Molecular basis of Levodopa-induced dyskinesias., *Annals of Neurology*, 47(Suppl 1) (2000) S70-S78.
94. Clark,D. and White,F.J., D1 dopamine receptor-the search for a function: a critical evaluation of the D1/D2 dopamine classification and its functional implications., *Synapse*, 1 (1997) 343-388.
95. Missale,C., Nash,S.R., Robinson,S.W., Jaber,M., and Caron,M.G., Dopamine receptors: from structure to function., *Physiol Rev*, 78 (1998) 189-225.
96. Spano,P.F., Govoni,S., and Trabucchi,M., Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system., *Adv Biochem Psychopharmacol*, 19 (1978) 155-165.
97. Keibian,J.W. and Calne,D.B., Multiple receptors for dopamine., *Nature*, 277 (1979) 93-96.
98. Gingrich,J. and Caron,M.G., Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors., *Annu Rev Neurosci*, 16 (1993) 299-321.
99. Herve,D., Levi-Strauss,M., Marey-Semper,I., Verney,C., Tassin,J.P., Glowinski,J., and Girault,J.A., Golf an Gs in rat basal ganglia: possible involvement of golf in the coupling of dopamine D₁ receptor with adenylyl cyclase., *Journal Neuroscience*, 13 (1993) 2237-2248.
100. Niznik,H.B., Sugamori,K.S., Clifford,J.J., and Waddington,J.L., D₁-Like dopamine receptors: molecular biology and pharmacology. In: Di Chiara,G. (Ed.), *Handbook of experimental pharmacology, Dopamine en the CNS I*, Vol. 154, Springer, Berlin, 2003, pp. 121-158.
101. Gaspar,P., Parent,M., Lévesque,M., and Parent,A., D₁ and D₂ receptor gene expression in the rat frontal cortex: cellular localization in different classes of efferent neurons., *Eur. J. of Neurosci*, 7 (1995) 1050-1063.
102. Mansour,A., Watson,S.J., and J.R., Dopamine receptor expression in central nervous system. In: Bloom,F.E., Kupfer,D.J. (Eds.), *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*, Raven Press, New York, 1995, pp. 207-219.
103. Bunzow,J.R., Van Tol,H.H.M., Grandy,D.K., Albert,P., Christe,M.D., Machida,C.A., Neve,K.A., and Civelli,O., Cloning and expression of a rat D₂ dopamine receptor cDNA., *Nature*, 336 (1988) 783-787.

104. Tan,S., Harmann,B., Iaccarino,C., Omiri,M., Usiello,A., and Borrelli,E., Understanding the function of the dopamine D₂ receptor: A knockout animal approach. In: Di Chiara,G. (Ed.), Handbook of experimental pharmacology, Dopamine in the CNS I., Vol. 154, Springer, Berlin, 2002, pp. 158-183.
105. Rodríguez-Díaz,M. and Macías,R., Fisiología del sistema dopaminérgico nigroestriatal: implicaciones en el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson, Neurología, 17(Supl 1) (2002) 28-36.
106. Weiner,D.M., Levey,A.I., Sunahara,R.K., Niznik,H.B., O'Dowd,B.F., Seeman,P., and Brann,M.R., D₁ and D₂ dopamine receptor mRNA in rat brain., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 (1991) 1859-1863.
107. Sokoloff,P. and Schwartz,J.C., The dopamine D₃ receptor and its implication in neuropsychiatry disorders and their treatments. In: Di Chiara,G. (Ed.), Handbook of experimental pharmacology, Dopamine in the CNS I., Vol. 154, Springer, Berlin, 2003, pp. 185-221.
108. Chio,C.L., Drong,R.F., Riley,D.T., Gill,G.S., Slightom,J.L., and Huff,R.M., D₄ dopamine receptor-mediated signaling events determined in transfected Chinese hamster ovary cells., J Biol Chem, 269 (1994) 11813-11819.
109. McHale,H., Coldwell,M.C., Herrity,N., Boyfield,I., Winn,F.M., Ball,S., Cook,T., Robinson,J.H., and Gloger,I.S., Expression and functional characterization of a synthetic version of the human D₄ dopamine receptor in a stable human cell line., FEBS Letter, 345 (1994) 147-150.
110. Feldpausch,D.L., Needham,L.M., Stone,M.P., Althaus,J.S., Yamamoto,B.K., Svensson,K.A., and Merchant,K.M., The role of dopamine D₄ receptor in the induction of behavioral sensitization to amphetamine and accompanying biochemical and molecular adaptations., J Pharmacol Exp Ther, 286 (1998) 497-508.
111. Mansbach,R.S., Brooks,E.W., Sanner,M.A., and Zorn,S.H., Selective dopamine D₄ receptor antagonists reverse apomorphine-induced blockade of prepulse inhibition., Psychopharmacol, 135 (1998) 194-200.
112. Civelli,O., Dopamine D₄ receptors: molecular biology and pharmacology. In: Di Chiara,G. (Ed.), Handbook of experimental pharmacology, Dopamine in the CNS I., Vol. 154, Springer, Berlin, 2003, pp. 223-232.
113. Mauger,C., Sivan,B., Brockhaus,M., Fuchs,S., Civelli,O., and Monsma,F.J., Development and characterization of antibodies directed against the mouse D₄ dopamine receptor., Eur. J. of Neurosci., 10 (1998) 529-537.
114. Rivera,A., Cuellar,B., Girón,F.J., Grandy,D.K., de la Calle,A., and Moratalla,R., Dopamine D₄ receptors are heterogeneously distributed in the striosomes/matrix compartments of the striatum., J. Neurochem., 80 (2002) 219-229.
115. Rivera,A., Alberti,I., Martín,A.B., Narvaez,J.A., de la Calle,A., and Moratalla,R., Molecular phenotype of rat striatal neurons expressing the dopamine D₅ receptor subtype., Eur. J. of Neurosci., 16 (2002) 2049-2058.
116. Luquin,M.R., Disquinesias y receptores dopaminérgicos. In: Obeso,J.A. (Ed.), Controversias en Neurología II, Drug Farma, S.L., Madrid, 2000, pp. 29-35.
117. Tedroff,J., Torstenson,R., Hartvig,P., Sonesson,C., Waters,N., Carlsson,A., Neu,H., Fasth,K.J., and Langstrom,B., Effects of the substituted *S* -3-phenylpiperidine y -OSU6162 on PET measurements in subhuman primates: evidence for tone-dependent normalization of striatal dopaminergic activity., Synapse, 28 (1998) 280-287.

118. Torstenson,R., Hartvig,P., Langstrom,B., Westerberg,G., and Tedroff,J., Differential effects of levodopa on dopaminergic function in early and advanced Parkinson's disease., *Ann. Neurol.*, 41 (1997) 334-340.
119. Wichmann,T. and DeLong,M.R., Physiology of Basal Ganglia and pathophysiology of Movement Disorders of Basal Ganglia. In: Wats,R.L., Koller,W.C. (Eds.), *Movement Disorders.*, McGraw Hill, Nueva York, 1997, pp. 87-98.
120. Wichmann,T., Bergman,H., Starr,P.A., Subramanian,T., Watts,R.L., and DeLong,M.R., Comparison of MPTP-induced changes in spontaneous neuronal discharge in the internal pallidal segment and in the substantia nigra pars reticulata in primates., *Experimental Brain Research*, 125 (1999) 397-409.
121. Fillion,M. and Tremblay,L., Abnormal spontaneous activity of Globus Pallidum neurons in monkeys with MPTP-induced parkinsonism., *Brain Res.*, 547 (1991) 142-151.
122. Brannan,T., Prikhojan,A., and Yahr,M.D., Effect of a selective MAO-A inhibitor (Ro 41-1049) on striatal L-DOPA and dopamine metabolism: an in vivo study., *Neural Transm.*, 8 (1994) 99-105.
123. Kita,H., Neostriatal and globus pallidus stimulation induced inhibitory postsynaptic potentials in entopeduncular neurons in rat brain slice preparations., *Neuroscience*, 105 (2001) 871-879.
124. Alvarez,L., Macías,R., Guridi,J., Lopez,G., Alvarez,E., Maragoto,C., Teijeiro,J., Torres,A., Pavon,N., Rodríguez-Oroz,M.C., Ochoa,L., Hetherington,H., Juncos,J.L., DeLong,M.R., and Obeso,J.A., Dorsal subthalamotomy for Parkinson's disease., *Movement Disorders*, 16 (2001) 72-78.
125. Hirsch,E.C., Périer,C., Orieux,G., Francois,Ch., Féger,J., Yelnik,J., Vila,M., Levy,R., Tolosa,E.S., Marin,C., Obeso,J.A., and Agid,Y., Metabolic effects of nigrostriatal denervation in basal ganglia., *Trends Neurosci.*, 23 (2000) S78-S85.
126. Kreiss,D.S., Mastropietro,C.W., Rawji,S.S., and Walters,J.R., The response of subthalamic nucleus neurons to dopamine receptor stimulation in a rodent model of Parkinson's disease., *J Neurosci*, 17 (1997) 6807-6819.
127. Marsden,C. and Obeso,J.A., The functions of the basal ganglia and the paradox of stereotaxic surgery in Parkinson's disease., *Brain.*, 117 (1994) 877-897.
128. Mouradian,M.M., Juncos,J.L., Fabbrini,G., Schlegel,J., Barto,J.J., and Chase,T.N., Motor fluctuations in Parkinson's disease: Central pathophysiological mechanisms, part II., *Ann. Neurol.*, 24 (1988) 372-378.
129. Carlsson,A., Lindqvist,M., and Magnusson,T., 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as reserpine antagonist., *Nature*, 180 (1957) 1200.
130. Jenner,P., The contribution of the MPTP-treated primate model to the development of new treatment strategies for Parkinson's disease., *Parkinsonism and Related Disorders*, 9 (2003) 131-137.
131. Gao,H.M., Hong,J.S., Zhang,W., and Liu,B., Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons, *The Journal of Neuroscience*, 22 (2002) 782-790.
132. Orth,M. and Tabrizi,S., Models of Parkinson's disease, *Movement Disorders*, 18 (2003) 729-737.
133. Sian,J., Youdim,M.B.H., Riederer,P., and Gerlach,M., Neurotransmitters and Disorders of the basal Ganglia. In: Siegel,G.J., Agranoff,B.W., Albers,R.W., Fisher,S.K., Uhler,M.D. (Eds.), *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1999, pp. 917-947.

134. Alexi T, Borlongan C.V, Faull R.L, Williams C.E, Clark R.G, Gluckman P.D, and Hughes P.E., Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's disease., *Progress in Neurobiology*, 60 (2000) 409-470.
135. Armstrong,R.J.E., Tyers,P., Jain,M., Richards,A., Dunnett,S.B., Rosser,A.E., and Barker,R.A., Transplantation of expanded neural precursor cells from the developing pig ventral mesencephalon in a rat model of Parkinson's disease, *Experimental Brain Research*, 151 (2003) 204-217.
136. Björklund,A., Sanches-Pernaute,R., Chung,S., Andersson,T., Chen,I.Y., McNaught,K.S., Brownell,A.L., Jenkins,B.G., Wahlestedt,C., Kim,K.S., and Isacson,O., Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 (2002) 2344-2349.
137. Cenci,M.A., Whishaw,I.Q., and Schallert,T., Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat?, *Nature Review/ Neuroscience*, 3 (2002) 574-579.
138. Gerin,C., Behavioral improvement and dopamine release in a Parkinsonian rat model, *Neuroscience Letter*, 330 (2002) 5.
139. Venero,J.L., Revuelta,M., Cano,J., and Machado,A., Time Course Changes in the Dopaminergic Nigrostriatal System Following Transection of the Medial Forebrain Bundle: Detection of Oxidatively Modified Proteins in Substantia Nigra., *J. Neurochem.*, 68 (1997) 2458-2468.
140. Hudson,J.L., van Horne,C.G., Strömberg,I., Brock,S., Clayton,J., Masserano,J., Hoffer,B.J., and Gerhardt,G.A., Correlation of apomorphine and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats., *Brain Research*, 626 (1993) 167-174.
141. Sealfon,S.C. and Olanow,C.W., Dopamine receptors: from structure to behavior., *Trends Neurosci.*, 23 (2000) S34-S40.
142. Bankiewicz,K., Mandel,R., and Sofroniew,M., Trophism, transplantation, and animal models of Parkinson's disease, *Experimental Neurology*, 124 (1993) 140-149.
143. Calne,D., Calne,B., and Zigmond,M.J., Compensatory mechanisms in the degenerative neurologic diseases., *Arch. Neurol.*, 48 (1991) 361-363.
144. Calon,F., Tahar,A.H., Blanchet,P.J., Morissette,M., Grondin,R., Goulet,M., Doucet,J.P., Robertson,G.S., Nestler,E., Di Paolo,T., and Bédard,P.J., Dopamine-receptor stimulation: biobehavioral and biochemical consequences., *Trends Neurosci.*, 23 (2000) S92-S100.
145. Ungerstedt,U. and Arbuthnott,G., Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-OHDA lesions of the nigrostriatal dopamine systems., *Brain Research*, 24 (1970) 485-493.
146. Bowenkamp,K.E., Lapchak,P.A., Hoffer,B.J., Miller,P.J., and Bickford,P.C., Intracerebroventricular Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Improves Motor Function and Supports Nigrostriatal Dopamine Neurons in Bilaterally 6-Hydroxydopamine Lesioned Rats., *Exp. Neurol.*, 145 (1997) 104-117.
147. Aoi,M., Date,I., Tomita,S., and Ohmoto,T., Single administration of GDNF into the striatum induced protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system in the intrastratial 6-OHDA injection model of hemiparkinsonism, *Restorative Neurology and Neuroscience*, 17 (2000) 31-38.
148. Gouhier,C., Chalon,S., Aubert,A., Venier,M.C., Jollivet,C., Benoit,J.P., and Guilloteau,D., Protection of dopaminergic nigrostriatal afferents by GDNF delivered by microspheres in a rodent model of Parkinson's disease, *Synapse*, 44 (2002) 124-131.

149. Montoya,C.P., Astell,S., and Dunnett,S.B., Effects of nigral and striatal grafts on skilled forelimb use in the rats., *Progress Brain Restorative*, 82 (1990) 459-466.
150. Montoya,C.P., Campbell-Hope,L.J., and Dunnett,S.B., The "Staircase test": A measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats., *J. Neurosci. Meth.*, 36 (1991) 219-228.
151. Blanchet,P.J., Boucher,R., and Bédard,P.J., Excitotoxic lateral pallidotomy does not relieve L-dopa induced dyskinesia in MPTP parkinsonian monkeys., *Brain Research*, 650 (1994) 32-39.
152. Blanchet,P.J., Allard,P., Gregoire,L., and et al, Risk factors for peak dose dyskinesia in 100 levodopa-treated parkinsonian patients., *Can J Neurol Sci*, 23 (1996) 189-193.
153. Kumar,A., Huang,Z., and de la Fuente-Fernández,R., Mechanisms of motor complications of treatment in Parkinson's disease., *Adv. Neurol.*, 91 (2003) 193-201.
154. Di Monte,D.A., McCormack,A., Petzinger,G., Janson,A.M., Quik,M., and Langston,J.W., Relationship among nigrostriatal denervation, Parkinsonism, and dyskinesias in the MPTP primate model., *Movement Disorders*, 15 (2000) 459-466.
155. Tedroff,J., Pederson,M., Aquilonius,S.M., Hartvig,P., Jacobsson,G., and Langstrom,B., Levodopa-induced changes in synaptic dopamine in patients with Parkinson's disease as measured by 11-C raclopride displacement and PET., *Neurology*, 46 (1996) 1430-1436.
156. Nutt,J.G. and Holford,N., The response to levodopa in Parkinson's disease: imposing pharmacological law and order., *Ann. Neurol.*, 39 (1996) 561-573.
157. Nutt,J.G., Obeso,J.A., and Stocchi,F., Continuous dopamine-receptor stimulation in advanced Parkinson's disease., *Trends Neurosci.*, 23 (2000) S109-S115.
158. Crossman,A.R., A hypothesis of the pathophysiological mechanism that underlie levodopa or dopamine-induced dyskinesia in Parkinson's disease., *Movement Disorders*, 5 (1990) 100-108.
159. Mitchell,I.J., Boyce,S., Sambrook,M.A., and Crossman,A.R., A 2-deoxyglucose study of the effects of dopamine agonists on the parkinsonian primate brain. Implications for the neural mechanisms that mediate dopamine agonist-induced dyskinesia., *Brain*, 115 (1992) 809-824.
160. Obeso,J.A., Rodríguez-Oroz,M.C., Rodríguez-Díaz,M., DeLong,M.R., and Olanow,C.W., Pathophysiology of Levodopa-Induced Dyskinesias in Parkinson's Disease: Problems with the current model., *Annals of Neurology*, 47(Suppl 1) (2000) S22-S34.
161. Bezard,E., Brotchie,J.M., and Gross,C.E., Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies., *Nature Review Neuroscience*, 2 (2001) 577-588.
162. Papa,S.M., Engber,T.M., Kask,A.M., and Chase,T.N., Motor fluctuations in levodopa treated parkinsonian rats: relation to lesion extent and treatment duration., *Brain Res*, 662 (1994) 69-74.
163. Thompson,G., Successful brain grafting, *NY. Med. Journal*, 51 (1890) 701-702.
164. Le Gross Clark,W., Neuronal differentiation in implanted foetal cortical tissue, *Journal Neurol Psychiatric*, 3 (1940) 263-284.
165. Björklund,A., Schmidt,R.H., and Stenevi,U., Growth of transplanted monoaminergic neurons into the adult hippocampus along the perforant path., *Nature*, 262 (1976) 787-790.
166. Stenevi,U., Björklund,A., and Svendgaard,N., Transplantation of central and peripheral monoamine neurons to the adult rats brain: techniques and condition for surgical., *Brain Res.*, 114 (1976) 1-20.

167. Kordower, J., Freeman, T., Chen, E.Y., Mufson, E., Sanberg, P., Hauser, R., Snow, B., and Olanow, C.W., Fetal nigral grafts survive and mediate clinical benefit in a patient with Parkinson's disease, *Movement Disorders*, 13 (1998) 383-393.
168. Gage, F.H., Kang, U., and Fisher, S.K., Intracerebral grafting in the dopaminergic system: issues and controversy, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 1 (1991) 414-419.
169. Freed, W.J., Willingham, G., and Heim, R., Effects of Adrenal Medulla and Sciatic nerve Co-Grafts in rats with unilateral Substantia nigra lesion., *Journal of Neural Transplantation & Plasticity*, 3 (1992) 159-167.
170. Freed, W.J., Karoum, F., Spoor, H.E., Morihisa, J.M., Olson, L., and Wyatt, R.J., Catecholamine content of intracerebral adrenal medulla grafts., *Brain Research*, 269 (1983) 184-189.
171. Björklund, A. and Stenevi, U., Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants., *Brain Res.*, 177 (1979) 555-560.
172. Björklund, A. and Lindvall, O., Cell replacement therapies for central nervous system disorders, *Nat Neurosci*, 3 (2000) 537-544.
173. Nakao, N., Ogura, M., Nakai, K., and Itakura, T., Intrastratial mesencephalic grafts affect neuronal activity in Basal Ganglia nuclei and their target structures in a rat model of Parkinson's Disease., *J. Neurosci.*, 18 (1998) 1806-1817.
174. Rodríguez, J., Montaron, M., Arousseau, C., Le Moal, M., and Abrous, N., Effects of amphetamine and cocaine treatment on c-Fos; Jun-B and Krok-24 expression in rats with intrastratial dopaminergic grafts., *Exp. Neurol.*, 159 (1999) 139-152.
175. Dunnett, S.B. and Björklund, A., Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease., *Nature (Suppl)*, 399 (1999) A-32-A-39.
176. Mendez, I., Dagher, A., Hong, M., Hebb, A., Gaudet, P., Law, A., Weerasinghe, S., King, D., Desrosiers, J., Darvesh, S., Acorn, T., and Robertson, H.A., Enhancement of survival of stored dopaminergic cells and promotion of rotational behaviour is dependent on both striatal and nigral mechanisms., *Journal Neuroscience*, 9 (2000) 3326-3331.
177. Baker, K.A., Sadi, D., Hong, M., and Mendez, I., Simultaneous Intrastratial and Intranigral Dopaminergic Grafts in the Parkinsonian Rat Model: Role of the Intranigral Graft, *Journal Comparative Neurology*, 426 (2000) 106-116.
178. Dunnett, S.B., Björklund, A., and Lindvall, O., Cell therapy in Parkinson's disease - stop or go?, *Nat Rev Neurosci*, 2 (2001) 365-369.
179. Djaldetti, R. and Melamed, E., New therapies for Parkinson's disease, *Journal of Neurology*, 248 (2001) 357-362.
180. Dunnett, S.B., Björklund, A., and Stenevi, U., Graft of embryonic substantia nigra reinnervating the ventrolateral striatum ameliorate sensorimotor impairment and akinesia in rat with 6-OHDA lesion of the nigrostriatal pathway., *Brain Res.*, 229 (1981) 209-217.
181. Dunnett, S.B., Björklund, A., and Schmidt, R.H., Intracerebral grafting of neural cells suspensions. IV Behavioral recovery in rats with unilateral 6-OHDA lesion following implantation of nigral cells suspensions., *Acta Physiol. Scand. (Suppl)*, 522 (1983) 29-37.
182. Dunnett, S.B., Blunch, S., Gage, F.H., and Björklund, A., Dopamine-rich transplants in rat with 6-OHDA lesion of the ventral tegmental area: effects on spontaneous and drug-induced locomotor activity., *Behav. Brain Res.*, 13 (1984) 71-82.

183. Wenning,G.K., Odin,P., Morrish,P., Rehncrona,S., Widner,H., Brundin,P., Rothwell,J.C., Brown,R., Gustavii,B., Hagell,P., Jahanshahi,M., Sawle,G., Björklund,A., Brooks,D.J., Marsden,C., Quinn,N.P., and Lindvall,O., Short- and long-term survival and function of unilateral intrastriatal dopaminergic grafts in Parkinson's disease., *Ann of Neurology*, 42 (1997) 95-107.
184. Mendez,I., Hong,M., Smith,S., Dagher,A., and Desrosiers,J., Neural transplantation cannula and microinjector system: experimental and clinical experience. Technical note., *Journal Neurosurgery*, 92 (2000) 493-499.
185. Hudson,J.L., Bickford,P.C., Johansson,M., Hoffer,B.J., and Strömberg,I., Target and Neurotransmitter especificity of Fetal Central Nervous System transplants: importance for functional reinnervation., *J. Neurosci.*, 14 (1994) 283-290.
186. Bankiewicz,K., Plunkett,R.J., Mefford,I., Kopin,I.J., and Oldfield,E.H., Behavioral recovery from MPTP-induced parkinsonism in monkeys after intracerebral tissue implants is not related to CSF concentrations of dopamine metabolites., *Progress Brain Restorative*, 82 (1990) 561-571.
187. Plunkett,R.J., Bankiewicz,K., Cummins,A.C., Miletich,R.S., Schwartz,J.P., and Oldfield,E.H., Long-term evaluation of hemiparkinsonian monkeys after adrenal autografting or cavitation alone., *Journal Neurosurgery*, 73 (1990) 918-926.
188. Bankiewicz,K.S., Plunkett,R.J., Jacobowitz,D.M., Porrino,L., di Porzio,U., London,W.T., Kopin,I.J., and Oldfield,E.H., The effect of fetal mesencephalon implants on primate MPTP-induced parkinsonism. Histochemical and behavioral studies., *Journal Neurosurgery*, 72 (1990) 231-244.
189. Olanow,C.W., Kordower,J.H., and Freeman,T.B., Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease., *Trends Neurosci.*, 19 (1996) 102-109.
190. Nikkhah,G. Microtransplantation of nigral dopamine neurons in a rat model of Parkinson's disease. 1994. Department of Medical Cell Research. Sweden.
191. Nikkhah,G., Cunningham,M.G., and Björklund,A., Intranigral foetal dopamine graft induce behavioral compensation in the rat parkinson models., *J. Neurosci.*, 6 (1994) 3449-3461.
192. Dunnett,S.B., Functional repair of striatal systems by neural transplants: evidence for circuit reconstruction., *Behav. Brain Res.*, 66 (1995) 133-142.
193. Bevan,M.D. and Bolam,J.P., Cholinergic, GABAergic, and glutamate-enriched inputs from the mesopontine tegmentum to the subthalamic nucleus in the rat., *J. Neurosci.*, 15 (1995) 7105-7120.
194. Orieux,G., Francois,C., Feger,J., Yelnik,J., Vila,M., Ruberg,M., Agid,Y., and Hirsch,E.C., Metabolic activity of excitatory parafascicular and pedunculopontine inputs to the subthalamic nucleus in a rat model of Parkinson's disease., *Neuroscience.*, 97 (2000) 79-88.
195. Hassani,O.K. and Feger,J., Effects of intrasubthalamic injection of dopamine receptor agonists on subthalamic neurons in normal and 6-hydroxydopamine rats: an electrophysiological and c-Fos study., *Neuroscience*, 92 (1999) 533-543.
196. Hazrati,L.N. and Parent,A., Convergence of subthalamic and striatal efferents at pallidal level in primates: and anterograde double-labeling study with biocytin and PHA-L., *Brain Res*, 569 (1992) 336-340.
197. Carpenter,M.B., Carleton,S.C., Keller,J.T., and Conte,P., Connections of the subthalamic nucleus in the monkeys., *Brain Res*, 224 (1981) 1-29.

198. Smith,Y., Hazrati,L.N., and Parent,A., Efferent projections of the subthalamic nucleus in the squirrel monkey as studied by the PHA-L anterograde tracing method., *Journal Comparative Neurology*, 294 (1990) 306-323.
199. Smith,Y., Charara,A., and Parent,A., Synapsis innervation of midbrain dopaminergic neurons by glutamate-enriched terminals in the squirrel monkey., *J. Comp. Neurol.*, 364 (1996) 231-253.
200. Laitinen,L.V., Bergnheim,A.T., and Hariz,M.L., Leksell's posteroventral pallidotomy in the treatment of Parkinson's disease., *Neurosurg.*, 76 (1992) 53-61.
201. Nambu,A., Takada,M., Inase,M., and Tokuno,H., Dual somatotopical representations in the primate subthalamic nucleus: evidence for ordered but reversed body-map transformations from the primary motor cortex and the supplementary motor area., *The Journal of Neuroscience*, 16 (1996) 2671-2683.
202. Charara,A., Smith,Y., and Parent,A., Glutamatergic inputs from the pedunclopontine nucleus to midbrain dopaminergic neurons in primates: Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin anterograde labeling combined with postembedding glutamate and GABA immunohistochemistry., *Journal Comparative Neurology*, 364 (1996) 254-266.
203. González,C. and Chesselet,M.F., Amygdalonigral pathway: An anterograde tracing study in the rat with Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L)., *J. Comp. Neurol.*, 297 (1990) 182-200.
204. Naito,A. and Kita,H., The cortico-nigral projection in the rat: An anterograde tracing study with biotinylated dextran amine., *Brain Research*, 637 (1994) 317-322.
205. Rodríguez-Oroz,M.C., Obeso,J.A., and Olanow,C.W., Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection., *Ann Neurol*, 44(Suppl 1) (1998) S175-S188.
206. Paquet,M., Tremblay,M., Soghomonian,J.J., and Smith,Y., AMPA and NMDA glutamate receptor subunits in midbrain dopaminergic neurons in the squirrel monkey: an immunohistochemical and in situ hybridization study., *J. Neurosci.*, 17 (1997) 1377-1396.
207. Di Loreto,S., Florio,T., and Scarnati,E., Evidence that non-NMDA receptors are involved in the excitatory pathway from the pedunclopontine region to nigrostriatal dopaminergic neurons., *Brain Research*, 89 (1992) 79-86.
208. Tong,Z.Y., Overton,P.G., and Clark,D., Antagonism of NMDA receptors but not AMPA/Kainate receptors blocks bursting dopaminergic neurons induced by electrical stimulation of the prefrontal cortex., *Journal Neural Transm.*, 103 (1996) 889-904.
209. Hammond,C., Deniau,J.M., Rizk,A., and Feger,J., Electrophysiological demonstration of an excitatory subthalamonigral pathway in the rat., *Brain Research*, 151 (1978) 235-244.
210. Mintz,I., Hammond,C., and Féger,J., Excitatory effect of iontophoretically applied dopamine on identified neurons of the rat subthalamic nucleus., *Brain Research*, 375 (1986) 172-175.
211. Feger,J. and Robledo,P., The effects of activation or inhibition of the subthalamic nucleus on the metabolic and electrophysiological activities within the pallidal complex and substantia nigra in the rat., *European Journal of Neuroscience*, 3 (1991) 947-952.
212. Smith,A.D. and Grace,A.A., Role of the subthalamic nucleus in the regulation of nigral dopamine neuron activity., *Synapse.*, 12 (1992) 287-303.
213. Kitai,S.T. and Deniau,J.M., Cortical inputs to the subthalamus: intracellular analysis., *Brain Research*, 214 (1981) 411-415.

214. Canteras,N.S., Shammah-Lagnado,S.J., Silava,B.A., and Ricardo,J.A., Afferent connections of the subthalamic nucleus: a combined retrograde and anterograde horseradish peroxidase study in the rat., *Brain Research*, 513 (1990) 43-59.
215. Flores,G., Liang,J.J., Sierra,A., Martinez-Fong,D., Quirion,R., Aceves,J., and Srivastava,L.K., Expression of dopamine receptors in the subthalamic nucleus of the rat: characterization using reverse transcriptase-polymerase chain reaction and autoradiography., *Neuroscience.*, 91 (1999) 549-556.
216. Kreiss,D.S., Anderson,L.A., and Walters,J.R., Apomorphine and dopamine D1 receptor agonists increase the firing rates of subthalamic nucleus neurons., *Neuroscience.*, 72 (1996) 863-876.
217. Kreiss,D.S. and Walters,J.R., Dopamine D2 receptors tone plays a critical role in dopamine D1 receptor mediated excitatory effects on subthalamic nucleus neurons., *Soc. Neurosci. Abs.*, 23 (1997) 746.
218. Guide to the care and use of experimental animals. Canadian Council on animal care, Vol. 2 1984.
219. Franklin,A. and Paxinos,G., *Mouse Brain Stereotaxic Coordinates*. 1997.
220. Henry,B., Duty,S., Fox,S.H., Crossman,A.R., and Brotchie,J.M., Increased striatal pre-proenkephalin B expression is associated with dyskinesia in Parkinson's disease., *Experimental Neurology*, 183 (2003) 458-468.
221. Fredduzzi,S., Moratalla,R., Monopoli,A., Cuellar,B., Xu,K., Ongini,E., Impagnatiello,F., Schwarzschild,M.A., and Chen,J.F., Persistent behavioral sensitization to chronic L-DOPA requires A2A adenosine receptors., *J Neurosci*, 22 (2002) 1054-1062.
222. Paxinos,G. and Watson,C., *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2nd the Academic Press. New York, 1986.
223. Lorigados,L., Soderstrom,S., and Ebendal,T., Two-site enzyme immunoassay for β -NGF applied to human patient sera. *Journal of Neuroscience Research*, 32 (1992) 329-339.
224. West,M.J., *New Stereological Methods for Counting Neurons.*, *Neurobiology of Aging.*, 14 (1993) 275-285.
225. Heeringa,M. and Abercrombie,E., Biochemistry of somatodendritic dopamine release in substantia nigra: an in vivo comparison with striatal dopamine release., *J. Neurochem.*, 65 (1995) 192-200.
226. Rodríguez-Díaz,M., Barroso-Chinea,P., Abdala,P., Obeso,J.A., and González-Hernández,T., Dopamine cell degeneration induced by intraventricular administration of 6-hydroxydopamine in the rat: similarities with cell loss in Parkinson's disease., *Experimental Neurology*, 169 (2001) 163-181.
227. Shen,K.Z. and Johnson,S.W., Dopamine depletion alters responses to glutamate and GABA in the rat subthalamic nucleus., *Neuro Report.*, 16 (2005) 171-174.
228. Connor,B., Kozlowski,D.A., Unnerstall,J.R., Elsworth,J.D., Tillerson,J.L., Schallert,T., and Bohn,M.C., Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) gene delivery protects dopaminergic terminals from degeneration., *Exp. Neurol.*, 169 (2001) 83-95.
229. Costantini,L.C., Cole,D., and Isaacson,O., Immunophilin ligands can prevent progressive dopaminergic degeneration in animals models of Parkinson's disease., *European Journal of Neuroscience*, 13 (2001) 1085-1092.

230. Kirik,D., Rosenblad,C., Björklund,A., and Mandel,R.J., Long-term rAAV-mediated gene transfer of GDNF in the rat Parkinson's models: Intrastratial but not intranigral transduction promotes functional regeneration in the lesioned nigrostriatal system., *J. Neurosci.*, 20 (2000) 4686-4700.
231. Kirik,D., Rosenblad,C., and Björklund,A., Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastratial 6-hydroxydopamine in the rat., *Exp. Neurol.*, 152 (1998) 259-277.
232. Winkler,C., Kirik,D., Björklund,A., and Cenci,M.A., L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastratial 6-hydroxydopamine model of Parkinson's Disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function., *Neurobiology of Disease*, 10 (2002) 165-186.
233. Ben-Hur,T., Idelson,M., Khaner,H., Pera,M., Reinhartz,E., Itzik,A., and Reubinoff,B.E., Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors improves behavioral deficit in Parkinsonian rats., *Stem cells*, 22 (2004) 1246-1255.
234. Ochi,M., Shiozaki,S., and Kase,H., Adenosine A(2A) receptor-mediated modulation of GABA and glutamate release in the output regions of the basal ganglia in a rodent model of Parkinson's disease., *Neuroscience*, 127 (2004) 223-231.
235. Ungerstedt,U. and Herrera-Marshcitz,M., Behavioral pharmacology of dopamine receptors mechanisms. In: Stjarne,L., Hedqvist,H., Lagercrantz,H., Wennmalm,A. (Eds.), *Chemical Neurotransmission: 75 years.*, Academic Press, London, 1981, pp. 481-494.
236. Kirik,D., Winkler,C., and Björklund,A., Growth and functional efficacy of intrastratial nigral transplants depend on the extent of nigrostriatal degeneration., *J Neurosci*, 21 (2001) 2889-2896.
237. Fillion,M., Physiologic basis of dyskinesia., *Annals of Neurology*, 47(Suppl 1) (2000) S35-S41.
238. Jenner,P. and Obeso,J.A., Origen de las discinesias inducidas por Levodopa: estudios en el modelo del mono tratado con MPTP, *Neurología*, 18(Supl 1) (2003) 19-23.
239. Olanow,C.W., Damier,P., Goetz,C.G., Mueller,T., Nutt,J.G., Rascol,O., Serbanescu,A., Deckers,F., and Russ,H., Multicenter, open-label, trial of sarizotan in Parkinson disease patients with levodopa-induced dyskinesias (the SPLENDID Study)., *Clinical Neuropharmacol*, 27 (2004) 58-62.
240. Lundblad,M., Picconi,B., Lindgren,H., and Cenci,M.A., A model of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function., *Neurobiology of Disease*, 16 (2004) 110-123.
241. Koob,G.F., Simon,H., Herman,J.P., and Le Moal,M., Neuroleptic-like disruption of the conditioned avoidance response requires destruction of both the mesolimbic and nigrostriatal dopamine systems., *Brain Res*, 303 (1984) 319-329.
242. Sharp,T., Zetterstrom,T., Ljungberg,T., and Ungerstedt,U., A direct comparison of amphetamine-induced behaviours and regional brain dopamine release in the rat using intracerebral dialysis., *Brain Res*, 401 (1987) 322-330.
243. Chase,T.N. and Oh,J.D., Striatal dopamine-and glutamate-mediated dysregulation in experimental parkinsonism., *Trends Neurosci.*, 23 (Suppl. Basal ganglia, Parkinson's disease and levodopa therapy) (2000) S86-S91.
244. Tahar,A.H., Ekesbo,A., Grégoire,L., Bangassoro,E., Svensson,K.A., Tedroff,J., and Bédard,P.J., Effects of acute and repeated treatment with a novel dopamine D₂ receptor ligand on L-DOPA-induced dyskinesias in MPTP monkeys., *European Journal of Pharmacology*, 412 (2001) 247-254.

245. Battisti,J.J., Uretsky,N.J., and Wallance,L.J., NMDA glutamate receptor role in the development of context-dependent and independent sensitization of the induction of stereotypy by amphetamine or apomorphine., Behavioral Brain Research, 114 (2000) 167-174.
246. de la Fuente-Fernández,R., Sossi,V., Huang,Z., Furtado,S., Lu,J.Q., Calne,D.B., Rurh,T.J., and Stoessl,A.J., Levodopa-induced changes in synaptic dopamine levels increase with progression of Parkinson's disease: implications for dyskinesias., Brain, 127 (2004) 2747-2754.
247. Aubert,I., Guigoni,C., Hakansson,K., Li,Q., Dovero,S., Barthe,N., Bioulac,BH., Gross,CE., Fisone,G., Bloch,B., and Bezard,E., Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia., Ann Neurol, 57 (2005) 17-26.
248. Bezard,E., Ferry,S., Mach,U., Stark,H., Leriche,L., Boraud,T., Gross,C., and Sokoloff,P., Attenuation of levodopa-induced dyskinesia by normalizing dopamine D3 receptor function., Nat. Med., 6 (2003) 762-767.
249. Bordet,R., Ridray,S., Carboni,S., Diaz,J., Sokoloff,P., and Schwartz,J.C., Induction of dopamine D3 receptor expression as a mechanism of behavioral sensitization to levodopa., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94 (1997) 3363-3367.
250. Moratalla,R., Elibol,B., Vallejo,M., and Graybiel,A.M., Network-level changes in expression of inducible Fos-Jun proteins in the striatum during chronic cocaine treatment and withdrawal., Neuron, 17 (1996) 147-156.
251. McClung,C.A. and Nestler,E.J., Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB., Nat Neurosci, 6 (2003) 1208-1215.
252. Svenningsson,P., Fredholm,B.B., Bloch,B., and Le Moine,C., Co-stimulation of D(1)/D(5) and D(2) dopamine receptors leads to an increase in c-fos messenger RNA in cholinergic interneurons and a redistribution of c-fos messenger RNA in striatal projection neurons., Neuroscience, 98 (2000) 749-757.
253. Brotchie,J.M., The neural mechanisms underlying levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease., Ann. Neurol., 47 (suppl. 1) (2000) 105-114.
254. Nisbet,A.P., Foster,O.J., Kingsbury,A., Eve,D.J., Daniel,S.E., Marsden,C.D., and Lees,A.J., Preproenkephalin and preprotachykinin messenger RNA expression in normal human basal ganglia and in Parkinson's disease., Neuroscience, 66 (1995) 361-376.
255. Moratalla,R., Xu,M., Tonegawa,S., and Graybiel,A.M., Cellular responses to psychomotor stimulant and neuroleptic drugs are abnormal in mice lacking the D1 dopamine receptor., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 (1996) 14928-14933.
256. Cenci,M.A., Transcription factors involved in the pathogenesis of L-DOPA-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease., Amino Acids, 23 (2003) 105-109.
257. Johansson,P.A., Andersson,M., Andersson,K.E., and Cenci,M.A., Alterations in cortical and basal ganglia levels of opioid receptor binding in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia., Neurobiology of Disease, 8 (2001) 220-239.
258. Andersson,M., Hilbertson,A., and Cenci,M.A., Striatal *fosB* expression is causally linked with L-DOPA-induced abnormal involuntary movements and the associated upregulation of striatal prodynorphin mRNA in a rat model of Parkinson's disease., Neurobiology of Disease, 6 (1999) 461-474.
259. Saka,E., Goodrich,C., Harlan,P., Madras,B.K., and Graybiel,A.M., Repetitive behaviors in monkeys are linked to specific striatal activation patterns., Journal Neuroscience, 24 (2004) 7557-7565.

260. Mansour,A., Fox,C.A., Burke,S., Meng,F., Thompson,R.C., Akil,H., and Watson,S.J., Mu, delta and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: An *in situ* hybridization study., *J. Comp. Neurol.*, 350 (1994) 412-438.
261. Calabresi,P., Centonze,D., and Bernardi,G., Electrophysiology of dopamine in normal and denervated striatal neurons., *Trends in Neurosciences.*, 23 (2000) S57-S63.
262. Grandas,F.J., Etiopatogenia de las disquinesias inducidas por levodopa en la enfermedad de Parkinson. In: Obeso,J.A. (Ed.), *Controversias en Neurología II. Disquinesias en la Enfermedad de Parkinson.*, Drug Farma, SL, Madrid, 2000, pp. 19-27.
263. Hutchinson,W.D., Levy,R., Dostrovsky,J.O., Lozano,A.M., and Lang,A.E., Effects of apomorphine on *globus pallidum* neurons in Parkinsonian patients., *Ann of Neurology*, 42 (1997) 767-775.
264. Lozano,A.M., Lang,A.E., Levy,R., Hutchinson,W.D., and Dostrovsky,J.O., Neuronal recordings in PD patients with dyskinesias induced by apomorphine., *Ann of Neurology*, 47 (2000) S141-S146.
265. Papa,S.M., Desimone,R., Fiorane,M., and Oldfield,E.H., Internal *globus pallidum* discharge is nearly suppressed during levodopa-induced dyskinesia., *Ann of Neurology*, 46 (1999) 732-738.
266. Vila,M., Levy,R., Herrero,M.T., Ruberg,M., Faucheux,B., Obeso,J.A., Agid,Y., and Hirsch,E.C., Consequences of nigrostriatal denervation on the functioning of the basal ganglia in human and nonhuman primates: an *in situ* hybridization study of cytochrome oxidase subunit I mRNA., *Journal Neuroscience*, 17 (1997) 765-773.
267. Herrero,M.T., Levy,R., Ruberg,M., Luquin,M.R., Villares,J., Guillén,J., Faucheux,B., Javoy-Agid,F., Guridi,J., Agid,Y., Obeso,J.A., and Hirsch,E.C., Consequence of nigrostriatal denervation and L-dopa therapy on the expression of glutamic acid decarboxilase messenger RNA in the pallidum., *Neurology*, 47 (1996) 219-224.
268. Calon,F., Goulet,M., Blanchet,P.J., Marcel,J.C., Piercey,M.F., Bedard,P.J., and Di Paolo,T., Levodopa or D2 agonist induced dyskinesia in MPTP monkeys: correlation with changes in dopamine and GABA_A receptors in the striatopallidal complex., *Brain Research*, 680 (1995) 43-52.
269. Hadj-Tahar,A., Ekesbo,A., Gregoire,L., Bangassoro,E., Svensson,K.A., Tedroff,J., and Bédard,P.J., Effects of acute and repeated treatment with a novel dopamine D2 receptor ligand on L-DOPA-induced dyskinesias in MPTP monkeys., *European Journal of Pharmacology*, 412 (2001) 247-254.
270. Kovoov,A., Seyffarth,P., Ebert,J., Barghshoon,S., Chen,C.K., Schwarz,S., Axelrod,J.D., Cheyette,B.N., Simon,M.I., Lester,H.A., and Schwarz,J., D2 dopamine receptors colocalize regulator of G-protein signaling 9-2 (RGS9-2) via the RGS9 DEP domain, and RGS9 knock-out mice develop dyskinesias associated with dopamine pathways., *Journal Neuroscience*, 25 (2005) 2157-2165.
271. Mercuri,N.B. and Bernardi,G., The 'magic' of L-dopa: why is it the gold standard Parkinson's disease therapy?, *Trends Pharmacol Sci.*, 26 (2005) 341-344.
272. Guttman,M. and Seeman,P., L-DOPA reverses the elevated density of D2 dopamine receptors in Parkinson's diseased striatum., *Journal Neural Transm.*, 64 (1985) 93-103.
273. Seeman,P., Bzowej,N.H., Guan,H.C., Bergeron,C., Reynolds,G.P., Bird,E.D., Riederer,P., Jellinger,K., and Tourtellotte,W.W., Human brain D1 and D2 dopamine receptors in schizophrenia, Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's diseases., *Neuropsychopharmacology*, 1 (1987) 5-15.

274. Alexander,G.M., Schwartzman,R.J., Grothusen,J.R., Brainard,L., and Gordon,F.W., Changes in brain dopamine receptors in MPTP parkinsonian monkeys following L-DOPA treatment., *Brain Research*, 625 (1993) 276-282.
275. Falardeau,P., Bédard,P.J., and Di Paolo,T., Relation between brain dopamine loss and D2 dopamine receptor density in MPTP monkeys., *Neuroscience Letter*, 86 (1988) 225-229.
276. Bédard,P.J., Di Paolo,T., Falardeau,P., and Boucher,R., Chronic treatment with L-DOPA, but not bromocriptine induces dyskinesias in MPTP-parkinsonian-monkeys. Correlation with [³H]spiperone binding., *Brain Research*, 379 (1986) 294-299.
277. Gagnon,C., Bédard,P.J., and Di Paolo,T., Effect of chronic treatment of MPTP monkeys with dopamine D-1 and/or D-2 receptor agonists., *European Journal of Pharmacology*, 178 (1990) 115-120.
278. Turjanski,N., Lees,A.J., and Brooks,D.J., In vivo studies on striatal dopamine D1 and D2 site binding in L-dopa-treated Parkinson's disease patients with and without dyskinesias., *Neurology*, 49 (1997) 717-723.
279. Zappia,M., Annesi,G., Nicoletti,G., Arabia,G., Annesi,F., Messina,D., Pugliese,P., Spadafora,P., Tarantino,P., Carrideo,S., Civitelli,D., De Marco,E.V., Ciro-Candiano,I.C., Gambardella,A., and Quattrone,A., Sex differences in clinical and genetic determinants of levodopa peak-dose dyskinesias in Parkinson disease: an exploratory study., *Arch Neurol*, 62 (2005) 601-605.
280. Bamford,N.S., Robinson,S., Palmiter,R.D., Joyce,J.A., Moore,C., and Meshul,C.K., Dopamine modulates release from corticostriatal terminals., *J Neurosci*, 24 (2004) 9541-9552.
281. Arnt,J. and Hyttel,J., Differential involvement of dopamine D-1 and D-2 receptors in the circling behavioral induced by apomorphine, SKF 38393, pergolide and LY 171555 in 6-hydroxydopamine-lesioned rats., *Psychopharmacology (Berl)*, 85 (1985) 346-352.
282. Centonze,D., Gubellini,P., Picconi,B., Calabresi,P., Giacomini,P., and Bernardi,G., Unilateral dopamine denervation blocks corticostriatal LTP., *J Neurophysiol*, 82 (1999) 3575-3579.
283. Cepeda,C., Hurst,R.S., Altemus,K.L., Flores-Hernández,J., Calvert,C.R., Jokel,E.S., Grandy,D.K., Low,W.J., Rubinstein,M., Ariano,M.A., and Levine,M.S., Facilitated Glutamatergic transmission in the striatum of D₂ dopamine receptor-deficient mice., *J Neurophysiol*, 85 (2001) 659-670.
284. Picconi,B., Centonze,D., Rossi,S., Bernardi,G., and Calabresi,P., Therapeutic doses of L-DOPA reverse hypersensitivity of corticostriatal D2-dopamine receptors and glutamatergic overactivity in experimental parkinsonism., *Brain*, 127 (2004) 1661-1669.
285. Rajakumar,N., Laurier,L., and Niznik,H.B., Effects of intrastriatal infusion of D2 receptor antisense oligonucleotide on apomorphine-induced behavioral in the rat., *Synapse*, 26 (1997) 199-208.
286. Sealfon,S.C., Dopamine receptors and locomotor responses: molecular aspects., *Annals of Neurology*, 47 (suppl 1) (2000) S12-S21.
287. Cromwell,H.C., Berridge,K.C., Drago,J., and Levine,M.S., Action sequencing is impairment in D1A-deficient mutant mice., *European Journal of Neuroscience*, 10 (1998) 2426-2432.
288. Murer,M.G., Dziewczapolski,G., Salin,P., Vila,M., Tseng,K.Y., Ruberg,M., Rubinstein,M., Kelly,M.A., Grandy,D.K., Low,M.J., Hirsch,E.C., Raisman-Vozari,R., and Gershanik,O., The indirect basal ganglia pathway in dopamine D₂ receptor-deficient mice., *Neuroscience*, 99 (2000) 643-650.

289. Arica,B., Kas,H.S., Moghdam,A., Akalan,N., and Hincal,A.A., Carbidopa/levodopa-loaded biodegradable microspheres: in vivo evaluation on experimental Parkinsonism in rats., *J Control Release*, 102 (2005) 689-697.
290. Barker,R.A. and Widner,H., Immune Problems in Central Nervous System Cell Therapy., *Neuron*, 1 (2004) 472-481.
291. Richardson,R.M., Broaddus,W.C., Holloway,K.L., and Fillmore,H.L., Grafts of adult subependymal zone neuronal progenitor cells rescue hemiparkinsonian behavioral decline., *Brain Research*, 1032 (2005) 11-22.
292. Yasuhara,T., Shingo,T., Muraoka,K., Kobayashi,K., Takeuchi,A., Yano,A., Wenji,Y., Kameda,M., Matsui,T., Miyoshi,Y., and Date,I., Early transplantation of an encapsulated glial cell line-derived neurotrophic factor-producing cell demonstrating strong neuroprotective effects in a rat model of Parkinson disease., *Journal Neurosurgery*, 102 (2005) 80-89.
293. Barnéoud,P., Parmentier,S., Mazadier,M., Miquel,J.M., Boireau,A., Dubedat,P., and Blanchard,J.C., Effects of complete and partial lesions of the dopaminergic mesotelencephalic system on skilled forelimb use in the rat., *Neuroscience*, 67 (1995) 837-848.
294. Dunnett,S.B., Björklund,A., Gage,F.H., and Stenevi,U., Transplantations of mesencephalic dopamine neurons to the striatum of adult rats. In: Björklund,A., Stenevi,U. (Eds.), *Neural Grafting in the mammalian CNS*, Elsevier, New York; Londres, 1985, pp. 451-469.
295. Björklund A., Stenevi U, Schmidt R.H, Dunnett S.B., and Gage F.H., Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. I. Introduction and general methods of preparation., *Acta Physiol. Scand.*, 522 (1983) 1-7.
296. Nguyen,J.P., Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease. Update and future., *Neurochirurgie*, 50 (2004) 619-623.
297. Date,I., Kawamura,K., Nakashima,H., Ono,K., and Nishimoto,A., Intraparenchymal allografts in the mouse brain in relation to immunocytochemical identification of T lymphocyte subset., *Neuroscience Letters*, 86 (1988) 17-20.
298. Lawrence,J.M., Morris,R.J., Wilson,D.J., and Raisman,G., Mechanisms of allograft rejection in the rat brain., *Neuroscience*, 37 (1990) 431-462.
299. Sloan,D.J., Baker,B.J., Puklavec,M., and Charlton,H.M., The effects of site of transplantation and histocompatibility differences on the survival of neural tissue transplanted to the CNS of defined inbred rat strains., *Progress Brain Restorative*, 82 (1990) 141-152.
300. Emmett,C.J., Jaques,B.W., and Seeley,P.J., Microtransplantation of neural cells into adult rat brain., *Neuroscience*, 38 (1990) 213-222.
301. Nikkhah,G., Olsson,M., Eberthal,J., Bentlage,C., Cunningham,M.G., and Björklund,A., A microtransplantation approach for cell suspension grafting in the rat parkinson model: A detailed account of the methods., *Neuroscience*, 63 (1994) 57-72.
302. García de Yebenes,J., Pernaute,R.S., Garrido,J.M., Rábano,A., Albisua,J., Rojo,A., Mena,M.A., Ruiz,P.G., Jorge,P., Correa,C., Lenders,K., Antonini,A., Gunter,I., Psylla,M., and Vontobel,P., Long term intracerebral infusion of fibroblast growth factor restores motility and enhances F-DOPA uptake in parkinsonian monkeys. Parkinsonism uptake in parkinsonian monkeys., *Parkinsonism and Related Disorders*, 4 (1998) 147-158.
303. Finson,B.R., Microglial reactions following CNS-grafting., *Clinical Neuropathology*, 12 (1993) 159-183.

304. Poltorak,M. and Freed,W.J., Immunological reactions induced by intracerebral transplantation: Evidence that host microglia but not astroglial are the antigen-presenting cells., *Experimental Neurology.*, 103 (1989) 222-233.
305. Agrawal,A.K., Chaturvedi,R.K., Shukla,S., Seth,K., Chauhan,S., Ahmad,A., and Seth,P.K., Restorative potential of dopaminergic grafts in presence of antioxidants in rat model of Parkinson's disease., *J Chem Neuroanat.*, 28 (2004) 253-264.
306. Doss,M.X., Koehler,C.I., Gissel,C., Hescheler,J., and Sachinidis,A., Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy., *J Cell Mol Med.*, 8 (2004) 465-473.
307. Silverman,W.F., Solberg,Y., and Pollack,Y., Metabolic profile of fetal dopamine neurons transplanted to the adult rat striatum., *Restorative Neurology and Neuroscience*, 9 (1995) 93-103.
308. Xu,H., Fan,X., Wu,X., Tang,J., and Yang,H., Neural precursor cells differentiated from mouse embryonic stem cells relieve symptomatic motor behavior in a rat model of Parkinson's disease., *Biochem Biophys Res Commun*, 326 (2005) 115-122.
309. Brundin,P., Duan,W.M., and Sauer,H., Functional effects of mesencephalic dopamine neurons and adrenal chromaffin cells grafted to the rodents striatum. In: Dunnett,S.B., Björklund,A. (Eds.), *Functional Neural Transplantation.*, Raven Press., New York, 1994, pp. 9-46.
310. Tajrena,A., Borlongan,C.V., Faull,R.L.M., Williams,Ch.E., Clark,R.G., Gluckman,P.D., and Hughes,P.E., Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntigton's diseases., *Progress in Neurobiology.*, 60 (2000) 409-470.
311. Björklund,A., Dunnett,S.B., and Nikkhah,G., Nigral transplant in the rat Parkinson model. Functional limitations and strategies to enhance nigrostriatal reconstruction. In: Dunnett,S.B., Björklund,A. (Eds.), *Advances in Neuroscience.*, Raven Press, New York, 1994, pp. 47-68.
312. Lindvall,O. and Björklund,A., Cell Therapy in Parkinson's Disease., *Neurorx*, 1 (2004) 382-393.
313. Bartlett,L.E. and Mendez,I., Dopaminergic reinnervation of the globus pallidus by fetal nigral grafts in the rodent model of Parkinson's disease., *Cell Transplantation*, 14 (2005) 119-127.
314. Bartlett,L.E., Sadi,D., Lewington,M., and Mendez,I., Functional improvement with low-dose dopaminergic grafts in hemiparkinsonian rats., *Neurosurgery*, 55 (2005) 405-412.
315. Ramachandran,A.C., Bartlett,L.E., and Mendez,I., A multiple target neural transplantation strategy for Parkinson's disease., *Rev Neurosci*, 13 (2005) 243-256.
316. Phillips,J.M. and Burnss,R.S., The MPTP-treated monkey: An animal model of Parkinson's disease., *Spring*, XXVII (1984) 8-11.
317. Rinvik,E. and Ottersen,O.P., Terminals of subthalamonigral fibers are enriched with glutamate-like immunoreactivity: an electron microscopic, immunogold analysis in the cat., *Neuroanat.*, 6 (1993) 19-30.
318. Zahr,N.M., Martin,L.P., and Waszczak,B.L., Subthalamic nucleus lesions alter basal and dopamine agonist stimulated electrophysiological output from the rat basal ganglia., *Synapse*, 54 (2004) 119-128.
319. Ni,Z., Gao,D., Bouali-Benazzouz,R., Benabid,A.L., and Benazzouz,A., Effect of microiontophoretic application of dopamine on subthalamic nucleus neuronal activity in normal rats and in rats with unilateral lesion of the nigrostriatal pathway., *Eur. J. of Neurosci.*, 14 (2001) 373-381.

320. Brown,L.L. and Wolfson,L.I., Apomorphine increase glucose utilization of the substantia nigra, subthalamic nucleus and corpus striatum., *Brain Research*, 140 (1978) 188-193.
321. Hurd,Y.L., Suzuki,M., and Sedvall,G.C., D1 and D2 dopamine receptor mRNA expression in whole hemisphere sections of the human brain., *J Chem Neuroanat.*, 22 (2001) 127-137.
322. Walters,J.R., Ruskin,D.N., Allers,K.A., and Bergstrom,D.A., Pre-and postsynaptic aspects of dopamine-mediated transmission., *Trends in Neurosciences.*, 23 (2000) S41-S47.
323. Zetterstrom,T., Brundin,P., Gage,F.H., Sharp,T., Isacson,O., Dunnett,S.B., Ungerstedt,U., and Björklund,A., In vivo measurement of spontaneous release and metabolism of dopamine from intrastriatal nigral grafts using intracerebral dialysis., *Brain Res.*, 362 (1986) 344-349.
324. Strecker,R., Sharp,T., Brundin,P., Zetterstrom,T., and Ungerstedt,U., Autoregulation of dopamine release and metabolism by intrastriatal grafts as revealed by intracerebral dialysis., *Neuroscience.*, 22 (1987) 169-178.
325. Abrous,D.N., Torres,E.M., and Dunnett,S.B., Dopaminergic grafts implanted into the neonatal or adult striatum: comparative effects on rotation and paw reaching deficits induced by subsequent unilateral nigrostriatal lesions in adulthood., *Neuroscience.*, 54 (1993) 657-668.
326. Olsson,M., Nikkhah,G., Bentlage,C., and Björklund,A., Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: Differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. In: Nikkhah,G. (Ed.), *Microtransplantation of Nigral Dopamine Neurons in a Rat Model of Parkinson's Disease.*, Grahns Boktryckeri, Lund, Sweden, 1994, pp. 129-150.
327. Abrous,D.N., Shaltot,A., Torres,E.M., and Dunnett,S.B., Dopamine-rich grafts in the neostriatum and/or nucleus accumbens: Effects on drugs -induced behavioral and skilled paw-reaching., *Neuroscience.*, 53 (1993) 187-197.
328. Nitsch,C. and Riesenberger,R., Synaptic reorganization in the rat striatum after dopaminergic deafferentation: an ultrastructural study using glutamate decarboxylase immunocytochemistry., *Synapse.*, 19 (1995) 247-263.
329. Calabresi,P., Pisani,A., Mercuri,N.B., and Bernardi,G., The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to basal ganglia disorders., *Trends Neurosci.*, 19 (1996) 19-24.
330. Nishio,T., Furukawa,S., Akiguchi,I., and Sunohara,N., Medial nigral dopamine neurons have rich neurotrophin support in humans., *Neuro Report.*, 9 (1998) 2847.
331. Mogi,M., Togari,A., Ogawa,M., Ikeguchi,K., Shizuma,N., Fan,D., Nakano,I., and Nagatsu,T., 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., *Neuroscience Letter*, 250 (1998) 25.

AUTOBIBLIOGRAFÍA

Artículos donde se han divulgado los resultados de esta tesis

1. Lorigados L, Alvarez P, **Pavon N**, Serrano T, Blanco L, Macias R. NGF in experimental models of Parkinson disease. *Mol Chem Neuropathol*. 1996 May-Aug;28(1-3):225-8.
2. **Pavon N**, Vidal L, Alvarez P, Blanco L, Torres A, Rodriguez A, Macias R. Behavioral evaluation of the unilateral lesion model in rats using 6-hydroxydopamine. Correlation between the rotations induced by D-amphetamine, apomorphine and the manual dexterity test. *Rev Neurol*. 1998 Jun;26(154):915-8.
3. Blanco, Lisette; Alvarez, Pío; **Pavón, Nancy**; Díaz, Carmen; Castellano, Orlando; Castillo, Lázara; Macías, Raúl; Cruz, Reyniel; González, Arien; Díaz, Luis. Microtrasplante de células mesencefálicas fetales en striatum de ratas hemiparkinsonianas: introducción de la técnica. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* 30(1):62-9, 1999.
4. **Pavon-Fuentes N**, Macias-Gonzalez R, Blanco-Lezcano L, Alvarez-Gonzalez L, Martinez-Marti L, Castillo-Diaz L, De La Cuetara Bernal K, Diaz C, Lorigados-Pedre L, Coro Y, Garcia-Varona AY, Rosillo JC, Diaz E. Efectos del trasplante simultáneo de células mesencefálicas fetales en el estriado y el núcleo subtalámico de ratas hemiparkinsonianas. *Rev Neurol*. 2002 May 16-31;34(10):917-23.
5. Lorigados Pedre L, **Pavon Fuentes N**, Alvarez Gonzalez L, McRae A, Serrano Sanchez T, Blanco Lescano L, Macias Gonzalez R. Nerve growth factor levels in Parkinson disease and experimental parkinsonian rats. *Brain Res*. 2002 Oct 11;952(1):122-7.
6. Centonze D, Grande C, Saulle E, Martin AB, Gubellini P, **Pavon N**, Pisani A, Bernardi G, Moratalla R, Calabresi P. Distinct roles of D1 and D5 dopamine receptors in motor activity and striatal synaptic plasticity. *J Neurosci*. 2003 Sep 17;23(24):8506-12
7. **Nancy Pavón**, Ana B. Martín, Ainhoa Mendiadua, and Rosario Moratalla ERK Phosphorylation and FosB Expression Are Associated with L-DOPA-Induced Dyskinesia in Hemiparkinsonian Mice *PSYCHIATRY* 2006 Jan 1;59(1):64-74. Epub 2005 Sep 1. Aceptado

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 Transplantation and Plasticity* 3 (4), 1992.
2. H. Molina, R. Quiñones, L. Alvarez, I. Ortega, J.L. Muñoz, C. González, K. De la Cuétara, O. Torres, C. Suarez, M. León, M.J. Rojas, M. Rachid, R. Macías, J.C. García, **N. Pavón**, I. Lorigados, O. Castellano and O. Hernández. Stereotactic Transplantation of Foetal Ventral Mesencephalic Cells: Cuban Experience from Five patients with Idiopathic Parkinson's Disease *Journal of Neuraltransplantation & Plasticity* 3, 4 (338-339).
3. JC García, L. Lorigados, **N. Pavón**, L. Alvarez, TL. Perry. Functional study of blood brain barrier in neurotransplanted patients. *Neural Transplantation and Plasticity* 3 (4), 1992
4. R. Macías, **N. Pavón**, L. Vidal, L. Blanco, P. Álvarez, A. Torres. Interacción entre los neurotransmisores en los Ganglios Basales. Implicaciones en la enfermedad de Parkinson. Premio Anual de la Salud 1995.
5. L. Blanco, P. Alvarez, **N. Pavón**, O. Castellanos, K. de la Cuétara, R. Macías, V. Sanz. Efecto de la Apomorfina sobre monos hemiparquinsonianos evaluados por escala clínica. Estudio de las discinesias. *Revista de Neurología Argentina* 20: 1995, (80-86).

6. Lorigados L, Molina H, Serrano T, **Pavón N**, Robinson MA, Alvarez L, Soderstrom S, Ebendal T. Evolutive levels of NGF in neurodegenerative disorders. *Mol Chem Neuropathol*. 1995 Feb-Apr;24(2-3):231-4
7. L. Lorigados, P. Alvarez, **N. Pavón**, T. Serrano, L. Blanco, R. Macías. NGF in Experimental Models of Parkinson's disease. *Molecular and Chemical Neuropathology* Vol. 28, 1996
8. **N. Pavón**, L. Vidal, L. Blanco, P. Alvarez, A. Torres, L. Alvarez, R. Macías. Mecanismos de muerte neuronal y enfermedades neurodegenerativas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 29, No. 2: 97-107, 1998.
9. **Pavón N**, Vidal L, Blanco L, Alvarez-Fonseca P, Torres-Montoya A, Lorigados L, Alvarez-Gonzalez L, Macias R. Factors that lead to death of neurons in neurodegenerative diseases. *Rev Neurol*. 1998 Apr;26(152):554-60.
10. L. Blanco, P. Alvarez, **N. Pavón**, O. Castellano, L. Castillo, C. Díaz, J. Pereira, R. Macías, R. Cruz, A. González, L. Díaz, R. Tadeo. Trasplante de células dopaminérgicas mesencefálicas fetales en striatum y substantia nigra pars reticulata simultáneamente. Evaluación conductual y morfológica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 29, No. 2: 109-114, 1998.
11. L. Lorigados, **N. Pavón**, T. Serrano, M.A. Robinson. Factor de crecimiento nervioso y enfermedades neurológicas. *Rev. Neurol* 1998;26(153):744-748.
12. Alvarez-Fonseca P, Blanco L, **Pavón N**, Vidal L, Castellano O, Castillo L, Garcia A, Rosillo JC, Macias R. Simultaneous transplantation of fetal mesencephalic cells to the striatum and globus pallidus of rats with lesions induced by 6-hydroxydopamine. *Rev Neurol*. 1998 Apr;26(152):537-40.
13. Castellanos MR, Moya G, Cruz R, Lorigados L, Fernandez CI, Diaz C, de la Cuetara K, Bergado J, Francis L, **Pavón N**, Gonzalez E, Ramos R. Obtention and characterization of murine beta-NGF. Application in a model of cerebral aging. *Rev Neurol*. 1998 May;26(153):717-22.
14. Blanco L, **Pavón N**, Alvarez P, Diaz C, Castellano O, Castillo L, de la Cuetara K, Macias R. Transplantation of fetal dopaminergic cells simultaneously to the corpus striatum and pars reticularis of the substantia nigra in hemi-parkinsonian rats. *Rev Neurol*. 1998 Mar;26(151):361-5.
15. **Pavón, Nancy**; Lorigados, Lourdes; Muñoz, Jorge; Blanco, Lissette; Alvarez, Lázaro; Molina, Hilda; Alvarez, Pío; Vidal, Lidice; Torres, Abel; Macías, Raúl. Immunological study in Parkinson's disease patients with intracerebral allografts. In *Brain function, behaviour, drugs and disease: neurosciences in the Caribbean, progress and promise*, eds. SR Wray, N Hernández, O Parshad. Kingston, Medical and Scientific Development Trust, 2000. pp.185-90
16. Blanco Lezcano, Lissette; Alvarez Fonseca, Pío; **Pavón Fuentes, Nancy**; Macías González, Raúl; Vidal Aguero, Lidice; Moreno Granados, Heriberto; Sanz Fajardo, Víctor; Díaz Bouza, Erick. Change in the pattern of spontaneous motor activity in non-human primates under the influence of MPTP. In *Brain function, behaviour, drugs and disease: neurosciences in the Caribbean, progress and promise*, eds. SR Wray, N Hernández, O Parshad. Kingston, Medical and Scientific Development Trust, 2000. pp.185-90
17. Blanco L, **Pavón N**, Macias R, Castillo L, Diaz C, Garcia A, Alvarez P. Simultaneous micro-transplantation of fetal mesencephalic cells to the striate and substantia nigra pars reticulata in hemi-parkinsonian rats. A study of behavior. *Rev Neurol*. 2000 Jun 16-30;30(12):1122-7.
18. Álvarez, L; Macías, R; Guridi, J; López, G; Álvarez, E; Maragoto, C; Teijeiro, J; Torres, A; **Pavón, N**; Rodríguez Oroz, MC; Ochoa, L; Hetherington, H; Juncos, J; DeLong, MR; Obeso, JA. Dorsal subthalamotomy for Parkinson's disease. *Mov Disord* 16(1):72-8, 2001

19. Álvarez González, Eduardo; Álvarez González, Lázaro; Macías González, Raúl; **Pavón Fuentes, Nancy**. Conceptos actuales sobre la función de los ganglios basales y el papel del núcleo subtalámico (NST) en trastornos del movimiento. *Revista Mexicana de Neurociencia* 2(2):77-85, 2001.
20. Rodríguez Oroz MCR, Zamarbide I, **Pavón N**, Grandas F y Obeso JA. Presentación clínica y fisiopatología de las complicaciones motoras de la Enfermedad de Parkinson. *Neurología* 17 (Supl 1): 10 -20, 2002.
21. Alvarez L, Macias R, Guridi J, Lopez G, Alvarez E, Maragoto C, Teijeiro J, Torres A, **Pavón N**, Rodríguez-Oroz MC, Ochoa L, Hetherington H, Juncos J, DeLong MR, Obeso JA. Dorsal subthalamotomy for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2002 May;17(3):625-7; author reply 627.
22. Obeso JA, Brugera JA, Castro A, Chacón J, Jiménez Roldan S, Grandas F, Olga J, Kulisevski J, Lopez Lozano JJ, Macías R, Marin C, **Pavón N**, Rodríguez Díaz M, Rodríguez Oroz MC, Valldeoriola F. Consenso sobre la utilización de Entacapona en la Enfermedad de Parkinson. *Neurología* 17 (Supl 1): 77 -79, 2002.
23. Martín AB, Grandas C, **Pavón N**, Ortiz O, Chen JF, Moratalla R. Implicaciones de los receptores de adenosina A2a en la sensibilización conductual inducida por levodopa en animales parkinsonianos. *Neurología*, Vol. 18: 10-20, abril 2003.
24. Yusta-Boyo MJ, Gonzalez MA, **Pavón N**, Martin AB, De La Fuente R, Garcia-Castro J, De Pablo F, Moratalla R, Bernad A, Vicario-Abejon C. Absence of hematopoiesis from transplanted olfactory bulb neural stem cells. *Eur J Neurosci.* 2004 Feb;19(3):505-12.
25. Garcia R, Aguiar J, Alberti E, de la Cuetara K, **Pavón N**. Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Apr 9;316(3):753-4.
26. **Pavón-Fuentes N**, Blanco-Lezcano L, Martínez-Martin L, Castillo-Diaz L, de la Cuetara-Bernal K, García-Miniet R, Lorigados-Pedre L, Coro-Grave de Peralta Y, García-Varona AY, Rosillo-Martí JC, Macías-Gonzalez R. Trasplante de células estromales en el modelo de lesión por 6-OHDA. *Rev Neurol.* 2004 Aug 16-31;39(4):326-34.
27. Blanco-Lezcano L, Rocha-Arrieta LL, Martínez-Martí L, Álvarez-González L, **Pavón-Fuentes N**, Macías-Gonzalez R, Serrano-Sánchez T, Rosillo-Martí JC, Coro-Grave de Peralta Y, Bauza-Calderín Y, Briones M. Lesions in the pars compacta substantiae nigra and the subthalamic nucleus modify the density of muscarinic receptors in different nuclei of the basal ganglia. *Rev Neurol.* 2004 Jan 16-31;38(2):128-32.
28. L. Alvarez, R. Macias, G. Lopez, E. Alvarez, **N. Pavón**, M. C. Rodriguez-Oroz, J. L. Juncos, C. Maragoto, J. Guridi, I. Litvan, E. S. Tolosa, W. Koller, J. Vitek, M. R. DeLong and J. A. Obeso. Bilateral subthalamotomy in Parkinson's disease: initial and long-term response. *Brain* 128:570-583, 2005.
29. L. Blanco-Lezcano, L.L. Rocha-Arrieta, L. Álvarez-González, L. Martínez-Martí, **N. Pavón-Fuentes**, M.E. González-Fraguela, Y. Bauzá-Calderín, Y. Coro-Grave de Peralta. Efecto de la lesión de la sustancia negra *pars compacta* sobre la liberación de glutamato y GABA en el núcleo pedunculopontino *REV NEUROL* 2005; 40 (1): 23-29.

Eventos científicos donde han sido presentados los resultados de este trabajo

1. Transplantation of human fetal mesencephalic tissue in caudate nucleus as treatment for PD: Long-term follow up. IVth International Symposium on Neural Transplantation. USA 1992
2. Immunological study in Parkinson's disease. IInd International Congress Society Neuroimmunomodulation. Italia 1993

3. Bilateral intracerebral fetal neural allografts. The Round Table on the Development of Neurosciences in the Caribbean. Cuba 1993
4. Fisiopatología de la Enfermedad de Parkinson en modelos experimentales. First Regional Meeting CARIBRO. Cuba 1994.
5. Comparative study of response in Parkinson's disease with unilateral and bilateral fetal neural allografts. 5th International Symposium on Neural Transplantation. Francia 1994.
6. NGF in experimental models of Parkinson disease. Neurodegenerative disorders. Common Mol. Mechanisms. 1994, Jamaica.
7. Endogenous levels of NGF in hemi-parkinsonian rats and MPTP-treated monkeys. 5th International Symposium Neural Transplantation. 1994, Francia.
8. Nerve growth factor and neural transplant. 5th International Symposium Neural Transplantation. 1994, Francia.
9. Immunological study in Parkinson's disease patients with intracerebral allografts. 2nd Regional Meeting CARIBRO. Jamaica 1995
10. Immunological aspects of grafting in the central nervous system: The cuban experience. 2nd Regional Meeting CARIBRO. Jamaica 1995,
11. Estudio de los niveles séricos de factor de crecimiento nervioso. Aplicación en enfermedades neurológicas. Premio Anual de la Salud
12. DA cells transplantation into striatum and Substantia nigra pars reticulata in 6-OHDA rats. Fifth International Congress of Parkinson's disease and Movement Disorders USA Oct. 1998.
13. Could basal ganglia other than striatum be useful targets for mesencephalic graft?. 4th Congress of the European Federation of Neurological Societies Portugal. 1999 Cuban Experience.
14. Algunas consideraciones metodológicas en el trabajo morfométrico con nervios periféricos y núcleos grises en el sistema nervioso. IV Taller Nacional sobre Morfometría y sus aplicaciones en las Ciencias Biomédicas y Biológicas. 1999, Cuba
15. Estudio morfofuncional del neurotrasplante en el núcleo estriado y en el núcleo subtalámico de ratas hemiparkinsonianas. IV Taller Nacional sobre Morfometría y sus aplicaciones en las Ciencias Biomédicas y Biológicas. 1999, Cuba
16. Efectos del trasplante de células mesencefálicas fetales en el NST de ratas hemiparkinsonianas. XIII FORUM de Ciencia y Técnica CIREN. Cuba. Oct./ 1999.
17. Metabolismo de la DA en el St. Y la SN de ratas hemiparkinsonianas con trasplante dopaminérgico. XIII FORUM de Ciencia y Técnica CIREN. Cuba. Oct./ 1999.
18. Posible papel neuroprotector de la lesión del NST en la enfermedad de Parkinson. I Jornada Científica del CIREN. Cuba. Dic/1999.
19. Evaluación del NST como posible blanco del trasplante de células DA fetales para el tratamiento del hemiparkinsonismo en ratas. I Jornada Científica del CIREN. Cuba. Dic/1999.
20. Trasplante de células dopaminérgicas en el striatum y SNpr de ratas. Restauración Neurológica'99, Cuba. 1999
21. Serum NGF levels in micrografted hemiparkinsonian rats. Restauración Neurológica'99, Cuba. 1999
22. Dopamine metabolism in the striatum and substantia nigra of hemiparkinsonian model rats with dopaminergic grafts. Restauración Neurológica'99, Cuba. 1999

23. Aplicación de células neurales en neurociencias. Restauración Neurológica'99, Cuba. 1999
24. Changes in NGF levels in hemiparkinsonian rats with dopaminergic grafts. Neurodegenerative disorders: Common Molecular Mechanisms. 2000, Trinidad y Tobago.
25. Evaluación del núcleo subtalámico como posible blanco del trasplante de células dopaminérgicas fetales para el tratamiento del hemiparkinsonismo en ratas. II Jornada Científica del CIREN. Cuba. Enero/2001
26. Lesión neurotóxica con 6-OHDA del NST. II Jornada Científica del CIREN. Cuba. Enero/2001
27. Estudio morfofuncional del neurotrasplante en el estriado y en el NST. II Jornada Científica del CIREN. Cuba. Enero/2001
28. Microtransplantation of fetal nigral cell suspensions. Regeneration, plasticity and neural repair. Cuba 20-23 marzo/ 2001
29. A comparative morphological study of dopaminergic grafts into different basal ganglia. Regeneration, plasticity and neural repair. Cuba 20-23 marzo/ 2001
30. Trasplante de células dopaminérgicas en diferentes núcleos de los GB en ratas hemiparkinsonianas. XIV Forum de Ciencia y Técnica del CIREN. Cuba 6/8_2001
31. Estudio comparativo morfológico-morfométrico del microtrasplante de células mesencefálicas fetales en NST y SNr. Resultados preliminares. Jornada Interna del CIREN, 2001
32. Origen y Fisiopatología de la Enfermedad de Parkinson: Perspectivas Terapéuticas. Cordoba.
33. Seminario Instituto Cajal. España, 2003
34. Roles of D1 and D2 receptor subtypes in levodopa-induced dyskinesias in a mouse model of Parkinson's Disease. II Scientific Conference Internacional Restauración Neurológica; Cuba; 2004
35. Células estromales como alternativa terapéutica para la enfermedad de parkinson. Congreso Soc. Inmunología, Sta Clara, 2004
36. Trasplante de células estromales en el modelo de lesión por 6-OHDA. Forum de Ciencia y Técnica, CIREN 2004
37. Trasplante de células mesencefálicas fetales frescas e hibernadas en modelos experimentales de Parkinson. Forum de Ciencia y Técnica, CIREN 2004.
38. Changes in NGF levels in hemiparkinsonian rats with dopaminergic grafts. Neurodegenerative disorders: Common Molecular Mechanisms. Trinidad y Tobago.
39. Trasplante de células estromales en el modelo de lesión por 6-OHDA. Jornada Interna CIREN, 2005

AGRADECIMIENTOS

Como todos los lectores de esta tesis saben, el camino que se recorre hasta llegar a este punto es largo y en mi caso estuvo lleno de temores e incertidumbres. Sin embargo no lo caminé sola, a lo largo de él estuve acompañada de muchísimas personas que me apoyaron y me animaron. Algunas estuvieron conmigo durante mi formación y otras durante mi vida como profesional, pero a todas sin excepción, deseo agradecerles de todo corazón pues sin ellas este trabajo no podría ser hoy una realidad. No obstante, el espacio limitado con que cuento me obliga a resumir los agradecimientos a personas muy relacionadas con el trabajo, aunque eso no implica ignorar al resto, que jugaron un papel muy importante en mi formación.

Ante todo deseo agradecer a mi colectivo de trabajo del área básica del CIREN por haber podido contar con ellos siempre, especialmente deseo agradecer a: Lisis por su ayuda con los estudios inmunohistoquímicos; a Lazarita, Karelys, Alain por su ayuda con el trabajo de células; a Carmita y Reynier por su ayuda con los aspectos bioquímicos, su apoyo continuo y su ánimo a continuar; a Magalis por su ayuda en el salón de cirugía experimental; a Araceli, Guillermo, Manuel y Erick por la atención y cuidados a los animales; a Ismael, Jesús y Guillermo por la confección de la caja de evaluación de las habilidades motoras; a Teresa, María de los Ángeles, María Elena y Yosvani por ser parte de mi pequeño mundo departamental, a Marlene, Karina y Kike por su inmenso cariño, por haber podido contar siempre con su mano amiga; a Yosvani Coro, por su colaboración en el manejo de los animales y su la evaluación conductual, a Rocío por su fe en mi capacidad.

a Fernando por llenar de detalles bellos mis días en el CIREN

a Margarita por su apoyo, su valiosa guía para adentrarme en la fisiología, por la minuciosa revisión que le hizo al documento de tesis; a Lily por su apoyo continuo y sus válidas recomendaciones.

a Mawy por su cariño, su gran profesionalidad y eficiencia que me permitieron contar con una rapidez increíble de cuanto material bibliográfico necesité.

a la profesora Martha Pérez y al Dr. Carlos Santos por haberme dado la oportunidad de tenerlos como oponentes en la pre-defensa, por la exhaustiva revisión que hicieron del documento de tesis y sus excelentes recomendaciones. A los profesores del departamento de Fisiología del ICBP “Victoria de Girón” por su acertada crítica del documento y sus excelentes recomendaciones.

a Emilia y Anita por su preocupación y su invaluable ayuda en los estudios con ratones.

a Lisette por haberme acompañado durante todos estos años y ser cómplice de las muchas horas dedicadas a aprender sobre los ganglios basales, de las incertidumbres sobre cuál era el camino a tomar?, sobre cuál debía ser el siguiente paso?

a Lázaro por su amistad y apoyo

a Maylen por haber estado a mi lado siempre, en las buenas y en las malas, por haber postergado todo con tal de darme una ayuda; a Rafael por comprender y querer a Maylen; a Johanka y Abel por ser unos amigos fieles.

a Lourdes por su persistencia, por haberme animado, por estar siempre dispuesta a ayudarme, por sus valiosas sugerencias, por permitirme, como ya una vez le dije al terminar la especialidad, compartir una larga amistad.

a William por no haberme dejado esconder tras mis miedos y haberme impulsado todo el tiempo a salir adelante, por haber leído hasta la saciedad una y otra vez el documento, por ayudarme a corregirlo, por preocuparte de miles de detalles, en fin por ser como eres.

a la Dra C Rosario Moratalla por la confianza que depositó en mi al confiarme el montaje del modelo y el trabajo con ratones mutantes. Por haber asesorado una parte muy importante de este trabajo. Por su cariño y apoyo, por haberme acogido dentro de su familia cuando estaba tan lejos de la mía.

Al Dr. José A. Obeso por sus infinitas muestras de amistad, por todas las enseñanzas y conocimientos que me ha transmitido, por su aguda crítica a lo largo de todo el trabajo, por haberme dado la oportunidad de conocer a la Dra. Mary Cruz Rodríguez quien constituye para mí una luz a seguir, una excelente profesional, con una sensibilidad especial y a quien agradezco enormemente la profunda revisión que hizo del documento, su contribución en el análisis de los resultados y su permanente confianza y estímulo.

a Raúl Macías, por los veintidós años de convivencias, por los dieciséis años en que hemos trabajado juntos, por su ejemplo como profesional, por sus enseñanzas, por haber apoyado y promovido las investigaciones en nuestro centro, por su ayuda incondicional y sus valiosas sugerencias. Le pido disculpas además, por todos los sin-sabores de estos tiempos.

Finalmente quiero agradecer al Dr C Jorge Bergado su inigualable paciencia y su infinita confianza al aceptar ser tutor de esta tesis. Además, le agradezco la oportunidad que me dio de trabajar junto a él, su exquisita guía, su inestimable apoyo en todo momento, los conocimientos que me ha transmitido, todo lo cual tengo en muy alta estima.

En fin, **MUCHAS GRACIAS A TODOS.**