

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

**TÍTULO: CAMBIOS NEUROQUÍMICOS EN EL NÚCLEO PEDUNCULOPONTINO DE
RATAS HEMIPARKINSONIZADAS Y EFECTO DE DIFERENTES TRATAMIENTOS.**

AUTOR: Lic. Lisette Blanco Lezcano, MsC.

TUTOR: Lic. Lourdes del Carmen Lorigados Pedre, DrC.

**CENTRO INTERNACIONAL DE RESTAURACIÓN
NEUROLÓGICA**

2007

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

**TÍTULO: CAMBIOS NEUROQUÍMICOS EN EL NÚCLEO PEDUNCULOPONTINO DE
RATAS HEMIPARKINSONIZADAS Y EFECTO DE DIFERENTES TRATAMIENTOS.**

AUTOR: Lic. Lisette Blanco Lezcano, MsC.

TUTOR: Lic. Lourdes del Carmen Lorigados, Pedre Dr.C

**CENTRO INTERNACIONAL DE RESTAURACIÓN
NEUROLÓGICA**

2007

Agradecimientos

1. A Lourdes Lorigados: por haber aceptado el reto de ser tutora de este trabajo apenas 24 horas después de haber defendido exitosamente su grado científico, por haberlo protegido y defendido desde sus inicios, por haberle puesto sus manos, su corazón y sus neuronas. Por haberle dedicado numerosas horas de su tiempo a la revisión de cada uno de los documentos emanados de este trabajo, por haberlo enriquecido con sus críticas y sus sugerencias, por su respeto, por su cariño, por su amistad.
2. A Lázaro Álvarez: padre biológico de este trabajo, por haberme motivado sobre la necesidad de estudiar el NPP asociado a la fisiopatología de la EP, por haber asesorado cada etapa del diseño experimental, por haberle aportado sus profundos conocimientos sobre el tema, por su talento, por su humanismo, por su amistad.
3. A Raúl Macías: por haberme permitido el privilegio de trabajar bajo su dirección, por haber allanado el camino de múltiples colaboraciones y posibilidades de superación, por haberme instruido en la necesidad de asimilar la tecnología para la construcción de cánulas de microdiálisis cerebral, haber confiado en esas cánulas y haber apoyado la adquisición de sus materiales una y otra vez, por su comportamiento ético y decoroso, por su doble condición de jefe y amigo.
4. A Teresa Serrano y Ma. Elena González: entrañables amigas con las que he compartido los sabores y sin sabores de estos años de trabajo de doctorado, por sus consejos siempre pertinentes, por el apoyo, por la confianza, por la incondicionalidad.
5. A Nancy Pavón: porque juntas hemos sido un sólido bloque de trabajo, estudio y obtención de resultados. Por su ejemplo y su disciplina que son siempre estímulos para seguir adelante. Por su amistad.
6. A mis cros del departamento de neurofisiología experimental: a Ivette Fernández por haberme instruido en múltiples oportunidades en la aplicación de una u otra prueba conductual, en el manejo de sus datos, en la interpretación adecuada de sus resultados. A William, por las sugerencias siempre sabias y oportunas que recibí de él, desde que este trabajo era apenas un protocolo de investigación. A Magaly por su apoyo en las innumerables horas de cirugía experimental que han permitido desarrollar este trabajo. A Guillermo por su apoyo en el trabajo con las ratas, a Yosvany por su dedicación en el modelo de 6-OHDA, su encomiable trabajo técnico al frente de las lesiones y la evaluación conductual. A Jorge por su apoyo y su ejemplo al frente del departamento.
7. A Lisys Martínez: por haber puesto a mi disposición su experticidad en el campo de las ciencias morfológicas y las técnicas inmunohistoquímicas.
8. A Rocío García: por haberme apoyado con la realización del estudio de expresión de FNT. Por haber puesto sus valiosos conocimientos en las técnicas de biología molecular, siempre a mi disposición.
9. A Margarita Báez: por haberme enseñado la otra cara de la fisiología, la de la enseñanza de esta compleja disciplina que constituye uno de los pilares de las ciencias biomédicas.
10. A Yosvany Bauzá: por su acertado trabajo técnico en el sistema de cromatografía y detección así como su apreciada ayuda en la disección de los tejidos.
11. A los cros del vivario del CIREN, Araceli Vallejo, Juan Manuel Parejo y Maykel, por su trabajo destacado en el mantenimiento de nuestros animales de experimentación.
12. A la Dra. Luisa Rocha del CINVESTAV de México, por haberme orientado en la asimilación tecnológica de la construcción de cánulas de microdiálisis cerebral, por haberme enseñado y entrenado en el uso y manejo de esta novedosa técnica, por haber apoyado materialmente este trabajo con sus propios recursos en distintas ocasiones, por su apoyo personal y su constante estímulo.
13. A la Dra. Sandra Orozco por facilitar la realización de los estudios de muerte celular.
14. A las Dras. Sophie Sarre e Yvette Michotte de la facultad de farmacia de la Vrije Universiteit of Brussels, Bélgica, por haberme imbuido de la importancia de los tratamientos farmacológicos y los experimentos en este campo, por haberme motivado a abordar el estudio del efecto neuroprotector de la (-) nicotina en la EP, por haberme permitido insertarme en la ruta crítica de trabajo en un laboratorio de primer nivel a escala mundial, lo que sin dudas constituyó una experiencia de incalculable valor para mi formación profesional. Por haber apoyado materialmente este trabajo con reactivos, cánulas y literatura. Por su confianza y su apoyo.

15. A Mawy y a Lisette: por haberme apoyado siempre con la bibliografía, por custodiar celosamente la más rica biblioteca neurocientífica que tengamos en el país.
16. A mis amigos Rafael Tadeo y Dannele Echemendía: por haber localizado y enviado para mí con gran celeridad, más de la mitad de los artículos que pude estudiar en estos años de trabajo de doctorado, por todo el calor y la solidaridad moral y material que recibí de ellos, en la fría y húmeda ciudad de Bruselas.
17. A Milena García: por haber construido un puente bibliográfico entre Sao Paulo y la Habana a través del cual me llegaban casi inmediatamente todos los papers que necesité. Por su cariño y su amistad.
18. A Marlene y a Quiqui por su apoyo sostenido durante estos años. A Karina, por su amistad.
19. A Lily Morales, por su apoyo tácito. Por tener el don de la palabra adecuada siempre en el momento adecuado.
20. Al Dr. Julián Álvarez: por su apoyo y su confianza.
21. A mis profesores de la Facultad de Biología de la UH por haber recibido siempre de ellos lo mejor durante mis años de estudiante, especialmente a Antonio Sigarroa por sus múltiples asesorías estadísticas en estos últimos años, a Miguel Angel Alfonso, por haberme ayudado a definir mi vocación por la investigación, por su amistad y su apoyo de tantos años, a Martha Pérez, Vicente Berovides y Frank Coro quienes dejaron una huella muy importante en mi formación académica.
22. A mis amigas Julia de la Rosa e Ivette Gómez: por compartir anhelos y aspiraciones comunes desde la adolescencia, por la seguridad de saber que siempre están al alcance de mi mano.
23. A Iván Rubio: por su apreciada ayuda para resolver cada uno de mis desafueros informáticos domésticos.
24. Quisiera expresar públicamente mi agradecimiento y respeto a las personas que revisaron el documento de tesis o su resumen en alguna de sus versiones, desde la primera de ellas, hasta la versión más pulida que ha llegado hoy día a este tribunal. Todos fueron exquisitamente respetuosos, agudos en sus observaciones y optimistas en sus enfoques. Los menciono a continuación, en el orden en que cada uno de ellos revisó el trabajo: Lourdes Lorigados, William Almaguer, Ma. Elena González, Lázaro Alvarez, Rita Raisman, Sophie Sarre, Teresa Serrano, Liliana Francis, Miguel Angel Alfonso, Mario Herrera Marschitz, Nancy Pavón, Lourdes Lorigados y Margarita Báez.
25. A mi familia querida que vivió junto a mí estos años de estudio y trabajo intensos. A mi abuela y a Mamina pues a sus desvelos y cariño están ligados mis más gratos recuerdos de la infancia.
26. A mi mamá por haber hecho suyos todo el esfuerzo de estos años, haber sacrificado intereses personales y familiares en post de la obtención de este grado científico que defendemos hoy las dos, por haberme enseñado el rigor y la disciplina necesarias para la investigación científica, por su incondicionalidad y su cariño.
27. A mi esposo por haber echado su suerte junto a mi suerte el primer día que nos conocimos, sin ponderar riesgos o beneficios, sin exigir nada a cambio, sin mirar atrás, por haber tolerado pacientemente las horas robadas al descanso y a la familia para llegar exitosamente al día de hoy, por su ternura, por su amor.
28. A mis dos entrañables hermanas Alina y Vivian. Alina por ser fuerza, poder y energía, por su presencia perenne entre nosotros, a pesar de la distancia. A Vivita por haberme permitido crecer a su sombra, intentando siempre parecérmele, por su apoyo, por su estímulo.
29. A Gabriel y a Julio que llegaron a la familia para quedarse. Por el apoyo de estos años.
30. A la memoria imperecedera de mi papa el Prof. Dr. José Blanco Prieto, porque él hubiera sido sin dudas el más crítico oponente de esta tesis y a la vez el más ferviente impulsor de estos años de trabajo de doctorado, a los valores que nos inculcó, a su vocación por la enseñanza, a su confianza en la nueva generación, a su irreducible capacidad de trabajo, a su infinito amor.

ABREVIATURAS

6-OHDA	6-Hidroxidopamina
ACo	Acetilcolina
ANOVA	Análisis de Varianza
AP	Anteroposterior
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATV	Área Tegmental Ventral
BDZ	Receptor gabaérgico benzodiazepínico
DA	Dopamina
DO	Densitometría Óptica
DV	Dorsoventral
EP	Enfermedad de Parkinson
FNT	Factores Neurotróficos
FNDC	Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro
FNDG	Factor Neurotrófico Derivado de la Glía
GABA	Del inglés γ -Amino butyric acid. Acido γ -Aminobutírico
GB	Ganglios Basales
Glu	Ácido glutámico
GPI	Del latín <i>Globus pallidum lateral</i>
GPM	Del latín <i>Globus pallidum medial</i>
HPLC	Del inglés High Performance Liquid Chromatography. Cromatografía Líquida de Alta Resolución
IP	Ioduro de propidio
i.p	Intraperitoneal
LCRa	Líquido cefalorraquídeo artificial
L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina
MAO-A, B	Monoamino oxidasa A y B
ML	Medio Lateral
MPTP	1 metil 4 fenil 1,2,3,6 tetrahidropiridina
MPDP ⁺	1-metil-4-fenil-1,2,3-dihidropiridina
MPP ⁺	1-metil-4-fenil-1,2,3-piridina
NEP	Núcleo Entopeduncular
NMDA	Receptor glutamatérgico N metil D aspartato
NPP	Núcleo Pedunculopontino
NST	Núcleo Subtalámico
OE	Objetivo Específico
PNH	Primates no humanos
Pte	Puente
mGluR	Del inglés Receptores glutamatérgicos metabotrópicos
RLM	Región Locomotora Mesencefálica
SBF	Solución Buffer Fosfato
SSF	Solución Salina Fisiológica
s.c	Subcutánea
SNK	Student-Newman-Keuls
SN	Del latín <i>Substantia nigra</i>
SNc	Del latín <i>Substantia nigra pars compacta</i>
SNr	Del latín <i>Substantia nigra pars reticulata</i>
St	Del latín <i>Striatum</i>
TA	Temperatura Ambiente
TH	Tirosina Hidroxilasa

ÍNDICE	
Síntesis	8
Introducción	9
Revisión Bibliográfica	
I. Organización estructural y funcional de los ganglios basales	14
II. Enfermedad de Parkinson	16
III. Neuroprotección en la enfermedad de Parkinson experimental	23
IV. Núcleo Pedunculopontino: composición y localización	27
V. Estudios de liberación de neurotransmisores y densidad de receptores en los ganglios basales	30
Materiales y Métodos	
I. Diseño Metodológico	33
II. Sujetos Experimentales	35
III. Materiales y Reactivos	36
IV. Métodos y Técnicas	39
V. Análisis de los datos	48
Resultados	
Lesión de la <i>substantia nigra pars compacta</i>	50
Localización de la cánula de microdiálisis cerebral en el núcleo pedunculopontino	50
Concentraciones extracelulares de Glu y GABA, densidad de diferentes poblaciones de receptores y proceso de muerte celular en el núcleo pedunculopontino de ratas hemiparkinsonizadas	51
Efecto del tratamiento sistémico con MK-801 sobre los trastornos motores, las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el núcleo pedunculopontino y la presencia de células dopaminérgicas en la SNc de ratas hemiparkinsonizadas	56
Efecto del tratamiento sistémico con (-) nicotina sobre los trastornos motores, las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el núcleo pedunculopontino, la expresión estriatal de distintos factores neurotróficos y la presencia de células dopaminérgicas en la SNc de ratas hemiparkinsonizadas	62
Efecto de la lesión del núcleo subtalámico y la infusión intracerebral de MK-801 sobre las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP de ratas previamente hemiparkinsonizadas	68
Discusión	
I. Cambios neuroquímicos, moleculares y morfológicos en el núcleo pedunculopontino de ratas hemiparkinsonizadas.	73
1. Concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el núcleo pedunculopontino	73
2. Densidad de receptores colinérgicos muscarínicos en el núcleo pedunculopontino y en el <i>striatum</i>	75
3. Densidad de receptores gabaérgicos BDZ en el núcleo pedunculopontino	77
4. Densidad de receptores <i>mu</i> opioides en el núcleo pedunculopontino	78
5. Muerte celular en el núcleo pedunculopontino de ratas hemiparkinsonizadas	80
II. Efecto neuroprotector del tratamiento sistémico con MK-801 en ratas hemiparkinsonizadas	82
1. Efecto sobre los trastornos motores y la presencia de células dopaminérgicas	82
2. Concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el núcleo pedunculopontino	87
III. Efecto neuroprotector del tratamiento sistémico con (-) nicotina en ratas hemiparkinsonizadas.	89
1. Efecto sobre los trastornos motores	89
2. Concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el núcleo pedunculopontino y presencia de células dopaminérgicas en la <i>substantia nigra pars compacta</i>	91
3. Cantidad de factor neurotrófico derivado del cerebro y derivado de la glía expresado en el <i>striatum</i> de las ratas hemiparkinsonizadas	93

IV. Impacto de la manipulación local del sistema glutamatérgico en las ratas hemiparkinsonizadas.	95
1. Efecto de la lesión del núcleo subtalámico en la asimetría motora y las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el núcleo pedunculopontino	95
2. Efecto de la infusión intracerebral de MK-801 en las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el núcleo pedunculopontino	97
V. Consideraciones Finales	100
Conclusiones y Recomendaciones	103
Referencias Bibliográficas	105
Autobibliografía	121

SÍNTESIS

La presente investigación forma parte de los estudios que actualmente abordan la fisiopatología de la EP tomando en cuenta las alteraciones de diferentes sistemas de neurotransmisión presentes en los GB, como consecuencia de la degeneración de las células dopaminérgicas de la SNc. Al mismo tiempo, aborda la posibilidad de accionar sobre estas alteraciones a través de dos tipos diferentes de tratamiento: la administración de (-) nicotina y MK-801 con vistas a la neuroprotección y la lesión excitotóxica del NST. El trabajo contó con cuatro objetivos específicos que para su cumplimiento se organizaron en 12 tareas. Se incluyeron técnicas de cirugía estereotáctica, morfológicas e inmunohistoquímicas, microdiálisis cerebral, cromatografía líquida de alta resolución, autorradiografía, biología molecular y baterías de estudios conductuales. En el orden teórico científico, el presente estudio aporta conocimientos sobre los cambios en las concentraciones extracelulares de Glu y GABA, en la densidad de receptores muscarínicos, gabaérgicos benzodiazepínicos y *mu* opioides en el NPP de las ratas hemiparkinsonizadas. Igualmente, provee la primera descripción de muerte celular en el NPP ipsilateral a la inyección de 6-OHDA. Los tratamientos farmacológicos empleados mejoran la ejecución motora de las ratas que los recibieron. El bloqueo de los receptores glutamatérgicos NMDA mediante la administración de MK-801 promovió una menor pérdida de cuerpos celulares dopaminérgicos en el área tegmental ventral de las ratas con lesión de la SNc y revirtió los cambios en las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP. Estos hallazgos pudieran ser parte de los mecanismos que explican el efecto beneficioso del medicamento en el modelo. La administración de (-) nicotina mejoró la cantidad de factor neurotrófico derivado del cerebro expresada en el striatum y disminuyó la pérdida de células dopaminérgicas en la SNc, lo cual puede redundar en la mejoría motora inducida por el fármaco. La lesión del NST tuvo un impacto positivo disminuyendo la asimetría motora y las concentraciones extracelulares de Glu en el NPP. Desde el punto de vista económico, la ejecución de este trabajo comenzó con la asimilación tecnológica de la metodología para construir las cánulas de microdiálisis cerebral. Este paso propició un considerable ahorro de divisas y permitió potenciar el uso de la técnica de microdiálisis cerebral. Los resultados derivados de este trabajo de tesis se han presentado en eventos científicos nacionales e internacionales, han sido objeto de 8 publicaciones científicas en revistas internacionales y han recibido mención en el concurso central Premio Anual de la Salud en dos oportunidades. La asimilación del método de construcción de las cánulas de microdiálisis cerebral mereció premio en el XVI Forum de Ciencia y Técnica.

INTRODUCCIÓN

Cuando a inicios del siglo XIX James Parkinson describió la enfermedad, que ahora lleva su nombre, como un síndrome rígido acinético con temblor de reposo, no se conocía que la deficiencia dopaminérgica asociada a la muerte de las células de la *substantia nigra pars compacta* (SNc) constituye el rasgo neuropatológico más relevante de esta entidad (Olanow y Tatton, 1999).

Los síntomas cardinales de la Enfermedad de Parkinson (EP) son: temblor durante el reposo, rigidez muscular, hipocinesia y bradicinesia, así como trastornos de la marcha y de la postura (Obeso y cols, 2000a).

En la década de los años sesenta, se publicaron los hallazgos relacionados con la deficiencia dopaminérgica como aspecto distintivo de la EP (Hornykiewicz, 1982). A partir de entonces creció el interés por estudiar la neurotransmisión y las relaciones funcionales entre los núcleos que forman los ganglios basales (GB) (Hamani y Lozano, 2003). Sin embargo, los cambios que se producen en otros núcleos como el pedunculopontino (NPP), anatómica y funcionalmente muy relacionado con los GB, han sido poco estudiados en la condición parkinsoniana (Mena-Segovia y cols, 2004). Se sabe que el NPP está conectado de forma recíproca con los GB y que envía proyecciones colinérgicas y glutamatérgicas a la SNc, las cuales modulan la actividad dopaminérgica de las células nigrales (Rye y cols, 1988). Por otra parte, las conexiones del NPP con las redes de interneuronas de la médula espinal a través del haz reticuloespinal, refuerzan la importancia de esta estructura en el procesamiento de la información motora (Lee y cols, 2000).

El conocimiento de la relación entre la deficiencia dopaminérgica y la patogénesis de la EP, inició una promisoriosa etapa para el tratamiento farmacológico a través de la administración de un precursor de la dopamina (DA), la L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (Hornykiewicz, 1982; Jankovick, 2000). No obstante, la terapia con L-DOPA a largo plazo, desencadena múltiples efectos indeseados como movimientos involuntarios y fluctuaciones de la respuesta motora (Obeso y cols, 1989).

Diferentes alternativas terapéuticas: farmacológicas y quirúrgicas, han intentado restablecer el desbalance neuroquímico que se instala en los GB asociado a la degeneración de la vía nigroestriatal. Desde el punto de vista farmacológico se destacan la administración de agonistas dopaminérgicos que retarden el inicio de la terapia con L-DOPA, el uso de antagonistas glutamatérgicos que atenúen la actividad incrementada de este sistema de neurotransmisión en la EP y más recientemente el desarrollo de estrategias de neuroprotección que puedan prevenir la muerte de las células nigrales o enlentezcan el curso degenerativo de esta enfermedad (Fernández-Espejo, 2004; Hirsch, 2006; Savitt y cols, 2006).

A partir del hallazgo de una menor incidencia de EP entre sujetos con hábito de fumar, en los últimos años se ha enfatizado en el posible papel neuroprotector de la (-) nicotina previniendo la degeneración de las células dopaminérgicas de la SNc (Quick y Kulak, 2002). La nicotina es un

alcaloide natural presente en la planta *Nicotiana tabacum* que posee reconocidos efectos sobre el Sistema Nervioso Central y periférico (Martyn y Gale, 2003). Aunque no se han dilucidado con claridad los mecanismos a través de los cuales la nicotina protege a las células dopaminérgicas, en la literatura se refiere que la síntesis y liberación de factores neurotróficos, la liberación de DA estriatal a partir de las células que sobreviven a un daño neurotóxico y la promoción de eventos de señalización intracelular, siguiendo la activación de los receptores nicotínicos, entre otros, pudieran ser los pilares de la neuroprotección que ejerce esta sustancia en la EP (Roceri y cols, 2001; Quick, 2004).

También en el sentido de la neuroprotección, se ha promovido el uso terapéutico de antagonistas de los receptores N-metil D-aspartato (NMDA), tales como la amantadina y el MK-801, que disminuyen el tono glutamatérgico excitatorio sobre los núcleos de salida de los GB y sobre la propia SNc (Hallet y Standaert, 2004). En etapas tempranas de la EP, la actividad glutamatérgica parece jugar un papel positivo estimulando los mecanismos compensatorios presinápticos que contribuyen a mantener el núcleo *striatum* bajo el control dopaminérgico (Bezard y cols, 1999). Sin embargo, en estadios más avanzados de la enfermedad, la hiperactividad glutamatérgica parece ser partícipe de los eventos que acentúan el proceso neurodegenerativo y enfatiza los procesos de muerte celular de las células dopaminérgicas nigrales (Luquin y cols, 2006).

En el orden quirúrgico, el resurgimiento de este tipo de tratamiento para la EP está relacionado con el fracaso de la terapia con L-DOPA a largo plazo junto al desarrollo de los sistemas de registro de actividad eléctrica de núcleos profundos del cerebro y las técnicas de imágenes de alta resolución (Rodríguez-Oroz y cols, 2001). Estos dos últimos elementos junto a los hallazgos en modelos experimentales de EP, han profundizado en el conocimiento de la hiperactividad de núcleos como el subtalámico (NST) en la EP (Guridi y cols, 1996). Así, la lesión selectiva del NST ha permitido modular la actividad de los complejos circuitos que determinan la arquitectura funcional de los núcleos que forman parte de los GB (Blandini y cols, 1997; Piallat y cols, 1999; Dunnett y Björklund, 1999; Giladi y Melamed, 2000; Obeso y cols, 2000b; Wu y Frucht, 2005).

El desarrollo de modelos experimentales de la EP, primero en roedores y posteriormente en primates no humanos (PNH), abrió la posibilidad de estudiar numerosos aspectos vinculados con la fisiopatología y la terapéutica de la EP (Ungerstedt y Arbuthnott, 1970; Jenner, 2003). Desde el punto de vista neuroquímico la disminución de la liberación de la DA estriatal, junto al incremento en la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en las células que sobreviven a un daño neurotóxico han sido algunos de los principales hallazgos determinados en los modelos experimentales de EP (Sarre y cols, 1996). Sin embargo, otros sistemas de neurotransmisión como el aminoacídico, representado por la actividad del ácido glutámico (Glu) y del ácido gamma aminobutírico (GABA, del inglés γ -aminobutyric acid) respectivamente, no han sido abordados en

la misma magnitud.

A pesar del conocimiento acumulado hasta el momento en relación con la fisiopatología y la terapéutica de la EP, se desconoce si existen cambios neuroquímicos, morfológicos y moleculares en el NPP de las ratas hemiparkinsonizadas por inyección de 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Asimismo se desconoce el efecto del tratamiento con MK-801, (-) nicotina y la lesión excitotóxica del NST sobre estos cambios y su impacto en los trastornos motores que caracterizan al modelo.

HIPÓTESIS

En el NPP de las ratas hemiparkinsonizadas se producen cambios neuroquímicos, morfológicos y moleculares que junto a los trastornos motores que caracterizan al modelo pueden ser prevenidos total o parcialmente por medio de la manipulación de los sistemas glutamatérgico y colinérgico.

OBJETIVOS GENERALES

1. Evaluar los cambios neuroquímicos, morfológicos y moleculares en el NPP presentes en el modelo de hemiparkinsonismo por inyección de 6-OHDA en ratas.
2. Evaluar el efecto del tratamiento sistémico con agonistas colinérgicos, antagonistas glutamatérgicos, así como la lesión del NST sobre los trastornos motores, la presencia de células dopaminérgicas nigrales y las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP de ratas hemiparkinsonizadas por inyección de 6-OHDA.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las concentraciones extracelulares de Glu y GABA, la densidad de receptores colinérgicos muscarínicos, gabaérgicos BDZ y *mu* opioides, así como el proceso de muerte celular en el NPP de ratas hemiparkinsonizadas.
2. Evaluar el efecto del tratamiento sistémico con MK-801 sobre los trastornos motores, las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP y la presencia de células dopaminérgicas en la SNc de ratas hemiparkinsonizadas.
3. Evaluar el efecto del tratamiento sistémico con (-) nicotina sobre los trastornos motores, las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP, la expresión estriatal de distintos factores neurotróficos y la presencia de células dopaminérgicas en la SNc de ratas hemiparkinsonizadas.
4. Evaluar el efecto de la lesión del NST y la infusión intracerebral de MK-801 sobre las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP de ratas previamente hemiparkinsonizadas.

Novedad Científica e importancia teórica y práctica del presente trabajo

La presente investigación se imbrica en los actuales estudios que intentan profundizar en las consecuencias del desequilibrio neuroquímico que acarrea la muerte de las células nigrales en el funcionamiento de los GB. Aborda la posibilidad de accionar sobre este desequilibrio a través de dos tipos diferentes de tratamiento: la administración sistémica de distintos fármacos con vistas a la neuroprotección y la lesión excitotóxica del NST.

Las estrategias de neuroprotección han adquirido una importancia especial en los últimos años al intentar atenuar el curso progresivo de las enfermedades neurodegenerativas, e incidir sobre el sustrato celular y molecular que gobierna el proceso de muerte en la EP y otras entidades de este tipo. La lesión del NST constituye una alternativa de tratamiento quirúrgico de gran impacto para la EP. Por esta razón, el estudio de su repercusión sobre la neurotransmisión en otros núcleos vinculados al procesamiento de la información motora, es de un significativo valor **científico** y **clínico**.

En el orden científico, el presente estudio **aporta** un conjunto de conocimientos que profundizan en la relación funcional del NPP con los núcleos que forman los GB. Demuestra por primera vez, la presencia de cambios moleculares, neuroquímicos y morfológicos en esta estructura, asociados al parkinsonismo experimental. Tal es el caso, de los hallazgos de los cambios de las concentraciones extracelulares de aminoácidos neurotransmisores y el proceso de muerte celular en este núcleo en el modelo de 6-OHDA. Estos **aportes científicos**, junto al empleo de un grupo de técnicas de primer nivel como la microdiálisis cerebral para monitorear *in vivo* los niveles de aminoácidos neurotransmisores, le confieren un carácter altamente **novedoso** a la presente investigación.

Desde el punto de vista **económico**, la ejecución de este trabajo se inició con la asimilación tecnológica de la metodología para construir las cánulas de microdiálisis cerebral, cuyo precio en el mercado internacional supera 80 veces el de las cánulas construídas en nuestro laboratorio y presentan igual efectividad para la recuperación de los aminoácidos de interés. La asimilación de esta metodología permitió potenciar el uso de la técnica de microdiálisis cerebral. Asimismo, facilitó su aplicación en el estudio de las concentraciones extracelulares de los neurotransmisores en la presente investigación, con un ahorro considerable de divisas convertibles.

La EP es una enfermedad neurodegenerativa que afecta al 1% de la población mayor de sesenta años. En nuestro país, con una esperanza de vida promedio de 74 años, el 15% de la población corresponde a este grupo etáreo, por lo cual los resultados presentados adquieren un **valor social** relevante, al profundizar en la fisiopatología de una entidad con relativamente alta incidencia en nuestro medio.

Los resultados derivados de la presente investigación se han presentado en diferentes eventos científicos nacionales e internacionales, han sido objeto de ocho publicaciones científicas en

revistas internacionales y han recibido mención en el Concurso Central Premio Anual de la Salud en dos oportunidades (2005, 2006). La asimilación tecnológica del método de construcción de las cánulas de microdiálisis cerebral mereció premio relevante en el XVI Forum de Ciencia y Técnica (2002) a nivel de centro y de municipio y destacado en el nivel provincial.

El presente documento está constituido por nueve secciones: introducción, revisión bibliográfica, materiales y métodos, resultados, discusión, conclusiones, recomendaciones, referencias bibliográficas, agradecimientos y autobibliografía. Consta de 119 páginas, 34 figuras y 5 tablas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I. ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LOS GANGLIOS BASALES

Los GB constituyen un grupo de núcleos grises situados por debajo de la corteza y en la base de los hemisferios cerebrales (Rodríguez-Oroz y cols, 2004). Actualmente se les considera un grupo de centros y circuitos interconectados anatómicamente y relacionados funcionalmente e incluyen: el cuerpo del *striatum* (St) (caudado, putamen y accumbens), el *globus pallidum* (segmento lateral (GPl) y segmento medial (GPm)), el NST y la *substantia nigra* (*pars reticulata* (SNr) y *pars compacta* (SNc) (Alheid y cols, 1990; Bentivoglio y Morelli, 2005).

Varios circuitos “corteza cerebral-GB-tálamo-corteza cerebral” han sido descritos desde el punto de vista anatomofuncional.

1. El circuito motor es esencial en la programación, iniciación y ejecución del movimiento.
2. El circuito óculomotor tiene un papel equivalente al anterior para los movimientos oculares.
3. El circuito prefrontal-dorsolateral participa en los procesos de la memoria espacial.
4. El circuito órbito-frontal-lateral participa en las adaptaciones conductuales.
5. El circuito límbico participa en el procesamiento de las motivaciones y las emociones.

Estos circuitos funcionan en paralelo y desempeñan un importante papel en las funciones somatomotoras, óculomotoras, cognitivas y límbicas, siendo cada uno de ellos el sustrato neural de funciones diferentes (Alexander y Crutcher, 1990; De Long 1990; Groenewen, 2003).

Las conexiones cortico-estriado-pálido-tálamo-corticales que forman el circuito motor son las más relevantes en la fisiología del movimiento y en la fisiopatología de los trastornos motores.

El circuito motor une áreas motoras precentrales y áreas sensitivas postcentrales, con la región sensitivo-motora del St (putamen dorsolateral), empleando glutamato como neurotransmisor y siendo, por tanto, una conexión excitadora (Parent y Hazrati, 1995). El St, dentro de los GB, es considerado el núcleo integrador y principal receptor de las conexiones más importantes provenientes de las diferentes zonas de la corteza cerebral (Alexander y Crutcher, 1990; De Long, 1990; Graybiel, 1990).

Al mismo tiempo, el St recibe aferencias masivas provenientes del tálamo y de la SNc y menos abundantes provenientes del GP, NST, núcleo dorsal del rafe, *locus coeruleos*, porción basolateral de la amígdala y el NPP (Parent y cols, 1995; Onn y cols, 2000).

Albin, Young y Penney en 1989, propusieron un modelo anátomo funcional de los GB, subdividido en vía “directa” e “indirecta”, partiendo de diferentes poblaciones neuronales estriatales y alcanzando los núcleos de salida (GPm y SNr) a través de una ruta diferente (Albin y cols, 1989) (Fig. 1). Aunque el estado actual del conocimiento sobre el funcionamiento de los GB ha permitido profundizar en el

papel que desempeñan las conexiones recíprocas entre núcleos como el GP y el NST, el modelo de funcionamiento propuesto por Albin, Young y Penney en 1989, se considera válido en la actualidad (Albin y cols, 1989).

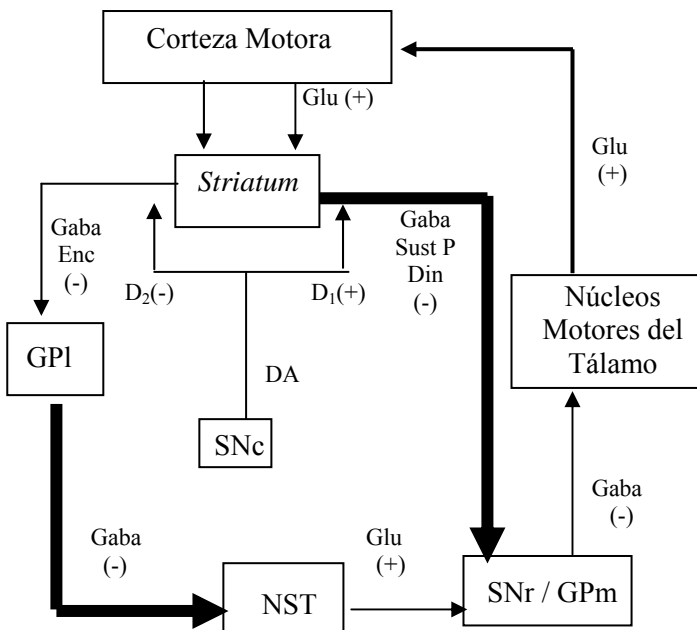


Fig. 1 Diagrama del funcionamiento normal de los ganglios basales. Leyenda: (-) inhibitorio; (+) excitatorio; GPI: *globus pallidum lateral*; NST: núcleo subtalámico; GPm: *globus pallidum medial*; SNr: *substantia nigra reticulata*; SNc: *substantia nigra compacta*; Glu: glutamato; Gaba: ácido γ -amino butírico; DA: dopamina; Enc: encefalinas; Din: dinorfinas; Sust. P: sustancia P; D₁ y D₂: subtipos de receptores dopaminérgicos. El grosor de la flechas está en relación con la actividad de la conexión.

La vía “directa” es monosináptica y tiene su origen en neuronas gabaérgicas inhibitorias que co-expresan sustancia P y dinorfina, presentan receptores dopaminérgicos D₁ y proyectan sobre la región sensitivo-motora del GPM y la SNr (Alexander y Crutcher, 1990; De Long, 1990; Obeso y cols, 2000a; Groenewen, 2003) (Fig.1). La vía “indirecta” por su parte, es polisináptica, se origina en las neuronas estriatales gabaérgicas que coexpresan encefalina, presenta receptores dopaminérgicos D₂ y proyecta al GPI (Fig. 1). El GPI envía eferencias gabaérgicas a la región sensitivomotora del NST, que a su vez proyecta al GPM y a la SNr, empleando Glu como neurotransmisor y por tanto excitando la salida de los GB (Alexander y Crutcher, 1990).

Las eferencias del GPM y la SNr son gabaérgicas y proyectan a los núcleos motores del tálamo (núcleos ventral anterior y ventral lateral), en ruta hacia la corteza y núcleos troncoencefálicos. Las eferencias tálamo-corticales glutamatérgicas, proyectan sobre las zonas motoras de corteza y cierran el circuito (Alexander y Crutcher, 1990; Rodríguez-Oroz y cols, 2004).

Este modelo sugiere que la activación de la vía corticoestriatal produce, a partir de la “vía directa”: inhibición gabaérgica de las neuronas del GPM y la SNr, desinhibición de los núcleos talámicos diana y facilitación de las proyecciones talámicas a las áreas motoras precentrales. El efecto neto de esa secuencia sería una retroalimentación positiva de los movimientos iniciados en la corteza (Alexander y Crutcher, 1990).

Por su parte, en las neuronas gabaérgicas de la “vía indirecta”, la estimulación corticoestriatal produce: inhibición del GPI, desinhibición del NST, excitación del GPM y la SNr que aumenta su

actividad eferente inhibitoria sobre sus dianas talámicas y troncoencefálicas junto a la reducción de la facilitación de la vía tálamo-corteza motora. El efecto neto de esta secuencia sería una retroalimentación negativa de los movimientos, que podría ser funcionalmente interpretado como una inhibición de las contracciones musculares inadecuadas al movimiento en marcha, o una señal de detención del movimiento (Alexander y Crutcher, 1990; De Long, 1990; Obeso y cols, 2000a).

En resumen, el aspecto fundamental de la fisiología de los GB, con énfasis en el circuito motor, consiste en que la inhibición en los núcleos de salida (GPM/SNr) conduce a una facilitación del movimiento, mientras que el aumento en las descargas neuronales de estos provoca detención o inhibición del mismo (Albin y Greenamyre, 1989; Parent y Hazrati, 1995; Wichmann y De Long, 1997; Rodríguez-Oroz y cols, 2004). Una señal cortical evocará una secuencia temporal de excitación o inhibición en las neuronas de la SNr y el GPM y la alteración de este patrón de señal puede conducir a trastornos del movimiento (Alexander y cols, 1985).

I. Vía dopaminérgica nigroestriatal

En 1959 se demostró la presencia de DA en el cerebro humano (Carlsson, 1959). La DA se sintetiza a partir del aminoácido tirosina, el cual se encuentra en el plasma en concentraciones de 60-70 μ M y en el parénquima cerebral en concentraciones superiores a 70 μ M (Rodríguez, 2004).

La mayor concentración de DA en el cerebro se encuentra en las terminales estriatales de las neuronas agrupadas en la SNC, cuyos axones constituyen la vía dopaminérgica nigroestriatal (Rodríguez, 2004).

Se conoce que la DA posee efectos diferenciales sobre las neuronas estriatofugales (Alexander y Crutcher, 1990; Graybiel, 1990; Gerfen, 2000; Onn y cols, 2000). Este neurotransmisor tiene un efecto excitador sobre las neuronas estriatales que proyectan hacia la “vía directa” e inhibitorio sobre las neuronas que proyectan hacia la “vía indirecta” del circuito motor (Graybiel, 1990; Albin, 1995).

Este efecto diferencial se ha propuesto que está relacionado con la distribución también diferencial de los subtipos principales de receptores dopaminérgicos (D₁ y D₂) (Gerfen y cols, 1995; Gerfen, 2000, Hurley y Jenner, 2006). Gerfen y cols en 1995 sugirieron que los receptores D₁ son preferencialmente expresados por las neuronas de la proyección estriatonigral y probablemente estriatopallidal medial que conforman la “vía directa”, mientras que los receptores D₂ son expresados preferencialmente por las neuronas de la proyección estriato pallidal lateral que conforman la “vía indirecta” (Gerfen y cols, 1995). Atendiendo a esta regulación diferencial, elevados niveles de DA estriatal resultan en una inhibición de los núcleos eferentes de los GB (SNr y GPM), mientras que la disminución en las concentraciones de DA estriatal conduce a una fuerte estimulación de dichas estructuras (Gerfen, 2000).

II. ENFERMEDAD DE PARKINSON

En 1817, James Parkinson describió de forma detallada los síntomas clínicos de la enfermedad que posteriormente llevaría su nombre. En su ensayo sobre la Parálisis Agitante, James Parkinson definió la sintomatología 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*”¹ (Parkinson, 1817)

Si bien en el último punto, los conceptos clínicos sobre la enfermedad se han modificado, la evolución asimétrica y el curso de la enfermedad, la sintomatología temblorosa, la marcha festinante de aparición más tardía y el enlentecimiento motor fueron detallados de forma clara en esta primera descripción (Barraquer, 2004).

La EP es una enfermedad neurodegenerativa que afecta primariamente a las neuronas dopaminérgicas de la SNc, causando pobreza y lentitud en los movimientos (Poewe y Wenning, 1996). El síndrome parkinsoniano comprende al menos dos de cuatro signos básicos: bradicinesia/acinesia, temblor, rigidez y trastorno postural (Alberca y Ochoa, 1997).

La etiología y los mecanismos patogénicos de la EP son, y posiblemente seguirán siendo durante muchos años, desconocidos (Alonso y Jiménez, 2004). Se ha sugerido que las causas de la EP son multifactoriales e intervienen en ella factores genéticos, ambientales y el envejecimiento (Alonso y Jiménez, 2004). Los factores etiológicos reseñados ocasionan la muerte de las células dopaminérgicas por necrosis celular o apoptosis, como consecuencia de la disfunción molecular o bioquímica originada por uno o más de los siguientes mecanismos patogénicos (Mayeux, 2003; López-Lozano y Álvarez-Santullano, 2004):

- Estrés oxidativo con lesiones y anomalías originadas por radicales libres y peroxidación lipídica subsiguiente.
- Alteración de la función mitocondrial.
- Deficiencia o falta de factores neutróficos (FNT); inflamación y mecanismos inmunológicos diversos, auto y alogénicos.
- Excitotoxicidad
- Citotoxicidad producida por acumulación de calcio.

De los diversos mecanismos propuestos, la hipótesis de los radicales libres como causantes de la muerte celular ha sido investigada detalladamente en la EP (Mayeux, 2003). Las neuronas dopaminérgicas nigrales son particularmente vulnerables a la degeneración ya que presentan altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Blum y cols, 2001). El catabolismo enzimático de la DA induce la formación de H₂O₂ por medio de la actividad de la enzima

¹ Movimientos trémulos involuntarios, con reducción de la fuerza muscular, en partes del cuerpo en reposo, incluso si están apoyadas; con una propensión a inclinar el tronco hacia adelante y a pasar de un ritmo de marcha a otro de carrera, mientras que los sentidos y la inteligencia se mantienen intactos.

monoamino oxidasa (MAO) (Fanh y Cohen, 1992). La auto-oxidación no enzimática de la DA promueve la formación de neuromelanina y esta a su vez, la formación de radicales hidroxilo cuando se combina con el hierro (Hirsch y cols, 1997).

Por otra parte, las neuronas dopaminérgicas son dependientes del sistema de fosforilación oxidativa como fuente de energía, por lo que un defecto en la cadena respiratoria puede incrementar el riesgo de muerte neuronal (López-Lozano y Álvarez-Santullano, 2004). En los enfermos parkinsonianos se ha demostrado una reducción mayor del 35% de la actividad del complejo I mitocondrial en las células de la SNc, que es específica de la enfermedad (Schapira, 1994).

La deficiencia o alteraciones de los FNT también se ha contemplado dentro de los mecanismos etiopatogénicos de la EP (Sebastián, 2004). Los FNT son moléculas proteicas que estimulan la proliferación y la supervivencia celular (Landreth, 1999). Un gran número de ellos ha demostrado actuar sobre las neuronas dopaminérgicas, entre ellos el factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC, del inglés Brain Derived Neurotrophic Factor) y el factor neurotrófico derivado de la glía (FNDG, del inglés Glial Derived Neurotrophic Factor) (Sebastián, 2004).

El FNDG fue el primer FNT al cual se le atribuyó el apoyo a la supervivencia y diferenciación de las células dopaminérgicas mesencefálicas y las células estriatales (Landreth, 1999). Al mismo tiempo, el FNDG mantiene un apoyo trófico selectivo sobre las células dopaminérgicas expuestas a un daño físico o químico (Nosrat y cols, 2004).

El FNDC es normalmente expresado por las neuronas del sistema dopaminérgico nigroestriatal adulto (Knott y cols, 2002). La inyección intraestriatal de esta proteína atenúa la conducta rotacional inducida por agonistas dopaminérgicos en los modelos experimentales de EP en roedores, mientras que los implantes de fibroblastos secretores de FNDC previenen la muerte, inducida por 6-OHDA, de las células dopaminérgicas nigrales (Sebastián, 2004).

El estrés oxidativo y las fallas mitocondriales convergen en la inducción de apoptosis en distintos sistemas celulares. Por esta razón se ha hipotetizado sobre el curso apoptótico de la muerte de las células dopaminérgicas nigrales (Blum y cols, 2001). Los primeros hallazgos del estudio de fragmentación del ADN en cerebros de pacientes con EP, revelaron la presencia de cuerpos apoptóticos en el tejido nigral (Jordán, 2003). No obstante no se ha descartado el desarrollo de un curso necrótico concomitante, tomando en cuenta la exposición prolongada de las células dopaminérgicas a la estimulación glutamatérgica de origen subtalámica (Martín, 2001).

En los modelos experimentales de la EP los estudios de muerte celular, se han dirigido mayoritariamente a la SNc, mientras que el efecto de la denervación dopaminérgica sobre la muerte celular en otros núcleos ha sido menos abordada (Dauer y Przedborski, 2003).

1. Alteraciones en el funcionamiento de los GB en la EP

La degeneración de las células dopaminérgicas de la SNc provoca la pérdida de la influencia de la DA sobre sus blancos estriatales afectándose de manera diferente la transmisión a través de las vías “directa” e “indirecta” del circuito motor (Bergman y cols, 1998; Obeso y cols, 2000b; Kelly y Strick, 2004).

La transmisión sináptica a través de la vía “directa” (St-GPm/SNr) está sensiblemente disminuida, por lo cual debido a su naturaleza gabaérgica, los potenciales postsinápticos inhibitorios que esta vía genera en las neuronas de los núcleos eferentes, GP y SNr, están disminuidos (De Long, 1990; Smith y Kieval, 2000).

La vía indirecta (St-GPI-NST-GPm/SNr) tiene incrementada la actividad gabaérgica del St sobre el GPI (De Long, 1990; Smith y Kieval, 2000) lo cual produce una considerable disminución del efecto de “frenado” sobre el NST (De Long, 1990; Obeso y cols, 2000a) (Fig. 2). Este último, a su vez, recibe simultáneamente una aferencia glutamatérgica de origen cortical (vía hiperdirecta) cuyo efecto se hace predominante (De Long, 1990; Bergman y cols, 1998; Obeso y cols, 2000a).

Por último, el NST con neuronas glutamatérgicas excitadoras, incrementa su actividad sobre los núcleos eferentes de los GB (GPm/SNr) (Albin 1995; Hamani y cols, 2003). De esta manera se incrementan y modifican los patrones de actividad de GPm/SNr, con un aumento de sus efectos inhibidores tanto sobre el tálamo motor como sobre el NPP (Fig. 2).

Adicionalmente, en ausencia de DA se facilita una sincronización aberrante de la actividad neuronal del NST y los núcleos de salida de los GB (Rodríguez-Oroz y cols, 2004).

El resultado neto del desbalance explicado anteriormente, es una hiperactividad en los núcleos eferentes (GPm y SNr) y sus proyecciones inhibitorias hacia el tálamo ventrolateral con el consecuente empobrecimiento de la actividad motora (De Long, 1990; Obeso y cols, 2000a).

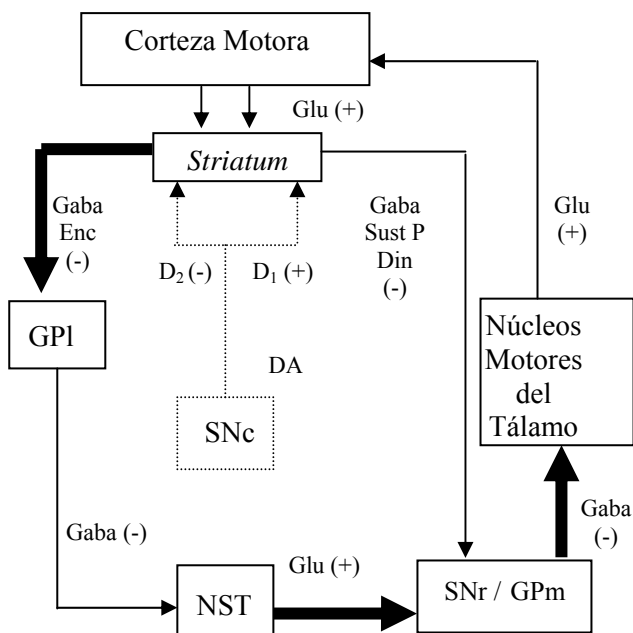


Fig. 2 Diagrama del funcionamiento del circuito motor de los ganglios basales en el parkinsonismo. Leyenda: (-) inhibitorio; (+) excitatorio; GPI: *globus pallidum lateral*; NST: núcleo subtalámico; GPm: *globus pallidum medial*; SNr: *substantia nigra reticulata*; SNc: *substantia nigra compacta*; Glu: glutamato; Gaba: ácido γ -amino butírico; DA: dopamina; Enc: encefalinas; Din: dinorfinas; Sust. P: sustancia P. El trazo con líneas discontinuas significa la pérdida de las células dopaminérgicas de la SNc y de la vía nigroestriatal. El mayor grosor de las flechas se corresponde con un incremento de la transmisión sináptica y el menor grosor con una disminución de la transmisión sináptica.

De acuerdo con este modelo, la actividad neuronal del GPM/SNr en la EP está aumentada, lo cual está sustentado por los siguientes hallazgos:

- Un incremento en la captación de 2-deoxiglucosa como un índice de activación neuronal de las células subtalámicas en primates (Mitchell y cols, 1989).
- Un incremento de la actividad de descarga de las células del NST y sus núcleos diana (SNr y el GPM) en primates y ratas parkinsonizadas (Fillion y Tremblay, 1991; Robledo y Feger, 1990).
- El bloqueo farmacológico de la proyección excitatoria glutamatérgica subtalámica disminuye la hiperactividad de las células del GPM y la SNr en ratas hemiparkinsonizadas (Burns y cols, 1993).

Este modelo de disfunción no contempla otro grupo de proyecciones que se originan en diferentes núcleos de los GB, alcanzan el tallo cerebral (específicamente a nivel de la zona que ocupa el tegmento mesopontino) y también resultan afectadas en la condición parkinsoniana (Lee y cols, 2000). Estas proyecciones entre los GB y el tallo cerebral sugieren que las alteraciones en el funcionamiento del NPP pueden ser responsables de algunos de los síntomas axiales descritos en la EP ya que el tallo cerebral está involucrado en el control de la musculatura axial, y esta es crucial en el mantenimiento de la postura y de la marcha (Takakusaki y cols, 2003).

2. Modelos experimentales de parkinsonismo

Una vez establecida la participación de la DA en la patogénesis de la EP, creció el interés por desarrollar modelos experimentales de EP a partir de lesiones de la SNc (Carlsson, 1959). En 1959, Senoh y Witkop aislaron la 6-OHDA, un análogo hidroxilado de la DA (Senoh y Witkop, 1959). Porter en 1965 demostró que la administración sistémica de 6-OHDA a roedores induce una deficiencia noradrenérgica en el sistema nervioso autónomo del corazón (Porter y cols, 1965). Otros autores documentaron igualmente la acción tóxica de la sustancia sobre las terminales nerviosas simpáticas (Thoenen y Tranzer, 1968). Sin embargo, dado que la 6-OHDA no atraviesa la barrera hematoencefálica, la destrucción de las neuronas centrales solo se logró con la administración intracerebral directa de la neurotoxina (Ungerstedt 1968, 1976).

2.1 Modelo rotatorio de 6-OHDA

A inicios de la década de los años 70, el grupo de Ungerstedt, publicó que la inyección intracerebral de 6-OHDA en el sistema dopaminérgico mesostriatal causa una disminución drástica de la DA en el St (Ungerstedt y Arbuthnott, 1970). La 6-OHDA es tomada selectivamente por las células que tienen un sistema de transporte de membrana para las catecolaminas y las destruye. La muerte celular se produce, al parecer, por autoxidación de la toxina hasta compuestos (6-OH quinona y H₂O₂) altamente reactivos y potencialmente citotóxicos (Chase y Oh, 2000).

En 1970, quedó establecido el modelo rotatorio de 6-OHDA cuando Ungerstedt y Arbuthnott publicaron que la administración sistémica de D-anfetamina a ratas con lesión unilateral de la vía

nigroestriatal, por inyección de la neurotoxina 6-OHDA, producía giros completos ipsilaterales al hemisferio lesionado. La cuantificación de los giros, ofrece una medida de la deficiencia dopaminérgica (Ungerstedt y Arbuthnott, 1970). La D-anfetamina estimula la liberación de DA de las terminales intactas contralaterales a la lesión, lo cual acentúa el desbalance entre el hemisferio sano y el lesionado exacerbando la asimetría motora (Jeon y cols, 1995; Dauer y Przedborski, 2003; Hirsch y cols, 2003).

2.2 Modelo de EP por administración de MPTP

La pro-neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) es un compuesto con efectos parkinsonogénicos que se ha convertido en el prototipo de cómo una toxina (endógena o exógena) puede contribuir al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Jenner, 2003). La magnitud de los efectos parkinsonizantes del MPTP se evidenció cuando, de forma involuntaria, un grupo de jóvenes drogadictos se lo inyectaron como heroína sintética y desarrollaron un cuadro clínico muy similar al de los pacientes parkinsonianos (Langston y cols, 1983). El mecanismo por el cual esta neurotoxina provoca la muerte neuronal es complejo destacándose los siguientes factores: alteración mitocondrial, producción de radicales libres, incremento del calcio intracelular y predominio de la neurotransmisión excitatoria (Kopin y Schoenberg, 1988; Schobert, 2004).

La validez del modelo experimental secundario a la intoxicación con MPTP ha sido corroborada en múltiples estudios en los cuales se han determinado: las características clínicas y anatomopatológicas; la afectación de varios sistemas de neurotransmisores y neuromoduladores; la alteración funcional de los GB así como su aplicabilidad para nuevos ensayos terapéuticos (Jenner, 2003).

2.3 Otros modelos experimentales de EP

Con el advenimiento de las técnicas de biología molecular y el conocimiento del genoma, se han desarrollado otros modelos que o bien contienen copias adicionales de un gen o carecen de un gen que es reemplazado por otro que expresa una proteína no funcional (ejemplo: el modelo de ratón deficiente del gen que expresa la proteína parkin) (Goldberg y cols, 2003; Bossy-Wetzel y cols, 2004; Hirsch, 2006).

3. Principales alternativas de tratamiento en la EP

El tratamiento contemporáneo de la EP se basa en la utilización de fármacos que intentan compensar la deficiencia dopaminérgica. En esta dirección la administración del aminoácido L-DOPA, es el más efectivo de los tratamientos farmacológicos disponibles hasta el momento (Jankovic y Marsden, 1998; Mayeux, 2003). No obstante, el uso prolongado de este medicamento acarrea complicaciones motoras y psiquiátricas lo cual ha incentivado la búsqueda y evaluación de

nuevas terapias alternativas, tanto desde el punto de vista farmacológico como quirúrgico (Benazzouz y Hallet, 2000).

En relación con el tratamiento farmacológico, un número de fármacos son combinados en diferentes dosificaciones con la L-DOPA entre ellas: inhibidores de la MAO como el deprenilo, antagonistas colinérgicos, antagonistas de los receptores NMDA como la amantadina, y particularmente agonistas dopaminérgicos como la bromocriptina y el pergolide (Jankovic, 2000; Rogers, 2000).

En lo que concierne a los tratamientos farmacológicos encaminados a la neuroprotección, en la tabla I se muestra un grupo de fármacos con potencialidades para enlentecer el curso progresivo de la EP atendiendo a los resultados de los estudios preclínicos (Schapira, 2002; Ravina y cols, 2003, Savitt y cols, 2006).

Tabla I. Principales fármacos con actividad de neuroprotección aplicadas exitosamente en estudios preclínicos. FNT: Factores Neurotróficos, MPTP: 1 metil, 4 fenil, 1,2,3,6 tetrahidropiridina, PNH: Primates No-Humanos, DA: dopamina.

Fármaco	Efecto más conocido
Cafeína	Puede actuar como antagonista de los receptores de adenosina
Coenzima Q10	Actividad antioxidante
Estrógenos (específicamente el 17 β -estradiol)	Modulan eventos de transcripción nuclear y cascadas de señalización intracelular
Gangliósidos GM-1	Su acción está relacionada con la actividad de los factores neurotróficos
Minociclina	Cruza fácilmente la barrera hematoencefálica e inhibe los eventos inflamatorios relacionados con la actividad microglial
Nicotina	Previene la toxicidad inducida por MPTP en PNH y puede actuar como antioxidante o atenuando los procesos de excitotoxicidad
Ligando de las neuroimmunofilinas GPI-1485	Posee actividad neurotrófica sin mostrar las propiedades inmunosupresivas de los fármacos similares.
Complejo rasigilina/selegilina	Su mecanismo de neuroprotección es multifactorial y tienen un probado efecto antiapoptótico
Rompirol y Pramipexol	Ambos son derivados de agonistas de la DA y muestran actividad antioxidante

Las terapias quirúrgicas más empleadas en la EP son el trasplante de tejido, la lesión selectiva de diferentes núcleos de los GB, y la estimulación profunda del NST y muy recientemente del NPP (Luquin, 2004, Obeso y cols, 2000b; Benazzouz y Hallett, 2000; Alvarez y cols, 2001, 2005; Maurice y cols, 2003; Windels y cols, 2003; Dezawa y cols, 2004; Paul y cols, 2004; Stefani y cols, 2007).

No obstante, a pesar de los avances en el tratamiento farmacológico y quirúrgico para la EP, ninguno de ellos por sí solo, atenúa o elimina todos los signos y síntomas que caracterizan a la EP, y tampoco ninguno de ellos ha sustituido a la terapia con L-DOPA a largo plazo (Obeso y cols,

2000b; Walters y cols, 2000). Una posible explicación es que la fisiopatología de muchos de los síntomas cardinales de la EP, involucra no sólo el lazo motor (corteza motora-GB-corteza motora), sino que alcanza la disfunción de otros núcleos y circuitos, secundaria a la degeneración de las células dopaminérgicas nigrales (Viallet y Witjas, 2003).

3.1 La lesión selectiva del núcleo subtalámico como alternativa quirúrgica en la EP

La hiperactividad del NST es actualmente aceptada como uno de los pilares de la fisiopatología de la EP lo cual ha sido demostrado en PNH parkinsonizados por administración de MPTP (Rodríguez-Oroz y cols, 2001). En este modelo se ha encontrado un incremento significativo en la actividad subtalámica y de los núcleos de salida de los GB: la SNr y el Gpm (Mitchell y cols, 1989; Bergman y cols, 1994; Vila y cols, 1997). Guridi y cols en 1996 demostraron que la lesión selectiva del NST en este modelo experimental se acompaña de un mejoramiento importante de los signos motores tales como la acinesia y la rigidez así como los trastornos posturales y de la marcha (Guridi y cols, 1996). Igualmente se evidenció el impacto de la lesión del NST reduciendo la expresión del ARNm de la enzima que cataliza el paso limitante en la síntesis de GABA en la SNr y el Gpm, en consonancia con una menor actividad de descarga eléctrica en estos núcleos (Wichmann y cols, 1994; Guridi y cols, 1996).

En el modelo de hemiparkinsonismo en ratas por inyección de la neurotoxina 6-OHDA en la SNc se ha documentado igualmente, un incremento significativo en la actividad metabólica y eléctrica de las neuronas de los núcleos de salida de los GB, lo cual se ha revertido después de la lesión excitotóxica del NST (Blandini y cols, 1997).

Otros estudios en este mismo modelo han revelado que la lesión excitotóxica del NST promueve una disminución significativa del número de giros inducidos por la administración de agonistas dopaminérgicos, junto al mejoramiento de otras variables que describen la ejecución motora del animal (Henderson y cols, 1999).

Estos hallazgos experimentales, unido a las limitaciones existentes en el manejo farmacológico de la EP en sus estadios más avanzados, así como al desarrollo de los sistemas de registro de actividad eléctrica profunda y a las técnicas imagenológicas de alta resolución, han conducido al resurgimiento de la cirugía estereotáctica, específicamente de la subtalamotomía como alternativa terapéutica para la EP (Obeso y cols, 2000b, Rodríguez-Oroz y cols, 2001).

III. NEUROPROTECCIÓN EN LA EP EXPERIMENTAL

En los últimos años se han desarrollado tratamientos farmacológicos en la EP que actúan sobre sistemas cerebrales distintos al dopaminérgico, como son los sistemas glutamatérgico, noradrenérgico o peptidérgico, implicados en la fisiopatología de la enfermedad (López-Lozano y Alvarez-Santullano, 2004). En contraste con el tratamiento sintomático, el objetivo del tratamiento

neuroprotector es proteger o evitar la muerte neuronas vulnerables al proceso degenerativo (Levi y Brimble, 2004).

1. Neuroprotección basada en la disminución de la actividad glutamatérgica

El glutamato es un aminoácido excitador que activa diversos tipos de receptores ampliamente localizados en los núcleos que forman los GB (Alonso-Solis, 1992). La activación de los receptores ionotrópicos, específicamente del tipo NMDA, induce la apertura de canales de calcio en la membrana celular (Smith y cols, 2001). Por otra parte, la activación de receptores metabotrópicos al glutamato asociados a proteína G, actúa modulando sistemas de segundos mensajeros a través de nucleótidos cíclicos o del metabolismo del fosfoinositol (Smith y cols, 2001; Marino y cols, 2003).

En la EP, como consecuencia de la pérdida de neuronas en la SNc y de la degeneración de la vía nigroestriatal, existe una hiperactividad de las eferencias del NST: el Gpm y la SNr, y posiblemente de las conexiones del NST con la SNc y el área tegmental ventral (ATV) (Dauer y Przedborski, 2003). En estas condiciones, las neuronas dopaminérgicas de la SNc, que poseen una vasta representación de receptores glutamatérgicos ionotrópicos y metabotrópicos, serían más vulnerables a los efectos producidos por la liberación de Glu en sus sinapsis (Bezard y Gross, 1998). De esta forma, el Glu se convertiría en un tóxico endógeno, ya que permitiría la entrada masiva de calcio a la célula, que desencadenaría un conjunto de reacciones dañinas para su supervivencia (Marin y Tolosa, 1999). De forma resumida, la entrada de calcio provocaría: formación de radicales libres y activación de proteasas y lipasas-calcio dependientes así como activación de la enzima óxido nítrico sintetasa que desencadenaría la producción de óxido nítrico (Obrenovitch, 2001). Este compuesto produce inhibición de los complejos mitocondriales I y II, por lo que disminuiría la producción de energía celular necesaria para los procesos metabólicos celulares claves y aumentaría el estrés celular (Zeevalk y cols, 2000). El calcio provocaría una caída de potencial de la membrana mitocondrial con la consiguiente apertura de poros en la membrana y salida de los productos proapoptóticos al citoplasma celular (Reggo y Oliveira, 2003). El calcio es, además, capaz de producir daño mitocondrial por sí mismo (Jordán y cols, 2000).

Las evidencias experimentales apuntan a un efecto neuroprotector de diversas estrategias dirigidas a: limitar la acción del Glu sobre sus receptores, por medio de la administración de antagonistas glutamatérgicos, o atenuar la exposición de las células de la SNc a la acción de este neurotransmisor a través de la lesión temprana del NST (Turski y cols, 1991; Brouillet y Beal, 1993; Nakao y cols, 1999; Blandini y cols, 2001a; Phillips y cols, 2006).

Se ha demostrado que la administración sistémica previa del antagonista de los receptores NMDA, MK-801, previene la toxicidad del ión 1-metil 4-fenil 1,2,3-piridina (MPP^+) inyectado directamente en la SNc de las ratas (Turski y cols, 1991). Otros trabajos han documentado que la administración

concomitante de MK-801 y MPTP a PNH, previene la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Zuddas y cols, 1992).

La deficiencia dopaminérgica induce una redistribución y un cambio en la composición y fosforilación de las subunidades proteicas del receptor NMDA (Dunha y cols, 2000). En los receptores NMDA estriatales se redistribuyen las subunidades NR1, NR2A y NR2B, desde las membranas citoplasmáticas hasta los compartimentos intracelulares, con la consecuente internalización de una parte del receptor (Dunha y cols, 2000; Loftis y Janowsky, 2003).

La fosforilación de las proteínas opera como un mecanismo regulador muy importante en el receptor NMDA (Gurd, 1997). Específicamente la fosforilación de los residuos de tirosina modula algunas propiedades del receptor como canal iónico entre ellas su probabilidad de apertura, por lo que este mecanismo participa de manera directa en el control de la transmisión sináptica mediada por Glu (Gurd, 1997; Oh y cols, 1998; Dunha y cols, 2000; Marino y cols, 2003). Se ha señalado, que el bloqueo de la transmisión glutamatérgica ejercido por el antagonista MK-801 puede estar vinculado con el efecto de este medicamento, impidiendo la activación de la unidad NR2B del receptor NMDA (Ravenscroft y Brotchie, 2000). Este mecanismo puede estar relacionado con el efecto neuroprotector del MK-801 (Marino y cols, 2003).

Aunque el St ha sido el núcleo donde se han estudiado las modificaciones descritas anteriormente, no se descarta la posibilidad de que los receptores NMDA extraestriatales experimenten cambios similares (Nash y Brotchie, 2002). Por esta razón, se ha señalado que los receptores NMDA localizados en la SNc pueden desempeñar un papel relevante en el proceso neurodegenerativo nigral en la EP (Ravenscroft y Brotchie, 2000).

En el orden quirúrgico, Piallat y cols en 1996, han señalado que la lesión del NST previa a la inyección de la neurotoxina 6-OHDA en el St de las ratas, atenúa la pérdida de cuerpos celulares dopaminérgicos en contraposición a la pérdida masiva de estos en las ratas con lesión de la SNc sin ablación quirúrgica del NST (Piallat y cols, 1996). Resultados similares publicaron Nakao y cols, los cuales señalaron una mejor supervivencia de las células dopaminérgicas en el grupo de ratas con lesión neurotóxica del NST y seguidamente inyección de la neurotoxina ácido 3-nitropropiónico, la cual interfiere con la maquinaria energética mitocondrial de las células estriatales (Nakao y cols, 1999).

Por otra parte, la lesión neurotóxica del NPP previo a la administración de MPTP a PNH produce una disminución en la discapacidad motora mostrada por los sujetos experimentales, así como una mejor supervivencia de las células dopaminérgicas nigrales (Takada y cols, 2000). Estos autores sugieren que la disminución del tono glutamatérgico sobre las células nigrales enlentece o suprime el disparo de los mecanismos neurotóxicos asociados a la inyección de la neurotoxina MPTP.

2. Neuroprotección basada en la exposición a nicotina

El uso potencial de la nicotina en experimentos encaminados a la neuroprotección se basa en la menor incidencia de la EP entre sujetos fumadores (Quick, 2004). No obstante, los resultados obtenidos en estudios epidemiológicos han sido controversiales y algunos autores señalan que la relación inversa entre el hábito de fumar y el padecimiento de la EP no alcanza significación estadística (Zhou y cols, 2003).

En estudios *in vitro* el pretratamiento con (-) nicotina protege a las células estriatales y mesencefálicas contra la neurotoxicidad inducida por Glu, e igualmente atenúa la toxicidad promovida tanto por el β -amiloide como por el etanol o la privación de factor de crecimiento de nervio (Minana y cols, 1998; Meyer y cols, 1998; Li y cols, 1999; Copeland y cols, 2005). En el mismo sentido la aplicación de (-) nicotina a cultivos primarios de células mesencefálicas los protege de los efectos neurotóxicos de la administración de MPP⁺ (Jeyarasasingam y cols, 2002).

La administración de (-) nicotina a roedores con daño de las células dopaminérgicas nigrales, origina una acción neuroprotectora similar a la descrita anteriormente (Janson y cols, 1988; Behmand y Harik, 1992).

Los mecanismos responsables de la menor incidencia de EP entre sujetos fumadores se desconocen en la actualidad. El tabaco contiene múltiples productos químicos con potencialidad para alterar los procesos biológicos por lo que se han formulado varias hipótesis que intentan explicar el aparente efecto neuroprotector del hábito de fumar sobre el sistema dopaminérgico (Quick y Kulak, 2002; Martyn y Gale, 2003). La nicotina ha sido el foco principal de estudio en esta dirección por sus efectos positivos sobre la liberación de DA, pero no se descartan otras sustancias presentes en el tabaco o metabolitos de la nicotina como la conitina que puedan mediar o potenciar la neuroprotección (Baccafusco y Terry, 2003).

Los efectos relacionados con la nicotina, tanto en modelos experimentales como en pacientes parkinsonianos, pueden ser dependientes o no de la activación de los receptores colinérgicos nicotínicos (Quick, 2004, Giniatullin y cols, 2005; Xie y cols, 2005). Entre las alternativas **no** dependientes de la activación de los receptores nicotínicos se plantea que la exposición a nicotina promueve un incremento en la expresión y liberación de FNT como del FNDG y del derivado de los fibroblastos (FNDF) (Maggio y cols, 1997). En su conjunto estas moléculas proteicas son cruciales para el mantenimiento, supervivencia y regeneración neuronal (Maggio y cols, 1997 y 1998; Roceri y cols, 2001).

De igual forma se ha señalado un incremento en la expresión de la enzima citocromo P450 en el cerebro de sujetos fumadores y de ratas tratadas con (-) nicotina (Miksys y Tyndale, 2006). Esta enzima participa en el metabolismo de varios compuestos como son drogas, carcinógenos ambientales y neurotransmisores. En este sentido, se ha postulado que el efecto neuroprotector de la

nicotina en la EP puede estar relacionado con el incremento en los niveles de citocromo P450 que contribuye a la inactivación de las toxinas (Miksys y Tyndale, 2006).

En esta misma dirección, la nicotina puede actuar como antioxidante inhibiendo el complejo I de la cadena transportadora de electrones con la consecuente reducción en la formación de ERO (Newman, 2002).

Las explicaciones alternativas del efecto neuroprotector mediado por la activación de los receptores nicotínicos toman en cuenta mecanismos pre y postsinápticos. En el orden presináptico, se ha contemplado que la nicotina modula la liberación de DA estriatal, lo cual pudiera estar involucrado en los mecanismos que subyacen al efecto beneficioso de este compuesto sobre los síntomas parkinsonianos (Zhou y cols, 2001; Turner, 2004; Quick, 2004; Pimlott y cols, 2004). La localización presináptica de los receptores colinérgicos nicotínicos en las terminales nigroestriatales los ubica en una posición privilegiada para ejercer esta modulación (Wonnacott, 1997). La activación de estos receptores por acetilcolina (ACh) promueve la entrada de Ca^{++} y Na^+ a la terminal presináptica facilitando la despolarización de la neurona y la consecuente exocitosis del neurotransmisor (Wonnacott y cols, 2002; Rowell, 2002).

En el orden postsináptico, se conoce que la actividad de los receptores nicotínicos es dependiente del flujo de Ca^{++} al interior de la neurona (Zhou y cols, 2003). Esta pudiera ser la primera etapa de una cascada de vías de señalización intracelular, en la cual participan la vía del óxido nítrico-GMPc y la expresión de mediadores de la respuesta inmune, como las interleuquinas (IL) IL1(α y β) e IL6, entre otras (Quick, 2004). La activación de estos mecanismos siguiendo la exposición a nicotina pudiera ejercer neuroprotección a través de la inhibición de la apoptosis inducida por toxinas y/o la expresión incrementada de FNT (Mai, 2003; Quick, 2004).

IV. NÚCLEO PEDUNCULOPONTINO: COMPOSICIÓN Y LOCALIZACIÓN

El NPP, comúnmente identificado como grupo de células colinérgicas Ch5, es continuo en dirección caudomedial con el núcleo tegmental dorsal lateral o Ch6 (Lee y cols, 2000).

El NPP, referido por Paxinos y Watson como núcleo pedunculopontino tegmental, contiene diversas poblaciones neuronales, neuroquímicamente diferentes. Así se ha determinado la presencia de neuronas colinérgicas que también sintetizan un neurotransmisor volátil, el óxido nítrico, en el NPP de las ratas (Mesulam y cols, 1983; Vicent y Kimura, 1992). Estas neuronas presentan árboles dendríticos extensos que se solapan con otros núcleos y se extienden hasta 300 micras fuera del NPP (Erro y Giménez-Amaya, 1999). Igualmente, se conoce la existencia de neuronas glutamatérgicas, gabaérgicas y peptidérgicas en el NPP (Vicent y cols, 1986; García-Rill, 1991; Bevan y Bolam, 1995; Ford y cols, 1995). La co-liberación de la amplia variedad de neurotransmisores que expresan las células pontinas origina complejas interacciones entre estos y las células de sus núcleos diana (Winn, 2006).

Por otra parte, en el NPP se ha encontrado una variada representación de receptores para diferentes neurotransmisores. Ellos incluyen: receptores colinérgicos (muscarínicos y nicotínicos), noradrenérgicos, serotoninérgicos, glutamatérgicos, gabaérgicos, dopaminérgicos y peptidérgicos (Klitenick y Kalivas, 1994; Forster y Blaha, 2004; Ikeda y cols, 2004). Este mosaico molecular sugiere que las neuronas del NPP están sujetas al control de diferentes sistemas de neurotransmisión (Winn, 2006).

El NPP localizado en la unión pontomesencefálica está conectado con múltiples regiones del cerebro entre ellas: la corteza cerebral, los GB, el tálamo y el tallo cerebral (García-Rill, 1991; Bevan y Bolam, 1995; Lee y cols, 2000).

Este núcleo forma una banda de neuronas que se extienden caudalmente desde el *locus coeruleus* en la región peribraquial rodeando las regiones dorsal y lateral del pedúnculo cerebeloso superior hasta el nivel de la SN en dirección más rostral (Bolam y cols, 1991; Bevan y Bolam, 1995; Semba y Fibiger, 1992). El NPP está recíprocamente unido a los GB, recibe y envía proyecciones a la SNr y núcleo entopeduncular (NEP, equivalente al GPM en PNH) así como al NST y a la SNc (Steiniger y Kretschmer, 2003; Breit y cols, 2001, 2005, 2006; Mena-Segovia y cols, 2004) (Fig. 3). Se conoce que en el NPP se origina la única proyección colinérgica que recibe la SNc, y esta a su vez presenta una amplia representación de receptores colinérgicos tanto muscarínicos como nicotínicos (Felder y cols, 2000; Lee y cols, 2000; Wilson y Dani, 2003). Los estudios inmunohistoquímicos han confirmado que los axones colinérgicos del NPP terminan en las neuronas dopaminérgicas de la SNc y del ATV, estableciendo contactos sinápticos asimétricos con las dendritas y el soma de estas neuronas (Bentivoglio y Morelli, 2005).

Al mismo tiempo el NPP está conectado con diferentes núcleos del tallo cerebral y de la formación reticular, entre ellos: los núcleos reticuloespinales (que participan en el control de la musculatura axial), los núcleos cerebelosos profundos, el núcleo de la oliva inferior, los núcleos motores de los pares craneales, y núcleos sensoriales como el del tracto solitario (Homma y cols, 2002).

Una de las funciones más importantes del NPP está relacionada con la locomoción al formar parte de la región locomotora mesencefálica (RLM), una de las zonas del tallo cerebral donde una estimulación eléctrica de muy baja amplitud induce o mejora la locomoción (García-Rill, 1991; Kobayashi y cols, 2001; Hathout y Bhidayasiri, 2005). La RLM no ha sido definida desde el punto de vista anatómico pero sí se sabe que funcionalmente comprende varios núcleos anatómicamente bien definidos, entre ellos el núcleo cuneiforme y las zonas rostral y peribraquial del NPP (García Rill, 1996). En la Fig. 3 se resumen las principales aferencias y eferencias del NPP.

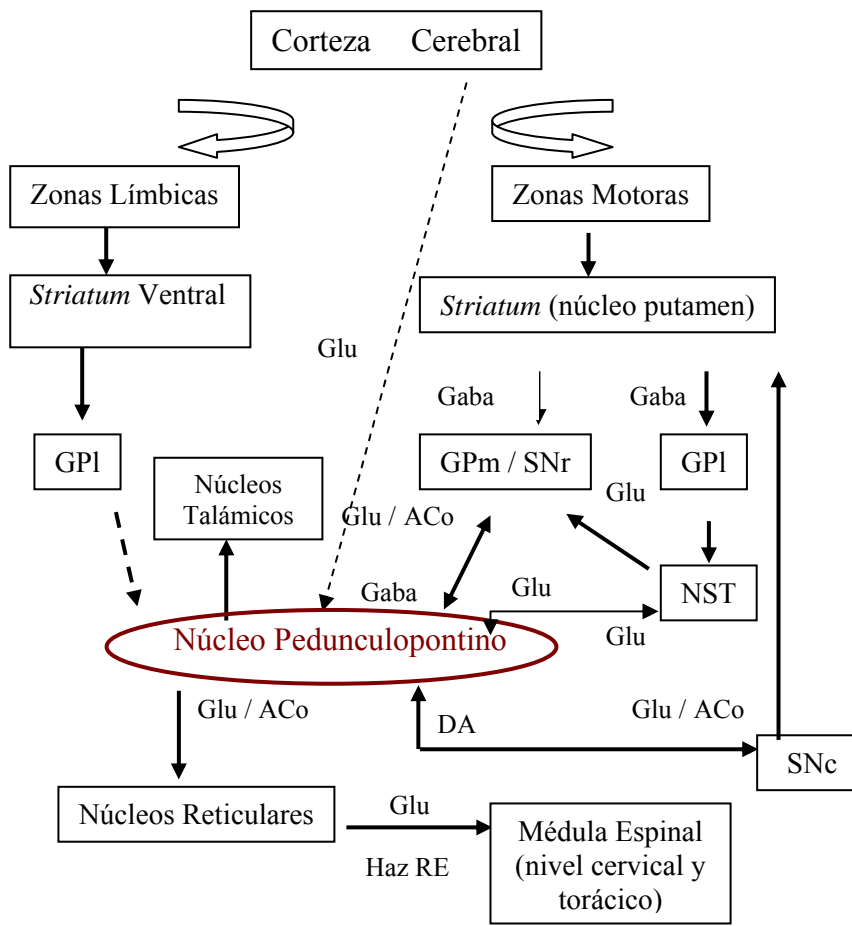


Fig. 3 Principales aferencias y eferencias del núcleo pedunculopontino con énfasis en las conexiones con los ganglios basales. **Leyenda:** GPI: globus pallidum lateral; NST: núcleo subtalámico; GPm: globus pallidum medial; SNr: substantia nigra reticulata; SNc: substantia nigra compacta; Haz RE: Haz reticuloespinal; Glu: glutamato; Gaba: ácido γ -amino butírico; DA: dopamina, ACo: acetil colina.
 ----> Proyecciones aferentes
 —> Proyecciones eferentes
 <—> Proyecciones recíprocas

Desde el punto de vista funcional, la literatura plantea dos posibles modelos (no excluyentes entre sí) para explicar el funcionamiento del NPP. El primero de ellos contempla que este núcleo constituye una estación de relevo entre la corteza cerebral y la médula espinal, actuando como un centro de control de la coordinación entre las extremidades en las tareas motoras bimanuales y en la locomoción (Erro y cols, 1999; Takakusaki y cols, 2003). El segundo modelo señala al NPP como un centro integrador que recibe impulsos excitatorios procedentes de la corteza cerebral y controla la actividad del tálamo y los GB, específicamente de las neuronas dopaminérgicas nigrales, posiblemente modulando el aprendizaje motor, los sistemas de recompensa y los movimientos voluntarios (Matsumura, 2005).

1. Participación del NPP en la fisiopatología de la EP

En relación con la participación del NPP en la fisiopatología de la EP, el conocimiento de que tanto los núcleos de salida de los GB como el NST y la SNc poseen conexiones recíprocas con el NPP, ha revolucionado un tanto el entendimiento y posiblemente el tratamiento de esta entidad (Erro y Giménez-Amaya, 1999). El modelo de las vías “directa” e “indirecta” predice que en la EP y sus modelos experimentales debe existir un incremento de las aferencias inhibitorias que alcanzan el

NPP provenientes de los núcleos de salida de los GB. Asimismo, el modelo predice un incremento de los impulsos excitatorios provenientes del NST (Mena-Segovia y cols, 2004).

El incremento de la inhibición pudiera conducir a la disminución o supresión de la actividad del NPP, lo cual debería acompañarse de un estado de hipoactividad motora si tomamos en cuenta que la estimulación del NPP facilita el movimiento. En concordancia con esta hipótesis, el bloqueo farmacológico de los impulsos inhibitorios hacia el NPP atenúa la acinesia en el modelo de parkinsonismo por administración de MPTP (Nandi y cols, 2002).

Sin embargo, las neuronas del NPP en la EP exhiben un incremento de su tasa de descarga, lo cual está relacionado con la hiperactividad subtalámica que sigue a la disminución de la actividad dopaminérgica en los GB (Breit y cols, 2001, 2005). La literatura señala que la importancia del NPP va más allá de los cambios neuropatológicos que se instalan en esta zona en la EP (Jenkinson y cols, 2005; Stefani y cols, 2007). El aspecto crucial es definir cuales células del NPP incrementan su tasa de descarga en respuesta a la hiperactividad subtalámica y cuales grupos celulares disminuyen su tasa de descarga en respuesta a la actividad inhibitoria gabaérgica de los núcleos de salida de los GB. La respuesta a estas interrogantes abrirá las puertas a nuevas estrategias terapéuticas que involucren los ajustes en el funcionamiento de esta estructura (Hamani y Lozano, 2003; Mena-Segovia y cols, 2004; Jenkinson y cols, 2005).

Una hipótesis muy reciente señala que el proceso degenerativo en la EP no comienza en la SNc (Braak y cols, 2004). En los estadios presintomáticos muy tempranos el proceso neurodegenerativo está confinado a la médula oblongada, al tegmento mesopontino y a las estructuras olfatorias anteriores. En las etapas francamente sintomáticas los cambios patológicos alcanzan el cerebro medio y basal con énfasis en la muerte progresiva de las células dopaminérgicas de la SNc. Finalmente, en las etapas más avanzadas los procesos patológicos pueden ser observados en áreas corticales de asociación (Braak y cols, 2004, 2006). Sin dudas, estos conceptos enfatizan en una fase premotora inicial que comienza en áreas no dopaminérgicas del cerebro donde el NPP parece jugar un papel determinante (Muller y cols, 2006).

Si bien los cambios en la actividad eléctrica del NPP en el modelo de 6-OHDA han sido ya estudiados (Breit y cols, 2001), las alteraciones en las concentraciones extracelulares de Glu y GABA y el proceso de muerte celular no han sido abordadas en igual extensión.

V. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES Y DENSIDAD DE RECEPTORES EN LOS GB

1. Estudios de liberación de neurotransmisores

El principio de la técnica de microdiálisis cerebral fue concebido por primera vez en 1974 por Ungerstedt y Pycock al observar a través de un microscopio de fluorescencia que la DA radiactiva

difundía de las terminales nerviosas a los vasos sanguíneos cercanos (Ungerstedt y Pycock, 1974). Estos investigadores implantaron entonces fibras de diálisis que funcionaban como vasos sanguíneos a través de los cuales se recuperaban neurotransmisores del espacio extracelular.

Estos hallazgos abrieron paso al desarrollo de los métodos de diálisis cerebral consistente en: un sistema cerrado en el que un fino tubo de diálisis es insertado a través del cerebro y se produce la transferencia pasiva de sustancias, en virtud de un gradiente de concentración entre el fluido de perfusión y el medio extracelular (Ungerstedt, 1984, 1991).

Esta técnica permite estudiar los mecanismos de liberación de neurotransmisores endógenos en el Sistema Nervioso Central, así como el efecto de la administración de diferentes compuestos activos, a partir de las concentraciones extracelulares de dichos neurotransmisores y sus metabolitos (Parson y Justice, 1994). Una de sus ventajas más importantes es que puede emplearse indistintamente en animales anestesiados o despiertos, lo cual ofrece la posibilidad de correlacionar los hallazgos neuroquímicos con las observaciones conductuales (Lunte y Scott, 1992).

El St ha sido el núcleo más estudiado con esta técnica en los modelos experimentales de la EP, debido a su posición clave como centro integrador tanto de las señales dopaminérgicas nigroestriatales como de las aferencias corticales glutamatérgicas (Nissbrandt y Carlsoon, 1996; Sarre y cols, 1996, 1998).

La liberación de Glu y GABA ha sido menos abordada que la liberación de DA, lo cual, a nuestro juicio, responde a que la disfunción de estos sistemas de neurotransmisión se considera secundaria a la disfunción dopaminérgica. Sólo en la última década, con el advenimiento de las técnicas de estimulación de alta frecuencia del NST, se ha promovido el estudio de la liberación de estos aminoácidos neurotransmisores en un intento por dilucidar los mecanismos que pueden explicar la mejoría asociada a este tipo de tratamiento (Windels y cols, 2003).

2. Estudios de receptores

En los GB existe una amplia representación de la mayoría de los sistemas de neurotransmisores y neuromoduladores descritos en la actualidad (McGeer y McGeer, 1993). En consonancia, existe también un mosaico de receptores cuya expresión, densidad y otras propiedades está modulada por la actividad de sus propios ligandos endógenos y en muchos casos por la actividad de más de un neurotransmisor (Gerfen, 1992). Los receptores constituyen el blanco principal de las estrategias terapéuticas farmacológicas, por lo que su estudio es de importancia primordial (McGeer y McGeer, 1993). En este sentido, las técnicas de autorradiografía y las de biología molecular han permitido estudiar la distribución y localización de diferentes poblaciones de receptores en los GB (Mizukawa y cols, 1993).

Se han identificado cinco subtipos diferentes de receptores colinérgicos muscarínicos, todos metabotrópicos (M₁-M₅). Los subtipos M₁, M₃ y M₅ están acoplados a una proteína G_q que activa el

sistema de la fosfolipasa y moviliza el Ca^{++} intracelular (Caufield y Birdsall, 1998; Zhou y cols, 2003). Los subtipos M_2 y M_4 se encuentran acoplados a una proteína $G_{i/o}$ que inhibe a la adenilato ciclasa, reduce la formación de AMPc y bloquea la actividad de los canales de calcio operados por voltaje e involucrados en la liberación de los neurotransmisores (Felder y cols, 2000). La SNc posee una vasta representación de receptores colinérgicos (Felder y cols, 2000). Se conoce que la ACo actúa en sus receptores talámicos y nigrales produciendo una excitación rápida mediada por receptores nicotínicos, seguida de una despolarización lenta mediada por receptores muscarínicos (Winn, 2006). Por su parte, los receptores opioides son receptores de membrana constituidos por proteínas heptahelicadas cuya activación está acoplada a una subfamilia de la proteína G (Gilman, 1987; Akil y cols, 1998). Los receptores *mu* y *delta* aunque pueden expresarse independientemente uno del otro, es frecuente encontrarlos formando heterodímeros (Levac y cols, 2002; Agnati y cols, 2003). El papel funcional de la oligomerización parece estar relacionado con la amplificación de la señal, ya que la activación de un número limitado de receptores puede disparar la activación de otros receptores asociados (Levac y cols, 2002).

La interacción de los péptidos opioides con sus respectivos receptores modula diferentes procesos como: la respiración mitocondrial, la síntesis de mediadores de la respuesta inmune y la vía del dolor (Liu y Hong, 2003; Samadi y cols, 2003). Igualmente, se ha señalado que ellos no causan por sí mismos cambios en el potencial de membrana de la neurona postsináptica, sino que potencian la capacidad de otros neurotransmisores para alterar la excitabilidad neuronal, lo que refuerza su papel como neuromoduladores (Alonso-Solis, 1992).

En lo que respecta al sitio benzodiazepínico (BDZ), se conoce que este es uno de los cinco dominios que forman el receptor GABA_A , junto a los sitios barbiturato, picrotoxina, esteroides y el canal a cloruro (Sigel y Buhr, 1997). El sitio BDZ constituye el sitio de unión del ligando [^3H] Flunitrazepam, por lo que el uso de este isótopo en técnicas de autorradiografía permite marcar al receptor GABA_A (Olsen y De Lorey, 1999).

La disminución del tono dopaminérgico en los GB en la condición parkinsoniana acarrea un desbalance significativo que alcanza a diferentes neurotransmisores (Chase y Justin, 2000). Se conoce que en el modelo de 6-OHDA, las actividades colinérgica, gabaérgica y peptidérgica se modifican sustancialmente (Samadi y cols, 2003; Cannizaro y cols, 2003; González-Hernández y cols, 2004). Sin embargo, hasta el momento, la mayoría de los estudios han abordado los cambios en las concentraciones tisulares y extracelulares de los neurotransmisores; mientras que los cambios que experimentan las poblaciones de receptores han sido menos estudiados (Höglund y cols, 2000). Excepcionalmente, los receptores dopaminérgicos estriatales y nigrales han sido extensamente estudiados (Hurley y Jenner, 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

I. DISEÑO METODOLÓGICO

Para dar cumplimiento a los objetivos específicos propuestos se organizaron un total de 12 tareas que se detallan a continuación:

Objetivo Específico 1. Determinar las concentraciones extracelulares de Glu y GABA, la densidad de receptores colinérgicos muscarínicos, gabaérgicos BDZ y μ opioides, así como el proceso de muerte celular en el NPP de ratas hemiparkinsonizadas.

Tarea 1.1 Evaluación del efecto de la lesión neurotóxica de la SNc sobre las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP.

Tarea 1.2 Determinación del efecto de la lesión neurotóxica de la SNc sobre la densidad de receptores: colinérgicos muscarínicos en el NPP y en el St, y gabaérgicos BDZ y μ opioides en el NPP.

Tarea 1.3 Evaluación del efecto de la lesión neurotóxica de la SNc sobre la fragmentación del ADN en el NPP.

Grupos Experimentales

- a) Ratas sanas (n=13)
- b) Ratas con lesión unilateral completa de la SNc por inyección de la neurotoxina 6-OHDA (n=11)
- c) Ratas con falsa lesión de la SNc por inyección de solución salina fisiológica (SSF) (n=10)

Objetivo Específico 2. Evaluar el efecto del tratamiento sistémico con MK-801 sobre los trastornos motores, las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP y la presencia de células dopaminérgicas en la SNc de ratas hemiparkinsonizadas.

Tarea 2.1 Determinación del efecto de la aplicación sistémica de MK-801, sobre la coordinación motora y la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina en ratas hemiparkinsonizadas.

Tarea 2.2 Evaluación del efecto de la aplicación sistémica de MK-801, sobre las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP de ratas hemiparkinsonizadas.

Tarea 2.3 Evaluación del efecto de la aplicación sistémica de MK-801, sobre la presencia de células dopaminérgicas en la SNc de ratas hemiparkinsonizadas.

Grupos Experimentales

- a) Ratas con inyección de la neurotoxina 6-OHDA en la SNc (n=15)
- b) Ratas tratadas sistémicamente con MK-801 e inyectadas con 6-OHDA en la SNc (n=17)
- c) Ratas con inyección de SSF en la SNc (n=10)
- d) Ratas tratadas sistémicamente con SSF e inyectadas con 6-OHDA en la SNc (n=10)
- e) Ratas sanas (n=22)

Objetivo Específico 3. Evaluar el efecto del tratamiento sistémico con (-) nicotina sobre los trastornos motores, las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP, la expresión estriatal de distintos factores neurotróficos y la presencia de células dopaminérgicas en la SNc de ratas hemiparkinsonizadas.

Tarea 3.1 Estudio del efecto de la aplicación sistémica de (-) nicotina, sobre la coordinación motora y la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina en ratas hemiparkinsonizadas.

Tarea 3.2 Evaluación del efecto de la aplicación sistémica de (-) nicotina, sobre las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP de ratas hemiparkinsonizadas.

Tarea 3.3 Evaluación del efecto de la aplicación sistémica de (-) nicotina, sobre la presencia de células dopaminérgicas en la SNc en ratas hemiparkinsonizadas.

Tarea 3.4 Determinación del efecto de la aplicación sistémica de (-) nicotina, en la expresión estriatal del FNDC y del FNDG de ratas hemiparkinsonizadas.

Grupos Experimentales

- a) Ratas con inyección de la neurotoxina 6-OHDA en la SNc (n=10)
- b) Ratas tratadas sistémicamente con (-) nicotina e inyectadas con 6-OHDA en la SNc (n=18)
- c) Ratas con inyección de SSF en la SNc (n=10)
- d) Ratas tratadas sistémicamente con SSF e inyectadas con 6-OHDA en la SNc (n=10)
- e) Ratas sanas (n=11)

Objetivo Específico 4. Evaluar el efecto de la lesión del NST y la infusión intracerebral de MK-801 sobre las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP de ratas previamente hemiparkinsonizadas por inyección de 6-OHDA en la SNc.

Tarea 4.1 Estudio del efecto de la lesión excitotóxica del NST sobre la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina y las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP.

Grupos Experimentales

- a) Ratas con lesión unilateral completa de la SNc por inyección de la neurotoxina 6-OHDA (n=11)
- b) Ratas con lesión unilateral completa de la SNc (por inyección de 6-OHDA) y el NST (por inyección de ácido quinolínico) (n=9)
- c) Ratas con falsa lesión de la SNc por inyección de SSF (n=10)
- d) Ratas con falsa lesión de la SNc y el NST (n=5)
- e) Ratas sanas (n=13)

Tarea 4.2 Determinación del efecto de la infusión intracerebral de MK-801 en el NPP de ratas con lesión de la SNc, sobre las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en este núcleo.

Grupos Experimentales

- a) Ratas sanas con infusión de MK-801 en el NPP (n=10)
- b) Ratas con lesión unilateral completa de la SNc por inyección de la neurotoxina 6-OHDA e infusión de MK-801 en el NPP (n=9)
- c) Ratas con falsa lesión de la SNc por inyección de SSF e infusión de MK-801 en el NPP (n=9)

La fig. 4 resume el diseño experimental propuesto en la tesis.

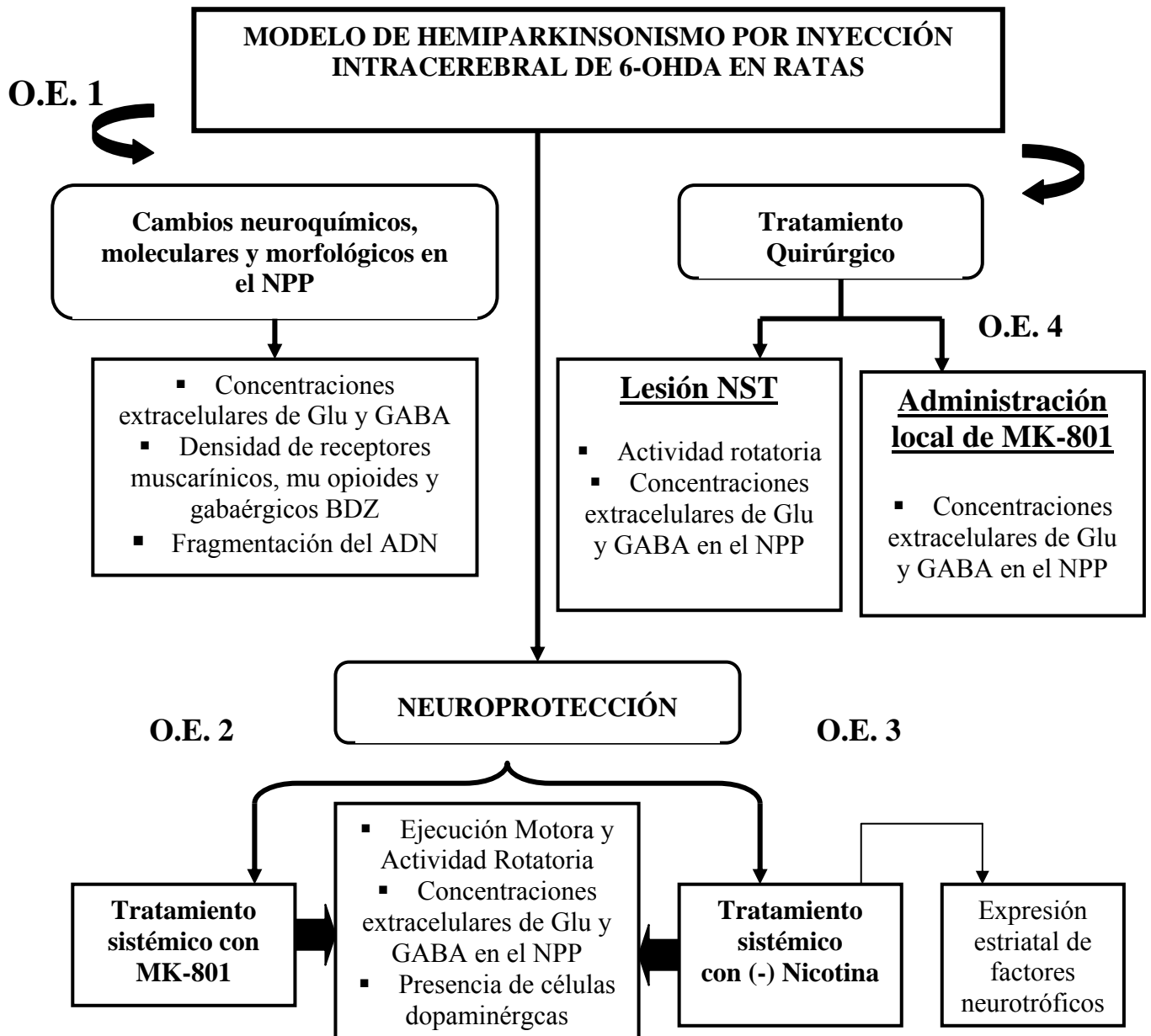


Fig. 4 Síntesis del diseño experimental propuesto en la tesis. OE: Objetivo Específico.

II. SUJETOS EXPERIMENTALES

Se utilizaron ratas Wistar machos adultos entre 200-250 g de peso al inicio de cada experimento, las cuales fueron colocadas en grupos de cinco por caja y una vez implantadas las cánulas guías, fueron individualizadas. Se mantuvieron todo el tiempo bajo condiciones de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) y humedad (70%) constantes, ciclos de luz y oscuridad de 12 h, así como suministro de agua y alimentos *ad libitum*. Se emplearon 300 ratas para cumplimentar los objetivos propuestos.

1. Consideraciones Éticas

Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las normas establecidas en: “Guía para el cuidado, uso y reproducción de los animales de experimentación en el Centro para la Producción de Animales de Laboratorio, CENPALAB, Cuba”. Igualmente fueron observadas las normas para el uso y manejo de animales de experimentación aprobadas en el Manual de Procedimientos del Vivario del CIREN.

Se garantizó la autenticidad genética de los animales. Durante el tiempo que duró el estudio, los animales tuvieron condiciones óptimas de alojamiento que también cumplía con los principios éticos establecidos. Para garantizar el bienestar de los animales se controlaron factores externos como los ruidos, el encamado, la ventilación y la humedad relativa.

Asimismo, en el curso de la investigación los animales fueron manipulados y atendidos por personal calificado.

Criterios de Inclusión

- En el caso de los sujetos experimentales con lesión unilateral completa de la SNc por inyección de 6-OHDA, fueron utilizados aquellos sujetos que mostraron al menos 630 giros completos en 90 min (siete giros/minuto) bajo el efecto de la inyección intraperitoneal (i.p) de D-anfetamina (5 mg/kg de peso).
- Para el caso de los sujetos experimentales inyectados con 6-OHDA en la SNc tratados o no farmacológicamente (correspondientes a los objetivos específicos 2 y 3), se aceptaron aquellos sujetos que mostraron al final del experimento, una adecuada localización de la inyección de la neurotoxina 6-OHDA. Esta evaluación se realizó por medio de técnicas morfológicas.

Criterios de Exclusión

- Aquellos sujetos pertenecientes a cualquiera de los grupos experimentales que mostraron en algún momento infecciones severas, lesiones en los ojos que les dificultaran la visión o algún indicio de lesión vestibular secundaria a la colocación de la rata en el marco de cirugía estereotáctica.
- Los sujetos en los cuales se encontró una localización errónea de la cánula de microdiálisis cerebral o restos de sangre en la trayectoria seguida por la cánula de microdiálisis o la aguja de inyección.

III. MATERIALES Y REACTIVOS

1. Cánulas de Microdiálisis Cerebral

Para el estudio de las concentraciones extracelulares de aminoácidos neurotransmisores se asimiló la tecnología de construcción de cánulas de microdiálisis cerebral a partir de tubos de acero (diámetro externo 0.22 mm, diámetro interno 0.12 mm) (Small Parts, Nueva York, EUA), fibras de vidrio (Polymicro Technology, Nueva York, EUA), resinas epóxicas (Cianocrilato adhesivo, Plastics Metal, Tokio, Japón) y membrana de diálisis de poliacrilonitrilo con un poro de 41 KDa (Hospal Industrie Meyzie, Lyon, Francia).

En la figura 5 se muestra el ensamblaje de cada una de las piezas que constituyen la cánula y el proceso de montaje desde el inicio, hasta que la cánula queda lista para su uso en experimentos *in vivo*.

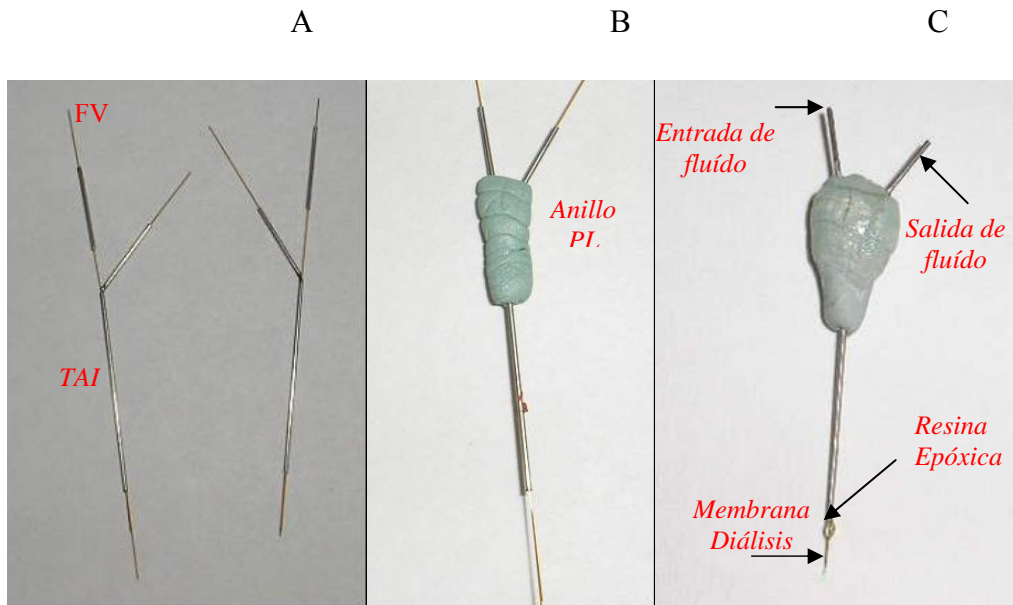


Fig. 5 Secuencia de los pasos más importantes seguidos para la construcción de las cánulas de microdiálisis cerebral. A. Ensamblaje entre los segmentos de tubo de acero y los de fibras de vidrio. B. Pequeño anillo de Plasti-Loka que recubre el punto de ensamblaje entre los tubos y las fibras. C. Cánula lista para usarse en experimentos “in vivo”. Obsérvese el pequeño aro de resina epóxica que sella la membrana de diálisis en su parte más distal y en el punto de empate con el tubo de acero y la fibra de vidrio. TAI: Tubo de acero inoxidable, FV: Fibra de vidrio, Anillo PL: Anillo de Plasti-Loka.

2. Reactivos

En todos los estudios se empleó agua desionizada (conductividad < 1.0 μS) y destilada.

La Tabla No. 2 muestra los reactivos utilizados y su procedencia.

Tabla 2. Datos de los reactivos utilizados, firma, ciudad y país de procedencia en los que fueron adquiridos.

Reactivo	Firma que lo comercializa	Ciudad	País
³ [H] Flunitracepan	Sigma	St. Louis, MO	EUA
³ [H] Quinuclidinylbenzilato (QNB)	Sigma	St. Louis, MO	EUA
6-hidroxidopamina	Sigma	St. Louis, MO	EUA
Acido acético	BDH	Poole	Gran Bretaña
Acido ascórbico	BDH	Poole	Gran Bretaña
Acido quinolínico	Sigma	St. Louis, MO	EUA
Anti-β Actina	CINVESTAV	DF México	México
Anti-tirosina hidroxilasa	Dako	California	EUA
Anticuerpo de carnero fluoresceinado	Roche Molecular Biochemical	Berlin	Alemania
Anticuerpo Irio para FNDC	Santa Cruz Biotechnology	California	EUA
Anticuerpo Irio para FNDG	Santa Cruz Biotechnology	California	EUA
Anti conejo conjugado con peroxidasa	Santa Cruz Biotechnology	California	EUA
Atropina	Sigma	St. Louis, MO	EUA
CaCl ₂	BDH	Poole	Gran Bretaña
Complejo Streptavidina-biotina-peroxidasa (ABC-HRP)	Dako	California	EUA
D-anfetamina	IMEFA	C. Habana	Cuba
DANGO	Sigma	St. Louis, MO	EUA
Diaminobenzidina (DAB)	Dako	California	EUA
Hidrato de cloral	Merck	Darmstadt	Alemania
Ioduro de propidio	Sigma	St. Louis, MO	EUA
Isopentano	BDH	Poole	Gran Bretaña
KCl	Merck	Darmstadt	Alemania
Medio de Montaje Eukit	Panreac	Barcelona	España
Metanol	BDH	Poole	Gran Bretaña
MgCl ₂ .6H ₂ O	BDH	Poole	Gran Bretaña
MK-801	Sigma	St. Louis, MO	EUA
Na ₂ HPO ₄	BDH	Poole	Gran Bretaña
NaCl	Merck	Darmstadt	Alemania
NaH ₂ PO ₄	Merck	Darmstadt	Alemania
Naloxone	Sigma	St. Louis, MO	EUA
(-) Nicotina	Sigma	St. Louis, MO	EUA
o-ftaldialdehído (OPA)	Sigma	St. Louis, MO	EUA
Revelador Kodak D-11	Kodak	California	EUA
TriPure	Roche Molecular Biochemical	Berlin	Alemania
Solución Salina Fisiológica NaCl 0.9%	IMEFA	C. Habana	Cuba

IV. MÉTODOS Y TÉCNICAS

1. Método de Lesión de la SNc y del NST

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron en un salón de cirugía experimental que contaba con las condiciones de esterilidad, iluminación y temperatura adecuadas. En cada sesión de cirugía se trabajó con un instrumental quirúrgico limpio y estéril de acuerdo a las normas de calidad que rigen el manual de procedimientos de nuestra institución.

Las ratas se anestesiaron con hidrato de cloral (420 mg/kg de peso i.p) y se colocaron en un marco de cirugía estereotáctica para roedores (David Kopf Instruments, Tujunga, EUA). Las soluciones que contenían las neurotoxinas utilizadas en cada caso se inyectaron en el hemisferio derecho. Se empleó una jeringuilla Hamilton de 5µL, cuya aguja se mantuvo en la coordenada ventral hasta 5 min después de finalizada la inyección en todos los casos. Se utilizaron dos neurotoxinas: 6-OHDA y ácido quinolínico. El volumen y la concentración empleados, las coordenadas de lesión (Paxinos y Watson, 1998), así como los flujos a los que se inyectaron las toxinas se muestran en la Tabla No. 3.

La lesión del NST fue practicada 45 días después de la lesión de la SNc.

Tabla 3 Detalles técnicos de la cirugía estereotáctica practicada en cada estructura para su lesión neurotóxica. SSF: Solución Salina Fisiológica, AP: Anteroposterior, ML: Medio Lateral, DV: Dorsoventral

Neurotoxina	Estructura	Volumen Cantidad / Concentración Flujo de Inyección	Coordenadas de inyección (mm) Respecto a Bregma
6-hidroxidopamina	<i>Substantia nigra compacta</i>	3 µL 8 µg/3µL SSF + 0.5 mg/mL ácido ascórbico 1 µL/min	AP:-4.4; ML:1.2; DV:7.8 Barra de incisivos: 2.4
Acido Quinolínico	Núcleo subtalámico	0.6µL 100 nmol/L 0.2 µL/min	AP:-3.80; ML:2.4; DV:8.00; Barra de incisivos: 2.4

Los grupos de ratas control con falsa lesión se conformaron por medio de la inyección de SSF con iguales condiciones técnicas y en las mismas coordenadas.

2. Evaluación Conductual

Las evaluaciones conductuales se realizaron en locales que cumplen con las buenas prácticas de laboratorio, poseen temperatura y humedad controlada así como condiciones de silencio e higiene adecuadas a estos fines.

2.1 Evaluación de la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina

Un mes después de la inyección de 6-OHDA se estudió la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina (5 mg/kg i.p). Se determinó el número de vueltas completas (360°) ipsilaterales al hemisferio lesionado, en un tiempo de 90 min con el empleo de un Multicontador Electrónico LE

3806 acoplado a sensores LE 902 (PanLAB, Barcelona, España) que determinaban el sentido de giro. Se consideraron bien lesionados los animales que mostraron como mínimo, siete giros por minuto.

En el caso de las ratas con lesión unilateral completa de la SNc y lesión excitotóxica del NST (O.E. 4), el estudio de la actividad rotatoria se repitió una semana después de la lesión del núcleo.

2.2 Exploración de la coordinación motora a través de la Prueba de los Puentes Transversales

La evaluación se realizó por parte de dos observadores entrenados en la valoración de este paradigma conductual. Se siguió en todos los casos la observación directa y el tiempo fue cuantificado por medio de un cronómetro Han-Hart (Dresden, Alemania).

Las ratas se colocaron en un punto medio situado en un puente entre dos plataformas de escape a una altura de 60 cm de una superficie de apoyo y se les permitió dirigirse libremente a cualquiera de las dos plataformas (Fig. 6A). Cada ensayo tuvo una duración de 60 s y se cuantificó el tiempo que demoraba el animal en alcanzar una de las dos plataformas extremas (latencia de escape). Si en el transcurso del ensayo, la rata no alcanzaba una de las plataformas o no caía del puente, se otorgaba el valor máximo de latencia para el ensayo (60 s). Se cuantificó igualmente el tiempo que demoraba la rata en caer del puente (latencia de caída) en caso de que no alcanzara ninguna de las dos plataformas y cayera antes de cumplirse los 60 s del ensayo. Simultáneamente se cuantificaron los errores cometidos por las ratas desde que se inicia el ensayo hasta que alcanzan la plataforma o caen del puente. Se consideró error todo intento infructuoso de sujeción con las extremidades o con la cola, o de mantenimiento del equilibrio, así como la caída del puente antes de cumplirse los 60 s del ensayo. Se utilizaron puentes de sección rectangular y circular de 60 cm de longitud que se colocaron en el siguiente orden: rectangular grande (2.5 cm de ancho), circular grande (2.5 cm de diámetro), rectangular pequeño (1 cm de ancho) y circular pequeño (1 cm de diámetro), aumentando paulatinamente la dificultad de la prueba (Fig. 6B). El estudio se realizó en dos días consecutivos, tres ensayos cada día. Como latencia de escape y de caída se tomó el valor promedio de los seis ensayos.

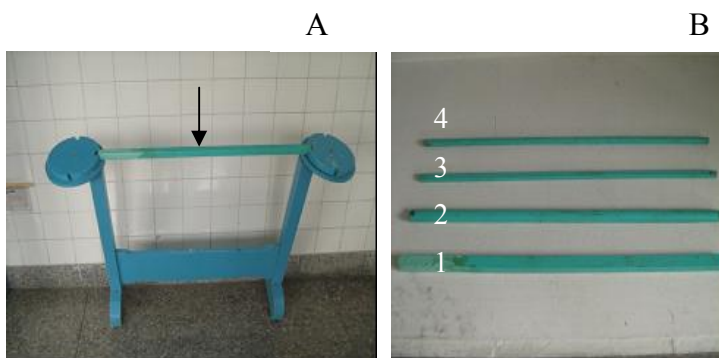


Fig. 6 Aditamentos utilizados para la exploración de la coordinación motora en la prueba de los puentes transversales. A. Muestra las dos plataformas de escape unidas a través de un puente en cuyo punto medio (señalada con una flecha) se sitúa a la rata. B. Puentes transversales: 1. Puente de sección rectangular grande, 2. Puente de sección circular grande (2.5 cm de ancho y diámetro respectivamente), 3. Puente de sección rectangular pequeño, 4. Puente de sección circular pequeño (1 cm de ancho y diámetro respectivamente).

3. Esquema de administración sistémica de MK-801 y (-) nicotina

Los fármacos se disolvieron en SSF al 0.9%.

MK-801: las ratas recibieron tres inyecciones i.p de MK-801 (0.5 mg/kg de peso) en tres días consecutivos (1 dosis / día) administrándose la tercera dosis exactamente antes de realizar la cirugía para inyectar la solución de la 6-OHDA. Este esquema de administración se repitió en tres días igualmente consecutivos, a partir de los 14 y de los 21 días de la inyección de la neurotoxina 6-OHDA.

(-) Nicotina: las ratas recibieron tres inyecciones subcutáneas (s.c) de (-) nicotina (1mg/kg de peso), una cada 30 min y finalizada la tercera aplicación se realizó la inyección de la solución de la 6-OHDA en las coordenadas de SNc. Este esquema de administración se repitió a los 7, 14 y 21 días de la inyección intracerebral de la neurotoxina 6-OHDA.

Las ratas controles recibieron los esquemas de tratamiento descritos en cada caso pero en lugar del principio activo, se administró el mismo volumen de SSF.

4. Evaluación de las concentraciones extracelulares de Glu y GABA

4.1 Método de implante de cánula guía para uso de microdiálisis cerebral

Dos semanas después de concluidos los estudios conductuales se realizó el implante de la cánula guía. Las ratas fueron anestesiadas con hidrato de cloral (420 mg/kg de peso i.p) y se colocaron en un marco de cirugía estereotáctica para roedores (David Kopf Instruments, EUA). Se practicó una pequeña incisión en la piel y después de retirar el tejido subcutáneo se colocaron dos pequeños tornillos (*CMA Microdialysis*, Estocolmo, Suecia) a manera de ancla de las cánulas guías. Estos tornillos se situaron siempre por delante de Bregma en zonas que no constituían objeto de estudio.

A continuación fue horadado un pequeño trépano en las coordenadas anteroposterior y lateral correspondientes al NPP derecho (Tabla 4) y se colocó una cánula guía (Plastic One, Ranaoke, EUA) cuyo orificio externo quedó perfectamente cubierto por un estilete protector. La cánula guía y los tornillos se fijaron al cráneo utilizando cemento-acrílico dental.

Tabla 4 Coordenadas de implante de la cánula guía para uso en la técnica de microdiálisis cerebral.

AP: Anteroposterior; ML: Medio Lateral; DV: Dorsoventral.

Estructura	Coordenadas de implante de cánula guía (mm). (Tomadas con respecto a Bregma)
Núcleo pedunculopontino	AP:-8.00; ML:2.00; DV:5.40

4.2 Microdiálisis in vivo, estudio de las concentraciones extracelulares de los neurotransmisores

Los experimentos de microdiálisis cerebral se realizaron 24 h después de concluida la cirugía del

implante de la cánula guía. Inicialmente, fue retirado el estilete que cubría el orificio de la cánula guía y se introdujo cuidadosamente la cánula de microdiálisis cerebral. A continuación, las ratas fueron colocadas en tanques de 50 cm de diámetro, que cuentan con un brazo metálico que permite asegurar el sistema de infusión / recolección de las muestras. Seguidamente, los extremos de entrada y salida de fluido de la cánula (ver fig. 5C) fueron acoplados mediante mangueras de teflón (0.65 mm de diámetro externo X 0.12 mm de diámetro interno) por un lado a un sistema de bomba de infusión (*CMA 100, CMA Microdialysis*, Estocolmo, Suecia) y por el otro a un vial Eppendorf (Fig. 7). Las cánulas fueron infundidas continuamente con una solución de líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa): 125 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L NaH₂PO₄, 5 mmol/L Na₂HPO₄, 1 mmol/L MgCl₂·6H₂O, 1.2 mmol/L CaCl₂, 1.2 mmol/L ácido ascórbico, pH 7.4 -7.6 a un flujo de 2 µL/min.

La colecta de los dializados se realizó de forma manual 1 h después de iniciada la infusión de las cánulas. Se tomaron seis dializados basales (1 cada 20 min) al término de los cuales, se cambió el fluido de infusión de la cánula implantada, por una solución de continuación que contenía una solución de MK-801 (10 µmol/L) o LCR con mayor concentración de KCl. Las muestras fueron inmediatamente congeladas a -80°C hasta su posterior análisis. Todos los experimentos se realizaron con las ratas despiertas (Fig. 7).



Fig. 7 Rata despierta con la cánula de microdiálisis cerebral implantada en las coordenadas correspondientes al núcleo pedunculopontino. La entrada y salida de fluido de la cánula están conectadas al sistema infusión / recolección de muestras.

Una vez finalizada la toma de muestra para la cuantificación de las concentraciones extracelulares de los aminoácidos en condiciones basales, se procedió a cambiar el fluido de infusión de la cánula por una solución que en dependencia del experimento contenía: LCRa con mayor concentración de KCl (100 mmol/L) y menor concentración de NaCl (43.4 mmol/L) (O.E. 1) o una solución de MK-801

(10 $\mu\text{mol/L}$) (O.E. 4, Tarea 4.2). El MK-801 fue disuelto en la solución de LCRa utilizada en la perfusión.

La infusión de una solución de LCRa con mayor concentración de KCl se realizó de manera comprobatoria con el propósito de evaluar la integridad de los mecanismos de liberación de neurotransmisores al final de cada experimento dentro de la [tarea 1.1](#).

Tanto la solución de LCRa con mayor concentración de KCl como el MK-801 fueron perfundidos por espacio de 1 h y se tomaron dializados cada 20 min. Al término de este tiempo, se restableció la perfusión de la cánula con la solución de LCRa inicial, lo cual tuvo una duración de 2 h y se tomaron igualmente dializados cada 20 min.

5. Evaluación Bioquímica. Cuantificación de los aminoácidos

Todas las soluciones utilizadas, tanto para administración intracerebral (LCRa) o para inyección en el sistema de cromatografía, fueron filtradas con un filtro de membrana de 0.2 μM (Sartorius, Gottingen, Alemania).

Las concentraciones de aminoácidos en los dializados fueron determinadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés, *High Performance Liquid Chromatography*) acoplado a un detector de fluorescencia y usándose derivatización con o-ftaldialdehído (OPA).

Se mezclaron 10 μL de muestra con 10 μL del agente derivatizante OPA (10 mmol/L de OPA disueltos en tampón de tetraborato de sodio 0.1 mol/L con 77 mmol/L de ácido 3-mercaptopropiónico y metanol al 10% pH 9.3). La mezcla se agitó en vórtex durante 15 s y la reacción se detuvo con ácido acético al 5% a los 45 s. De esta mezcla se inyectaron 20 μL al cromatógrafo con una jeringuilla Hamilton. Los aminoácidos derivatizados se hicieron pasar por una columna de fase inversa (HR-80, de 8 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, ESA), con una precolumna de fase estacionaria similar, mediante una bomba cromatográfica isocrática (Phillips PU 4100) y se detectaron mediante un detector de fluorescencia con λ excitación = 340 nm y λ emisión = 460 nm (Phillips PU 4027). El registro de los cromatogramas se realizó mediante el programa CHROMATEPC versión 4.24 (Phillips). Para la separación de los aminoácidos se utilizó una fase móvil compuesta por NaH_2PO_4 0.1 mol/L y metanol al 20%. Cada muestra fue analizada por duplicado.

6. Evaluación de la densidad de poblaciones de receptores en St y NPP

6.1 Obtención del tejido: al concluir los estudios de liberación de neurotransmisores, las ratas fueron anestesiadas con una dosis mayor de hidrato de cloral (480 mg/kg i.p) y sacrificadas por decapitación. Los cerebros fueron extraídos y congelados en hielo seco inmediatamente. A continuación se guardaron a -80°C hasta el momento de ser rebanados.

Para los estudios de autorradiografía, se rebanaron los cerebros en un criostato Leitz (Berlin,

Alemania). Para el NPP, se obtuvieron series de seis cortes coronales (20 μm) tomados cada uno de ellos cada 240 micras a partir de la coordenada AP:-7.3 mm y hasta la coordenada AP:-8.8mm. Una muestra de la zona de lectura de la DO se muestra en la Fig. 8A. Igualmente para el St, se obtuvieron series de seis cortes coronales (20 μm) tomados cada 500 micras a partir de la coordenada AP:+2.7 mm hasta la coordenada AP:-0.40 mm. Una muestra de la zona de lectura de la DO se muestra en la Fig. 8B. En todos los casos las coordenadas fueron referentes a Bregma. Este diseño de corte permitió panear completamente el NPP y la región anterior del St en sentido rostrocaudal.

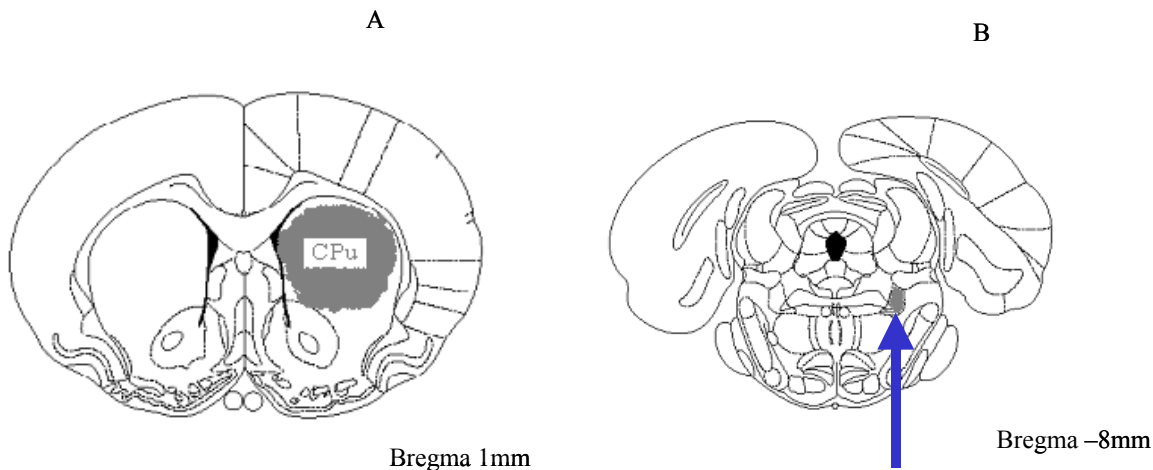


Fig. 8 Representación esquemática de las estructuras donde se estudió la densidad de receptores. A. Corte coronal del *striatum* (St) a nivel de la coordenada AP: +1 mm (referente a Bregma). La zona sombreada en gris representa la región del St donde se realizó la determinación de la densidad óptica. B. Corte coronal del núcleo pedunculopontino (NPP) a nivel de la coordenada AP:-8 mm (referente a Bregma). La flecha señala la región del NPP donde se realizó la determinación de la densidad óptica. CPu: núcleo caudado putamen.

6.2 Técnica de autorradiografía para receptores muscarínicos, BDZ y mu opioides

La densidad de receptores muscarínicos, gabaérgicos benzodiazepínicos y mu opioides en el NPP y St fue evaluada por autorradiografía sobre secciones coronales provenientes de ratas sanas (n=9), con lesión unilateral completa de la SNc por inyección de 6-OHDA (n=7) y con falsa lesión de la SNc por inyección de SSF (n=5).

- **Receptores muscarínicos:** las secciones cerebrales se incubaron durante 2 h a 22 °C en una solución conteniendo 1.23 nmol/L de [3H]Quinuclidinylbenzilato (QNB) en solución Tampón Fosfato (PBS) 50 mmol/L, en ausencia o presencia de atropina (1 $\mu\text{mol/L}$) (antagonista muscarínico). La unión a receptores en presencia de atropina se consideró unión inespecífica. La incubación finalizó con dos lavados sucesivos en PBS (pH 7.5, 4 °C) (5 min cada uno). Finalmente, las rebanadas se enjugaron en agua destilada durante 2 s a 4 °C. Las secciones fueron secadas rápidamente con aire frío.

- Receptores gabaérgicos BDZ: las secciones cerebrales se incubaron durante 45 min a 4°C en una solución que contenía 2.08 nmol/L de ³[H]Flunitracepan (agonista para el sitio de acción BDZ en el complejo GABA_A) en solución tampón Tris HCl 170 mmol/L pH 7.6, en ausencia o presencia de diazepám 1 μmol/L. La unión de receptores en presencia de diazepám se consideró inespecífica.
 - Receptores mu opioides: las secciones cerebrales fueron prelavadas en una solución Buffer Tris 50 mmol/l durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, las láminas se incubaron durante 1 h a 25 °C en una solución que contenía 2 nmol/L de [³HTyr-D-Ala-(Nme)Phe-Gly-ol] (³H-DAMGO) (agonista de los receptores mu opioides) en solución Tris HCl 50 mmol/L, en ausencia o presencia de naloxone (2 μmol/L) (antagonista competitivo de los receptores opioides). La unión a receptores en presencia de este compuesto se consideró unión inespecífica.
- Para los receptores mu opioides y BDZ, las incubaciones finalizaron con dos lavados sucesivos en solución tampón Tris 50 mmol/L (pH 7.4; 4 °C) (1 min cada uno). Por último, las láminas se lavaron en agua destilada durante 2 s a 4 °C. Las secciones fueron secadas rápidamente con aire frío.

6.3 Exposición y revelado de las láminas

Las láminas se colocaron en cassettes de plomo para autorradiografía junto con estándares de tritio, y se pusieron en contacto con una película sensible a tritio (Kodak MR-2). Para los receptores muscarínicos los cassettes se conservaron en un lugar oscuro y a temperatura de 4 °C durante tres semanas. Para los receptores opioides y BDZ las películas se conservaron a temperatura ambiente (TA) durante diez y dos semanas respectivamente. Posteriormente se procesaron con revelador Kodak (D 11) y fijador rápido. La densidad óptica (DO) de los autorradiogramas se determinó utilizando un programa de análisis de imágenes (JAVA, Jandel Software del Análisis de Video). Las lecturas de DO de los estándares se utilizaron para determinar los valores de la radioactividad del tejido de las láminas adyacentes. Para cada área de estudio se realizaron diez lecturas de la DO en por lo menos cinco secciones y se obtuvo un promedio. Para las estructuras en estudio se realizaron lecturas en el hemisferio derecho. La DO se convirtió en fentomolas por mg de tejido con base en los valores obtenidos de los estándares de tritio.

7. Evaluación de la expresión del FNDC y del FNDG

7.1 Aislamiento de proteínas totales

Al concluir los tratamientos y evaluaciones las ratas de los grupos experimentales correspondientes al objetivo específico 3 fueron anestesiadas (hidrato de cloral, 480 mg/kg de peso corporal, i.p.) y decapitadas. Sus cerebros fueron extraídos y lavados con NaCl 0.9 % frío y el St fue disecado. El tejido se congeló en nitrógeno líquido, se pesó y conservó a -80 °C hasta su análisis.

Las proteínas fueron extraídas del tejido estriatal usando la técnica del TriPure. El tejido se homogenizó en 1 ml de solución de TriPure, se le adicionaron 0.2 mL de cloroformo y se obtuvieron tres fases. La fase inferior, que contenía las proteínas, se trató con 0.3 mL de etanol absoluto para precipitar el ADN contaminante y obtener una muestra pura de proteínas. Posteriormente, se adicionaron 1.5 mL de isopropanol para precipitar las proteínas totales. Las muestras fueron centrifugadas a 4 °C y a 12 000 rpm durante 10 min y lavadas tres veces con tiocianato de guanidina 0.3 mol/L preparado en etanol al 95%. Finalmente, las muestras se lavaron con etanol absoluto, se centrifugaron en las mismas condiciones descritas anteriormente y el precipitado se resuspendió en 0.2 mL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1%.

7.2 Determinación de la concentración de proteínas

Se prepararon diluciones 1:100 de cada muestra de proteínas por duplicado, en un volumen final de 0.1 mL. A cada una de las diluciones se les adicionaron 0.1 mL de una solución que contenía ácido bicinonílico al 4% en un volumen final de 5 ml, 0.2 mL de sulfato de cobre y 5.2 mL de microrreactivo A (7 g de carbonato de sodio anhidro, 1.6 g de hidróxido de sodio y 1.6 g de tartrato de sodio disueltos en 100 mL de agua destilada, pH 11.25). Las muestras se incubaron toda la noche a TA y se leyó la absorbancia a 280 nm empleando un espectrofotómetro (Shimadzu, Kyoto, Japón). La concentración de proteínas totales se calculó tomando como referencia una curva patrón obtenida a partir de diferentes concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina.

7.3 Western Blot

Mediante la técnica de Western Blot se realizó la inmunodetección del FNDC, FNDG y β -actina, esta última proteína se usó como control de la integridad de la muestra proteica. Se tomó de cada muestra un volumen equivalente a 50 μ g de proteínas y se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12 %. Para identificar las proteínas de interés, se utilizó un patrón de peso molecular de color dual que incluía moléculas con pesos moleculares en el rango de 10 a 250 kDa (Bio-Rad, Richmond, VA, USA).

Una vez que las proteínas fueron separadas a 80 V, se transfirieron a una membrana PVDF (del inglés, *polyvinylidene fluoride*) (Bio-Rad, Richmond, VA, USA) durante 1 h. Los sitios inespecíficos fueron bloqueados con leche descremada al 5 % preparada en PBS-Tween 0.05 % durante 1 h a TA. Las membranas fueron incubadas toda la noche a 4 °C con anticuerpos primarios para FNDG (1:200), FNDC (1:200) y β -actina (1:300), preparados en solución bloqueadora. Estos anticuerpos fueron: inmunoglobulina anti- FNDG y anti- FNDC producidas en conejo (policlonales), e inmunoglobulina anti- β -actina producida en ratón (monoclonal). Al siguiente día, las membranas fueron lavadas con PBS-Tween 0.05 % y marcadas con peroxidasa de rábano picante (HRP, del inglés, *horseradish peroxidase*). Como segundos anticuerpos se usaron anti-inmunoglobulinas de conejo producidas en cabra (1:2000) y para β -actina se utilizó una anti-

inmunoglobulina de ratón producida en cabra (1:6000) marcada con HRP. Las membranas fueron lavadas y se revelaron usando el sistema de detección ECL (del inglés, *Enhanced Chemiluminescence*) (Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Alemania).

Para cuantificar la expresión de los FNT, las imágenes fueron digitalizadas con el sistema BioDoc-It (Bio-Rad, Richmond, VA, USA). El análisis densitométrico se realizó con el programa Lab Works 4.0 Image Acquisition.

Se utilizó la β -actina como control para normalizar la expresión de los factores neurotróficos, de manera que las densidades ópticas de FNDC y FNDG se expresaron en relación con la densidad óptica de β -actina. Para cada corrida electroforética los valores de FNDC y FNDG, normalizados en base a β -actina, se normalizaron nuevamente en base a 1. Cada muestra se analizó por triplicado.

8. Métodos de evaluación morfológica e inmunohistoquímica

8.1 Obtención del tejido: al concluir los estudios *in vivo*, las ratas recibieron una dosis mayor de hidrato de cloral (i.p; 480 mg/kg) y fueron perfundidas a través de la aorta ascendente con 500 mL de NaCl 0.9% y 500 mL de una solución fijadora consistente en paraformaldehído 4% / glutaraldehído 0.1% / ácido pícrico 15% en fosfato de sodio 0.1mol/L, pH 7.4. A continuación los cerebros fueron extraídos, conservados en la solución fijadora por 1 h, lavados con fosfato de sodio 0.1 mol/L pH 7.4, crioprotegidos en sacarosa 7, 15, 30% (24 h a cada concentración) y congelados en nitrógeno líquido. Seguidamente, se obtuvieron cortes coronales (20 μ m) de las áreas correspondientes a la SNc, el NST y el NPP. Las secciones fueron montadas en láminas portaobjetos previamente recubiertas con gelatina-alumbre de cromo.

8.2 Técnica de Violeta de Cresilo

La tinción con Violeta de Cresilo se utilizó para comprobar la localización correcta de la cánula de microdiálisis en el NPP (n=15) y la lesión del NST (n=5). Las láminas se lavaron en PBS por 15 min, a continuación se enjuagaron en agua destilada por 10 min y seguidamente se mantuvieron en alcohol 70% durante 5 min. Posteriormente las láminas fueron sumergidas en violeta de Cresilo al 0.5% por 30 s buscando siempre homogeneidad en la penetración del colorante.

El exceso de colorante se eliminó en abundante agua corriente. Se deshidrataron las láminas y se aclararon en xilol. Como medio de montaje fue utilizado Eukitt. Los cortes fueron observados al microscopio de campo claro *Olympus SR-2* (Tokio, Japón).

8.3 Procesamiento inmunohistoquímico

Las secciones histológicas para la visualización de las células inmunoreactivas a la enzima TH fueron colocadas en PBS tres veces durante 7 min cada una. A continuación, se incubaron durante 20 min con solución de bloqueo y permeabilización (suero fetal de ternera 20%, Triton X-100 0.25%), se recubrieron con el anticuerpo anti-TH (1:100, STF suero fetal de ternera 1% y Triton X-100 0.25%) y se incubaron durante la noche a 4°C. Las secciones fueron lavadas en PBS tres veces

durante 7 min e incubadas con el anticuerpo anti IgG de ratón biotilado durante 1 h (1:500, STF suero fetal de ternera 1% y Triton X-100 0.25%). Después de tres lavados con PBS durante 7 min, las secciones fueron incubadas durante 1 h con el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa de rábano, lavadas con PBS y reveladas con H₂O₂ como sustrato de la enzima y tetrahidrocloruro de diaminobenzidina como cromógeno. Las secciones de tejido fueron deshidratadas utilizando una serie de alcoholes de concentraciones ascendentes, aclaradas en xilol y montadas con Eukitt.

8.4 Método de detección de muerte celular *in situ* (TUNEL)

La fragmentación del ADN fue detectada *in situ* mediante un kit que contiene deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) según la descripción del fabricante (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania). Inicialmente las láminas que contenían cortes coronales (10 µm) del NPP de ratas con lesión unilateral completa de la SNc (n=5), se incubaron con proteinasa K por 15 min a TA y con una solución permeabilizadora (0.1% Triton x 100, 0.1% citrato de sodio) durante 2 min a 4 °C. Seguidamente se lavaron con una solución tampón fosfato y se adicionó la mezcla de la solución TUNEL. Las secciones se incubaron durante 60 min a 37 °C y se lavaron tres veces con la solución tampón fosfato. Con el objetivo de verificar si existía muerte apoptótica, las secciones fueron contrastadas con yoduro de propidio (IP) por 2 min y finalmente fueron cubiertas con medio de montaje Vectashield con DAPI (1.5 µg/mL de DAPI, Vector Lab., CA, EUA). Las láminas se examinaron en un microscopio de fluorescencia (λ excitación 560-500 nm y λ detección 515-565 nm, Leitz, Alemania) y en un microscopio confocal *Leica 2B* (Berlin, Alemania).

V. ANÁLISIS DE LOS DATOS

En todos los casos se realizó la prueba de normalidad a los datos por medio del test de Kolmogorov Smirnov. Igualmente se probó la homogeneidad de varianzas mediante la Prueba de Levene.

La comparación de las concentraciones de Glu y GABA, la densidad de receptores, la latencia de escape, de caída y el promedio de errores cometidos por las ratas, entre los grupos experimentales, fue realizada mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) de Clasificación simple. Para las concentraciones de los aminoácidos, las latencias de escape y de caída y el promedio de errores, el ANOVA fue seguido de una prueba de Tukey, y para la densidad de receptores de una prueba de rangos múltiples de Duncan.

La comparación de los niveles de GABA y Glu dentro de cada grupo experimental, antes y después de la infusión de una solución de LCRA con mayor concentración de KCl se realizó mediante una prueba T de Student para datos pareados.

La actividad rotatoria inducida por D-anfetamina, no siguió una distribución normal, por lo que la comparación de esta variable entre los grupos experimentales, se efectuó por medio de un ANOVA no paramétrico Kruskal Wallis, seguido de una prueba de comparación Student-Newman-Keuls (SNK).

La comparación de las concentraciones extracelulares de Glu y GABA entre los grupos experimentales y los tiempos de colecta de los dializados (Grupos x Tiempo de colecta) se realizó mediante un ANOVA bifactorial con medidas repetidas seguido de una prueba de Bonferroni. Se trabajó con un nivel de significación de 0.05 y para el análisis de los datos se empleó el software *Statistica CSS* versión 6.1.

RESULTADOS

Lesión de la SNc

Aproximadamente el 60% de los animales tratados mostraron una conducta rotatoria inducida por la administración i.p de D-anfetamina, que se correspondió con nuestro criterio de inclusión. En estos animales fue posible observar una pérdida masiva de cuerpos celulares dopaminérgicos en la SNc lesionada con 6-OHDA (hemisferio derecho) (Fig. 9). La imagen se corresponde con la coordenada (referente a Bregma) AP:-4.4 mm que coincide con la coordenada de inyección de la neurotoxina.

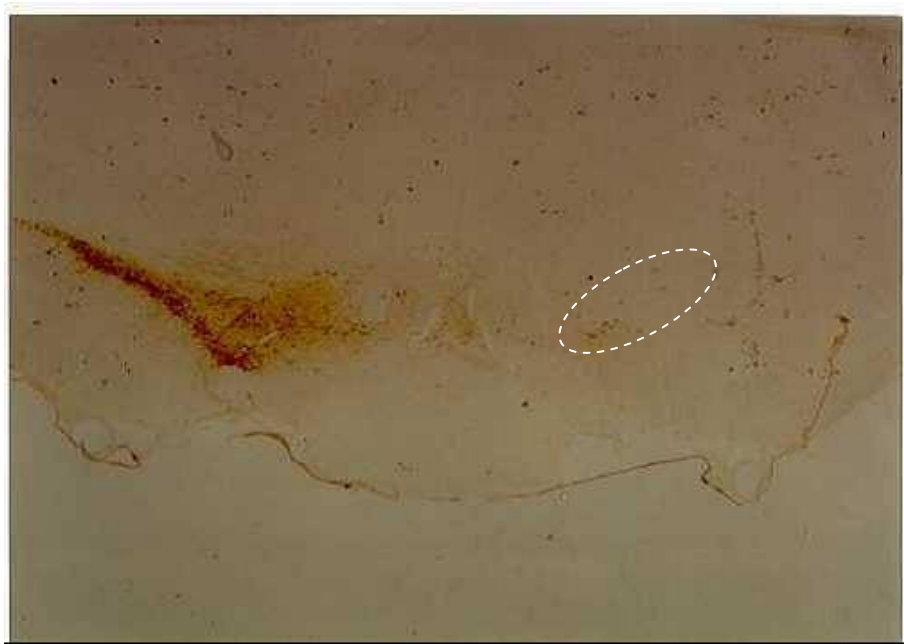


Fig. 9 Microfotografía representativa de la inmunodetección de la enzima tirosina hidroxilasa en un corte coronal de la *substantia nigra compacta* (SNc) de una ratona inyectada con 6-hidroxidopamina. (10X). El área señalada indica la zona correspondiente a la SNc del hemisferio lesionado. Nótese la pérdida de cuerpos celulares dopaminérgicos en el hemisferio derecho al comparar con el hemisferio contralateral en el que se observa una inmunopositividad a la enzima tirosina hidroxilasa.

Localización de la cánula de microdiálisis cerebral en el NPP

El NPP se extiende desde la coordenada (mm) AP:-7.30 hasta la coordenada AP:-8.30 (referentes a Bregma) imbricado en la parte distal del pedúnculo cerebeloso superior, de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson, 1998 (Paxinos y Watson, 1998). La coordenada AP:-8.00 mm se corresponde con la mejor visualización de la estructura en estudio, como se evidencia en la Fig. 10A. La evaluación morfológica mostró la ubicación correcta de la cánula de microdiálisis cerebral en las coordenadas correspondientes al NPP (Fig. 10B).

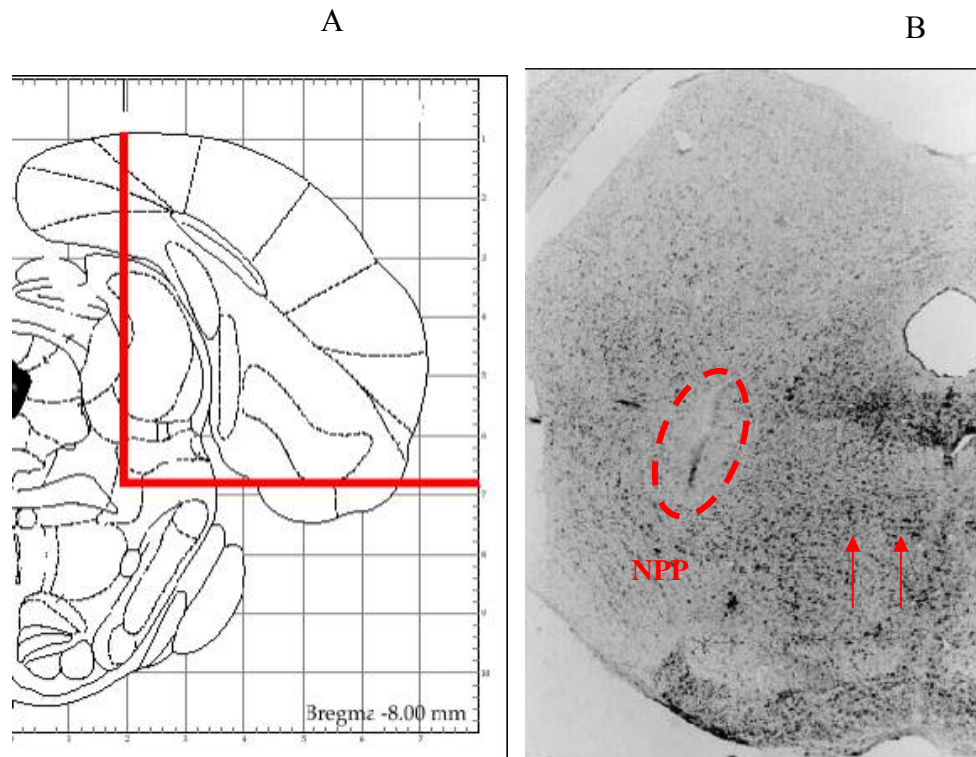


Fig.10A Representación esquemática de un corte coronal del núcleo pedunculopontino (NPP) en la coordenada AP: -8 mm que coincide con la mejor visualización de la estructura. La intersección de las líneas en rojo, representa la ubicación de la cánula de microdiálisis cerebral. B. Microfotografía (5x) de un corte coronal de la zona del núcleo pedunculopontino. Las flechas rojas señalan el haz de fibras que constituye el pedúnculo cerebeloso superior en cuya parte distal se encuentra el NPP. El área delimitada con los puntos discontinuos corresponde a la huella de la cánula de microdiálisis cerebral en el tejido. Tinción con Violeta de Cresilo.

Objetivo Específico 1. Concentraciones extracelulares de Glu y GABA, densidad de diferentes poblaciones de receptores y proceso de muerte celular en el NPP de ratas hemiparkinsonizadas.

Efecto de la lesión neurotóxica de la SNc sobre las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP.

La pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SNc induce un incremento en las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP ipsilateral a la lesión ($p < 0.001$) con respecto a los controles (Fig. 11A y B, respectivamente).

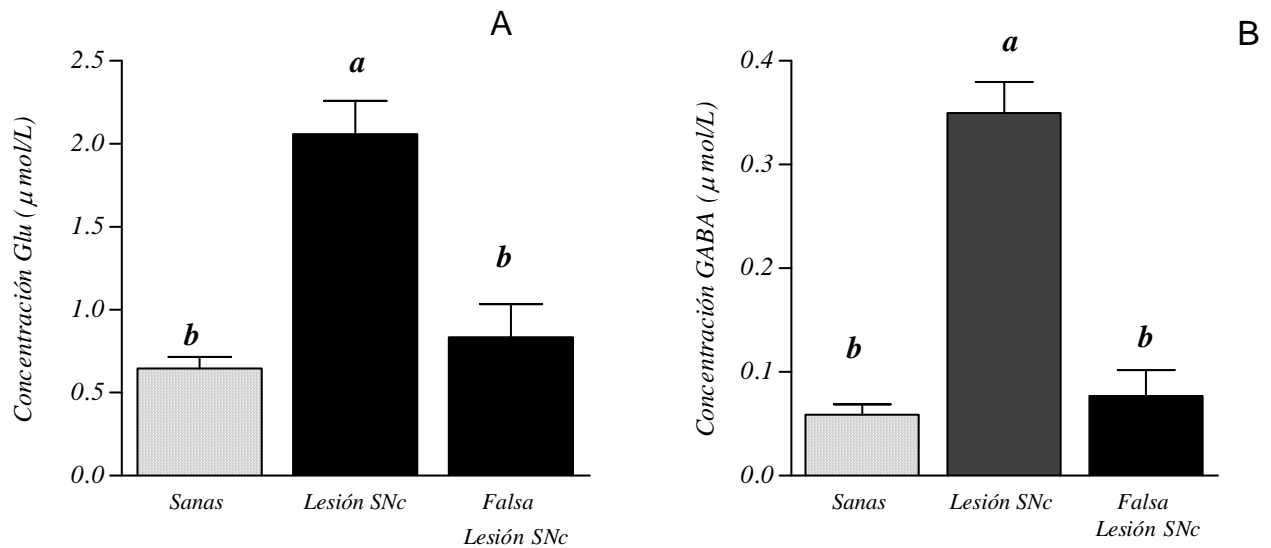


Fig. 11 Concentraciones extracelulares de glutamato (Glu) y ácido γ -aminobutírico (GABA) en el núcleo pedunculopontino. A. Comparación de la concentración de Glu entre los grupos ($F_{(2, 31)}=26.51$ $p<0.01$). B. Comparación de la concentración de GABA entre los grupos ($F_{(2, 33)}= 23.57$ $p<0.001$). Grupos Experimentales: ratas sanas ($n=13$), ratas con lesión unilateral completa de la *substantia nigra compacta* (SNc) ($n=11$), ratas con falsa lesión de la SNc ($n=10$). ANOVA de clasificación simple y prueba de Tukey. a vs b: $p<0.001$. (Las barras representan $\bar{X}\pm$ E.E.M).

Efecto de la estimulación con potasio sobre las concentraciones extracelulares de Glu y GABA

Con el propósito de comprobar si aún después de la manipulación quirúrgica se conservaban intactos los mecanismos de liberación de los neurotransmisores, al final del experimento se infundió una solución de LCRa con mayor concentración de KCl y menor concentración de NaCl. El resultado fue un aumento significativo en las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en todos los grupos experimentales. Este hallazgo, constituyó una prueba fehaciente de la conservación de los mecanismos de liberación y su control sináptico, a partir de la despolarización inducida por las mayores concentraciones de KCl infundidas (Tabla 5).

Tabla 5 Comparación de las concentraciones extracelulares de glutamato y ácido γ -aminobutírico en el núcleo pedunculopontino antes y después de la infusión de una solución de líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) con mayor concentración de potasio dentro de cada grupo. Las comparaciones se realizaron por medio de una prueba T de Student. (Basal: antes de la infusión de LCRa con mayor concentración de potasio) (Los datos se presentan como $\bar{X}\pm$ E.E.M).

Grupos	Glutamato ($\mu\text{mol/L}$)			Ácido γ -aminobutírico ($\mu\text{mol/L}$)		
	Basal	Mayor concentración de K^+	Estadística	Basal	Mayor concentración de K^+	Estadística
Ratas Sanas ($n=13$)	0.646 ± 0.07	1.263 ± 0.16	$t=5.048$ $p<0.01$	0.059 ± 0.01	0.155 ± 0.05	$t=2.39$ $p<0.05$
Lesión SNc ($n=11$)	2.06 ± 0.20	2.894 ± 0.09	$t=12.61$ $p<0.001$	0.358 ± 0.03	0.700 ± 0.06	$t=4.66$ $p<0.05$
Falsa Lesión SNc ($n=10$)	0.835 ± 0.11	1.302 ± 0.13	$t=3.17$ $p<0.05$	0.080 ± 0.02	0.180 ± 0.05	$t=3.21$ $p<0.05$

Efecto de la lesión neurotóxica de la SNc sobre la densidad de receptores: colinérgicos muscarínicos en el NPP y el St, y gabaérgicos BDZ y mu opioides en el NPP.

El estudio de la densidad de diferentes poblaciones de receptores en ambas estructuras se realizó con el objetivo de conocer algunos de los cambios moleculares que se producen en las neuronas pontinas y estriatales, asociados a la lesión neurotóxica de la SNc. Se seleccionaron cortes para realizar los estudios de autorradiografía en cada grupo experimental que fueron representativos de toda el área que ocupa el NPP y la región anterior del St siguiendo una distribución rostrocaudal.

Receptores Colinérgicos Muscarínicos en el NPP y en el St

En general, la densidad de receptores muscarínicos en el NPP fue menor que en el St.

En el NPP, todos los grupos experimentales mostraron valores de DO por debajo de 100 fmoles/mg de proteína, mientras que para el St, el promedio de los valores de los diferentes grupos experimentales mostró un rango entre 150 y 280 fmoles/mg de proteína.

Cuando comparamos los valores promedio de densidad óptica de los diferentes grupos experimentales en cada estructura, encontramos que el grupo de ratas lesionadas con 6-OHDA mostró un incremento estadísticamente significativo en la densidad de receptores muscarínicos tanto en el NPP ($p < 0.05$) como en el St ($p < 0.01$), en comparación con los restantes grupos experimentales (Fig.12A y B).

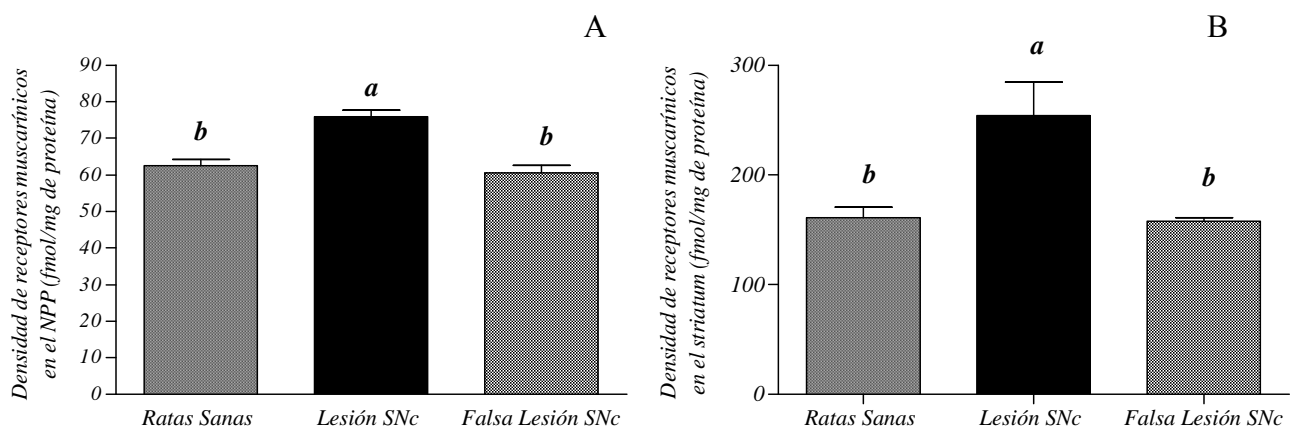


Fig. 12 Estudios autorradiográficos para receptores colinérgicos muscarínicos. A. Comparación de la densidad de receptores colinérgicos muscarínicos en el núcleo pedunculopontino entre los grupos ($F_{(2, 13)}=3.93$ $p < 0.01$). B. Comparación de la densidad de receptores colinérgicos muscarínicos en el *striatum* entre los grupos ($F_{(2, 19)}=8.35$ $p < 0.01$). Grupos Experimentales: ratas sanas (n=9), ratas con lesión unilateral completa de la *substantia nigra compacta* (SNc) (n=7), ratas con falsa lesión de la SNc (n=5). ANOVA de clasificación simple y prueba de Duncan. a vs b: $p < 0.01$. (Las barras representan $\bar{X} \pm E.E.M$).

Receptores gabaérgicos BDZ en el NPP

El análisis de los valores promedio de densidad óptica de los diferentes grupos arrojó que las ratas con lesión unilateral completa de la SNc presentan una disminución significativa de la densidad de receptores gabaérgicos BDZ en el NPP del hemisferio lesionado ($p < 0.001$) (Fig. 13).

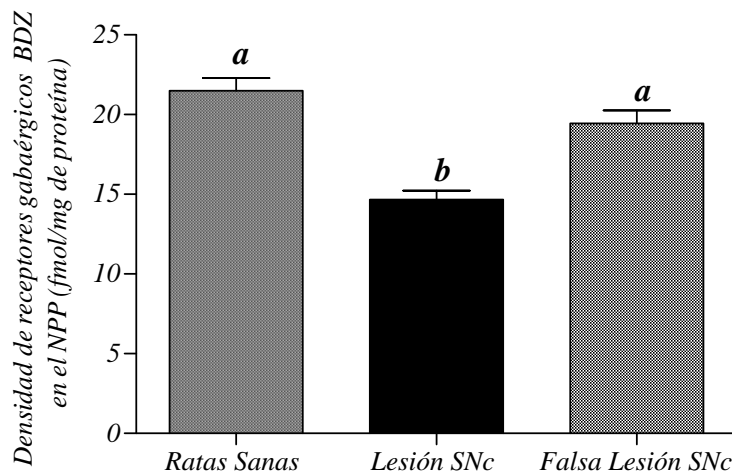


Fig. 13 Estudio comparativo de la densidad de receptores gabaérgicos benzodiazepínicos (BDZ) en el núcleo pedunculo pontino entre los grupos ($F_{(2, 18)} = 8.54$, $p < 0.001$). Grupos Experimentales: ratas sanas ($n=9$), ratas con lesión unilateral completa de la *substantia nigra compacta* (SNc) ($n=7$), ratas con falsa lesión de la SNc ($n=5$). ANOVA de clasificación y prueba de Duncan. a vs b $p < 0.001$. (Las barras representan $\bar{X} \pm E.E.M.$).

Receptores mu-opioides en el NPP

La comparación de los valores promedio de densidad óptica evidenció una disminución estadísticamente significativa de la densidad de receptores *mu* opioides en el NPP ipsilateral al hemisferio lesionado de las ratas hemiparkinsonizadas ($p < 0.01$) (Fig. 14).

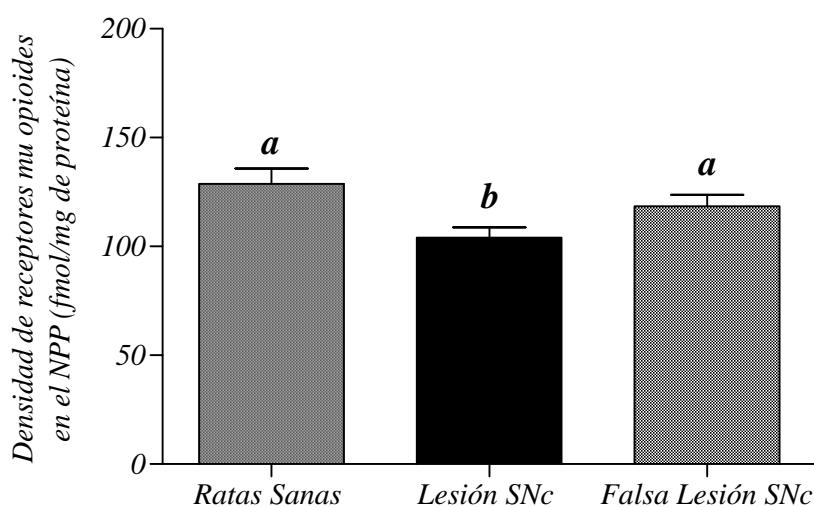


Fig. 14 Estudio comparativo de la densidad de receptores *mu* opioides en el núcleo pedunculo pontino entre los grupos ($F_{(2, 14)} = 6.02$, $p < 0.01$). Grupos Experimentales: ratas sanas ($n=9$), ratas con lesión unilateral completa de la *substantia nigra compacta* (SNc) ($n=7$), ratas con falsa lesión de la SNc ($n=5$). ANOVA de clasificación simple y prueba de Duncan. a vs b: $p < 0.01$. (Las barras representan $\bar{X} \pm E.E.M.$).

Efecto de la lesión neurotóxica de la SNc sobre la fragmentación del ADN en el NPP.

Una vez conocido los efectos de la lesión neurotóxica de la SNc sobre las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP, así como los cambios en la densidad de diferentes poblaciones de receptores en el NPP y el St, nos propusimos conocer si la lesión neurotóxica de la SNc induce secundariamente, un proceso de muerte celular en el NPP del hemisferio lesionado.

Estudio de fragmentación del ADN celular en el NPP

El estudio de la fragmentación del ADN celular (TUNEL) no mostró células TUNEL+ en el NPP izquierdo (contralateral a la inyección de la 6-OHDA en la SNc) (Fig. 15). Sin embargo, fue posible observar células TUNEL+ en el NPP correspondiente al hemisferio lesionado (derecho). Este hallazgo sugiere la presencia de muerte celular en el NPP después de la lesión con 6-OHDA (Fig 15).

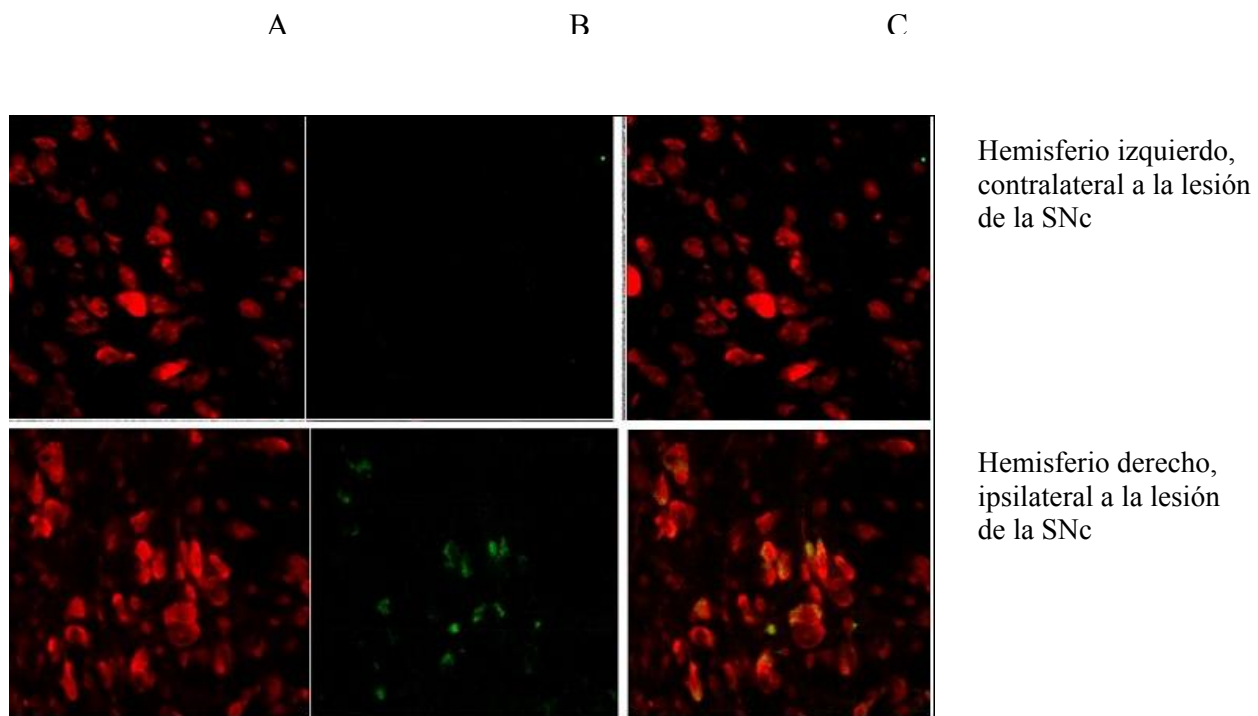


Fig. 15 Microfotografía confocal representativa de la inmunodetección de células TUNEL+ en secciones coronales del núcleo pedunculopontino (NPP) contrastadas con ioduro de propidio (IP) (n=5). A. Tinción de IP en un campo. B. Igual campo que A pero con el marcador TUNEL. Nótese que no se aprecian células TUNEL+ en el hemisferio izquierdo. C. Doble expresión de la tinción con IP y el marcaje con TUNEL, se observan en color naranja las células teñidas y marcadas. (40x)

En el NPP izquierdo (hemisferio contralateral a la inyección de la 6-OHDA) fue posible observar células teñidas con DAPI pero en ningún caso las mismas mostraron inmunoreactividad a TUNEL (Fig. 16A). En el caso del NPP del hemisferio lesionado, se observó en células aisladas positividad para ambos marcadores (DAPI + TUNEL) indicativo de que la muerte celular por mecanismos apoptóticos es muy escasa (Fig. 16B).

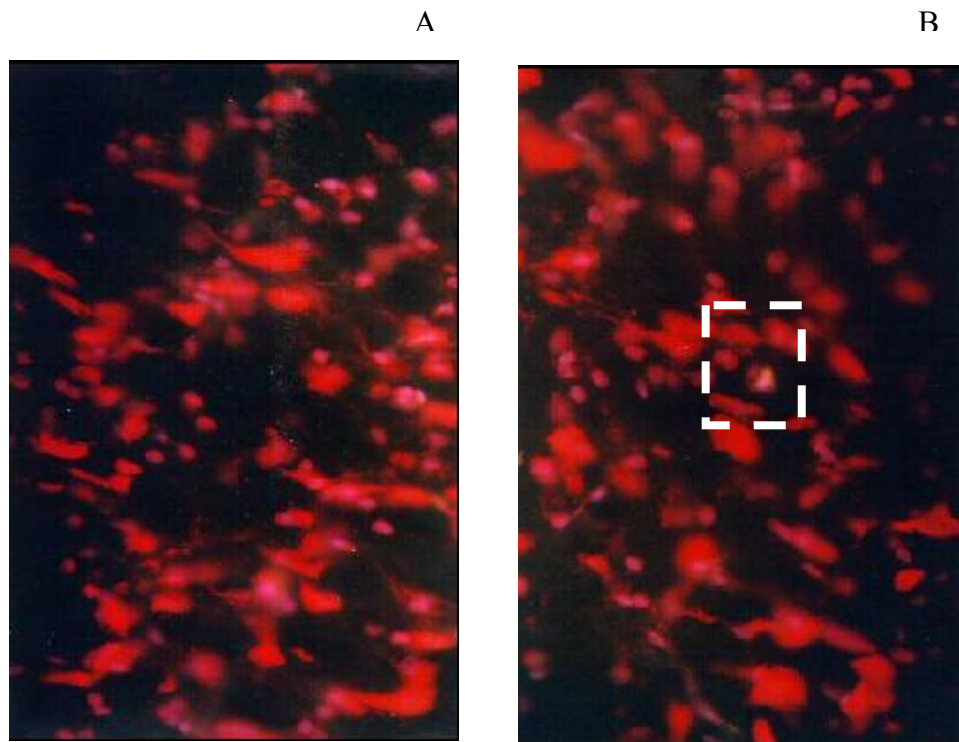


Fig. 16 Microfotografía representativa de un campo de una sección coronal del núcleo pedunculopontino (NPP) mostrando los resultados del estudio inmunohistoquímico para TUNEL y DAPI. A. NPP del hemisferio izquierdo (hemisferio contralateral a la lesión de la *substantia nigra compacta*, SNc). B. NPP del hemisferio derecho (hemisferio ipsilateral a la lesión de la SNc) donde se señala una célula con marcaje positivo para DAPI y TUNEL, indicativo de muerte apoptótica. Notar que solo es evidente esta doble tinción en células muy escasas. (40x).

De los resultados hasta aquí abordados podemos inferir que la lesión neurotóxica de la SNc induce modificaciones en la neurotransmisión a nivel del NPP ipsilateral al hemisferio lesionado, caracterizadas por un incremento en las concentraciones extracelulares de los aminoácidos Glu y GABA. Adicionalmente, es posible demostrar un incremento en la densidad de receptores colinérgicos muscarínicos tanto en NPP como en St y una disminución en la densidad de receptores gabaérgicos BDZ y *mu* opioides en el NPP de las ratas hemiparkinsonizadas con respecto a los grupos controles. Todos estos cambios se acompañan de un proceso de muerte celular en el NPP del hemisferio ipsilateral a la inyección de 6-OHDA.

Objetivo Específico 2. Efecto del tratamiento sistémico con MK-801 sobre los trastornos motores, las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP y la presencia de células dopaminérgicas en la SNc de ratas hemiparkinsonizadas.

Efecto del tratamiento con MK-801 sobre la coordinación motora: prueba de los puentes transversales

El estudio de la coordinación motora mediante la prueba de los puentes transversales se realizó utilizando puentes de diferentes formas y medidas, aumentando paulatinamente la dificultad de la prueba. Nuestros resultados mostraron que la lesión neurotóxica de la SNc produce un deterioro

significativo en la coordinación motora, que se pone de manifiesto aún cuando la prueba se realice con su menor grado de complejidad (ensayos donde se utilizan los puentes grandes, 2.5 cm de ancho y diámetro).

Cuando utilizamos el puente rectangular grande, solo se encontraron diferencias significativas entre los grupos lesionados (con y sin tratamiento farmacológico) y los grupos controles (sanas y falsas lesionadas en la SNc, datos no mostrados).

Sin embargo, cuando la latencia de escape (tiempo que demoran los animales en alcanzar la plataforma) fue evaluada en el puente circular grande (2.5 cm de diámetro) se encontró un aumento significativo ($p < 0.001$) en el grupo de ratas con lesión de la SNc sin tratamiento farmacológico en comparación con las ratas sanas y falsas lesionadas (Fig. 17A). Por otro lado, las ratas tratadas con MK-801 mostraron un comportamiento intermedio y significativamente diferente ($p < 0.01$) tanto de las ratas con lesión de la SNc sin tratamiento farmacológico como de las sanas (Fig. 17A). Cuando se realizó la prueba con un mayor grado de dificultad, utilizando puentes de menor ancho y diámetro (1 cm), no fue posible evaluar la latencia de escape porque los animales con lesión de la SNc de todos los grupos experimentales, no completaron el tiempo de ejecución de la prueba.

La latencia de caída (tiempo que demoran los animales en caer del puente en caso de no alcanzar una de las dos plataformas) se cuantificó en todos los grupos experimentales. Las ratas sanas no mostraron caídas del puente rectangular grande (2.5 cm de ancho), por lo que para este puente no se realizó el análisis comparativo entre los grupos. Esta variable mostró diferencias entre los grupos en todos los puentes siendo significativamente menor ($p < 0.001$) en el grupo de ratas con lesión de la SNc (sin tratamiento farmacológico y tratadas con SSF en lugar de MK-801). La latencia de caída de las ratas tratadas con MK-801 fue similar a la de las ratas sanas para los puentes circulares, mientras que para el puente rectangular de menor ancho, mostró un comportamiento intermedio y significativamente diferente ($p < 0.05$) entre las ratas con lesión de la SNc y las sanas (Fig. 17B).

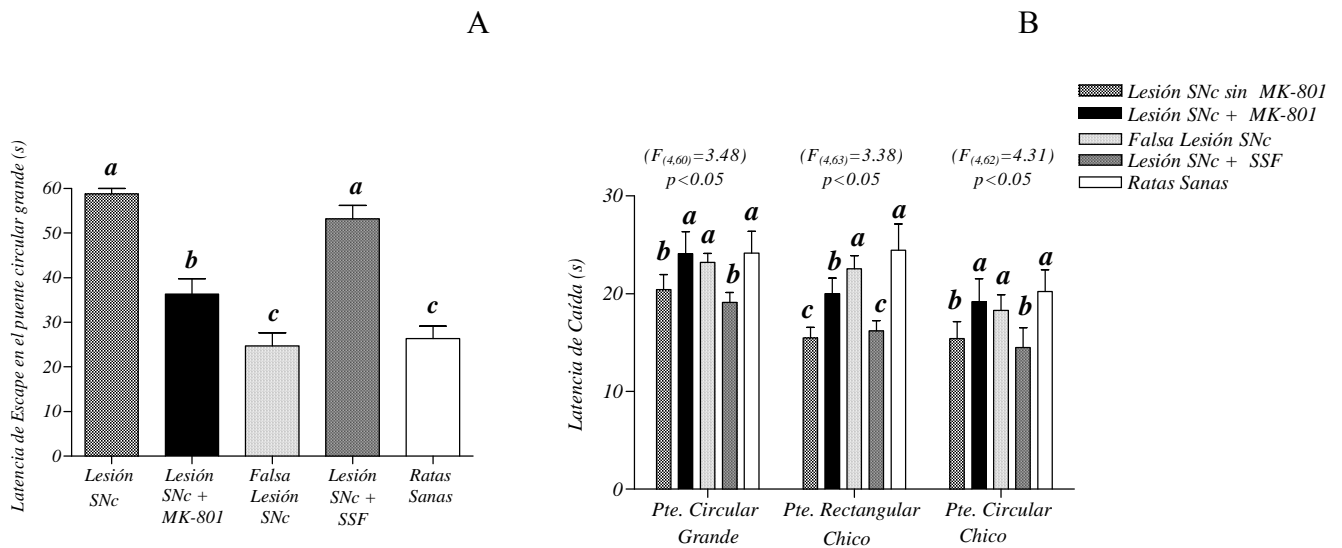


Fig.17 Efecto del tratamiento sistémico con MK-801 (0.5 mg/kg de peso i.p) en la latencia de escape y de caída en la prueba de los puentes (Pte) transversales. A. Comparación de la latencia de escape en el Pte circular grande entre los grupos ($F_{(4, 48)}=19.2$ $p<0.001$). B. Comparación de la latencia de caída entre los grupos dentro de cada Pte. Grupos Experimentales: ratas con lesión de la *substantia nigra compacta* (SNc) (n=11), ratas con lesión de la SNc + MK-801 (n=17), ratas con falsa lesión de la SNc (n=11), ratas con lesión de la SNc + solución salina fisiológica (SSF) (n=10), ratas sanas (n=22). ANOVA de clasificación simple seguido y prueba de Tukey. a vs b $p<0.05$, b vs c $p<0.01$, a vs c $p<0.001$. (Las barras representan $\bar{X} \pm$ E.E.M).

Calidad de la ejecución motora

A diferencia de la estrategia de agarre y sujeción al puente observada en el grupo control sano (Fig. 18A), las ratas con lesión de la SNc mostraron, en general, una postura asimétrica durante la ejecución de la prueba y no pudieron mantener el equilibrio en los puentes de menores ancho y diámetro (Fig. 18 B-C). Dicha postura se caracterizó por apoyar el peso del cuerpo sobre el lado sano, mientras que la extremidad trasera contralateral a la lesión quedaba suspendida del puente. En este grupo, la cola no se enrolló de forma activa en el puente por lo que no participa de la estrategia de soporte del animal.

Las ratas tratadas con MK-801 fueron incapaces de lograr una flexión adecuada de los dígitos lo que comprometió la sujeción eficaz del puente (Fig. 18D).

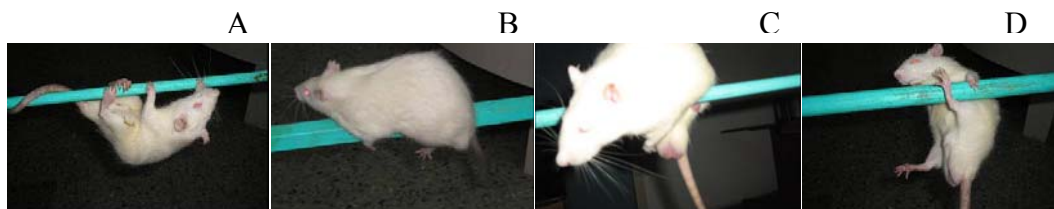


Fig. 18 Errores más frecuentes cometidos por las ratas lesionadas durante la ejecución en la prueba de los puentes (Pte) transversales. A. Rata sana mostrando una sujeción que involucra a las cuatro extremidades y la cola con mantenimiento óptimo del equilibrio en el Pte. B-C. Rata con lesión de la *substantia nigra compacta* (SNc) mostrando las extremidades izquierdas, contralaterales a la lesión de la SNc, suspendidas de los Ptes rectangular (B) y circular grande (C) respectivamente, sin participar de la estrategia de apoyo. D. Rata tratada con MK-801 mostrando incapacidad para flexionar adecuadamente los dígitos y asirse al Pte circular grande.

Con el propósito de evaluar la calidad de la ejecución motora se comparó el promedio de errores cometidos en cada puente, entre los grupos experimentales. En todos los puentes se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Fig. 19). Para los puentes de mayores ancho y diámetro respectivamente, el grupo de ratas tratadas con MK-801 no mostró diferencias significativas con el grupo de ratas sanas ($p > 0.05$). Sin embargo, para los puentes menores, las ratas tratadas con MK-801 fueron estadísticamente similares a las ratas con lesión de la SNc ($p > 0.05$).

Por su parte el grupo de ratas con falsa lesión en la SNc no mostró diferencias con respecto al grupo sano, mientras que el grupo con lesión de la SNc y tratamiento con SSF en lugar de MK-801 se comportó de manera similar al grupo de ratas con lesión de la SNc sin tratamiento farmacológico.

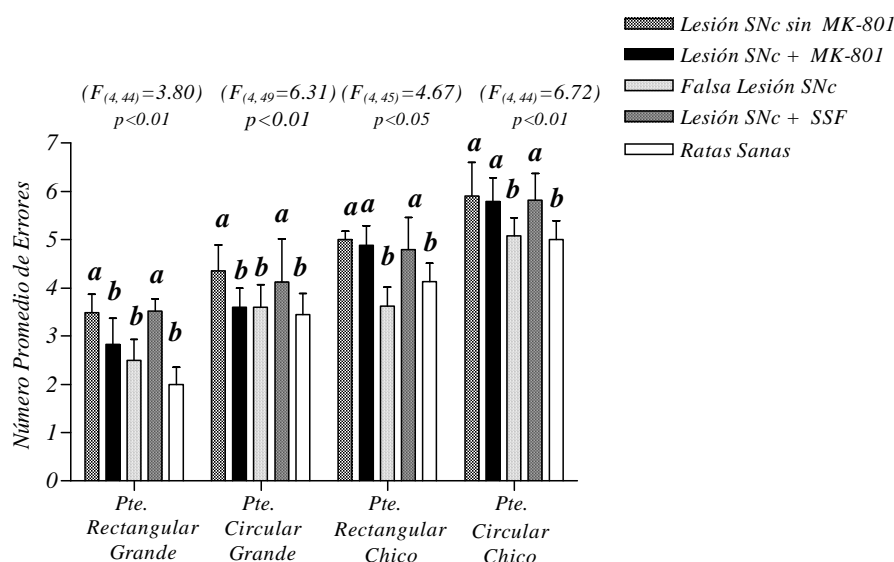


Fig. 19 Comparación del promedio de errores cometidos en cada puente (Pte) transversal entre los grupos. Grupos Experimentales: ratas con lesión de la *substantia nigra compacta* (SNc) (n=11), ratas con lesión de la SNc + MK-801 (n=17), ratas con falsa lesión de la SNc (n=11), ratas con lesión de la SNc + solución salina fisiológica (SSF) (n=13), ratas sanas (n=22). ANOVA de clasificación simple y prueba de Tukey. a vs b $p < 0.05$. (Las barras representan $\bar{X} \pm E.E.M.$)

Efecto del tratamiento con MK-801 sobre la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina

Las ratas con lesión de la SNc y tratamiento sistémico con MK-801 mostraron una disminución significativa ($p < 0.01$) de la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina en comparación con las ratas con lesión de la SNc sin tratamiento farmacológico (Fig. 20). Este resultado apunta al impacto positivo del tratamiento farmacológico disminuyendo la asimetría motora que caracteriza al modelo de 6-OHDA.

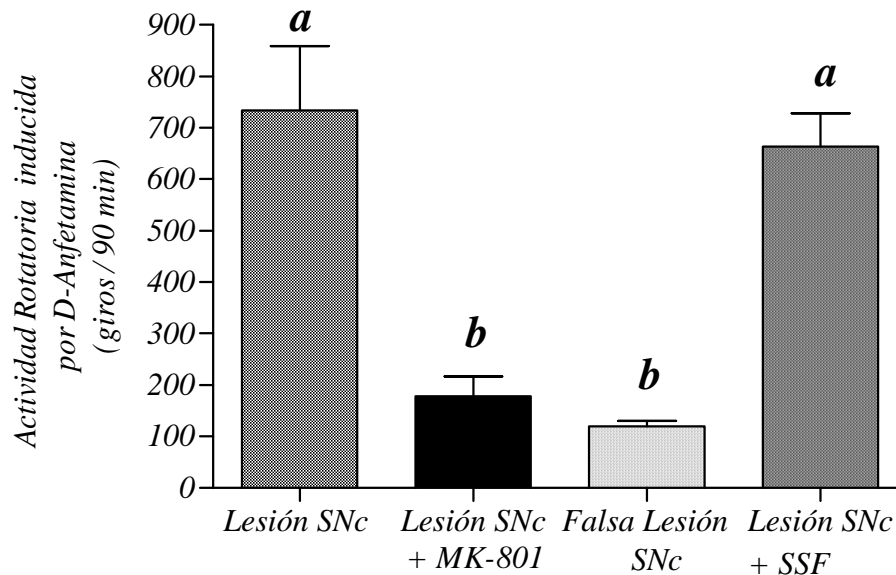


Fig.20 Comparación de la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina (5 mg/kg i.p) entre las ratas con lesión de la *substantia nigra compacta* (SNc) (n=15), ratas tratadas con MK-801 y lesionadas en la SNc (n=17), ratas con falsa lesión de la SNc (n=6), ratas con lesión de la SNc y tratadas con solución salina fisiológica (SSF) en lugar de MK-801 (n=9). ANOVA no paramétrico Kruskal Wallis ($H_{(3, 48)} = 19.62$ $p < 0.01$) y prueba Student-Newman-Keuls. a vs b $p < 0.01$. (Las barras representan $\bar{X} \pm$ E.E.M).

Efecto de la aplicación sistémica de MK-801 sobre las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP de ratas hemiparkinsonizadas.

Una vez concluidos los estudios conductuales, nos propusimos conocer si la administración sistémica de MK-801 en ratas hemiparkinsonizadas modificaba las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP.

El tratamiento sistémico con MK-801 reduce significativamente el incremento en las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP, inducidas por la lesión neurotóxica de la SNc. Las concentraciones extracelulares de Glu en el NPP de las ratas con lesión de la SNc y tratamiento con MK-801 mostraron un comportamiento intermedio y significativamente diferente ($p < 0.05$) entre las ratas con lesión de la SNc sin tratamiento farmacológico y las sanas (Fig. 21A).

Las concentraciones extracelulares de GABA en el grupo de ratas con lesión de la SNc y tratamiento con MK-801 presentaron una disminución significativa en comparación con las ratas con lesión de la SNc sin tratamiento farmacológico y no se diferenciaron significativamente de los grupos controles: sanas y falsa lesión de la SNc (Fig. 21B).

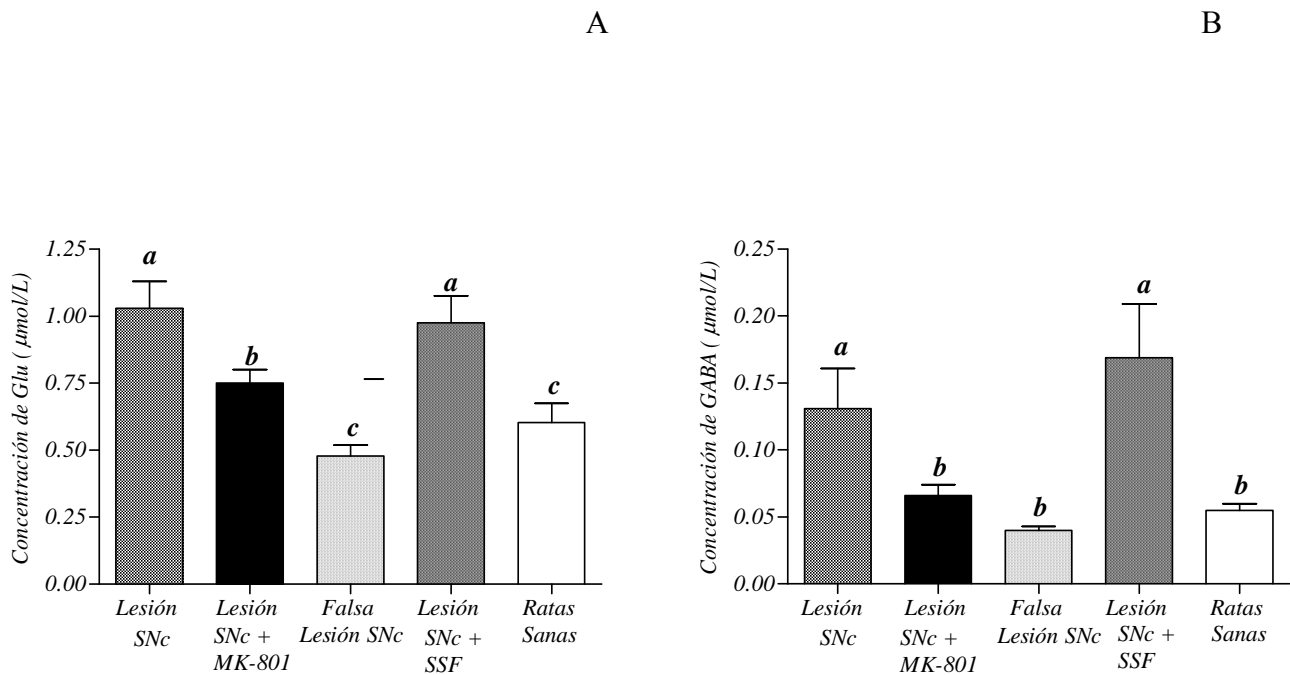


Fig. 21 Efecto del tratamiento sistémico con MK-801 (0.5 mg/kg de peso i.p) en las concentraciones extracelulares de glutamato (Glu) y ácido γ -aminobutírico (GABA) en el núcleo pedunculopontino. A. Comparación de la concentración de Glu entre los grupos ($F_{(4, 39)}=6.57$ $p<0.05$). a vs b $p<0.05$; b vs c $p<0.01$; a vs c $p<0.001$. B. Comparación de la concentración de GABA entre los grupos ($F_{(4, 37)}= 4.13$ $p<0.05$) a vs b $p<0.01$. Grupos Experimentales: ratas con lesión de la *substantia nigra compacta* (SNc) (n=9), ratas con lesión de la SNc + MK-801 (n=17), ratas con falsa lesión de la SNc (n=6), ratas con lesión de la SNc + solución salina fisiológica (SSF) (n=6), ratas sanas (n=10). ANOVA de clasificación simple y prueba de Tukey. (Las barras representan $\bar{X} \pm E.E.M$).

Efecto de la aplicación sistémica de MK-801 sobre la presencia de células dopaminérgicas en la SNc de ratas hemiparkinsonizadas.

Finalmente, abordamos el efecto del bloqueo sistémico de la neurotransmisión glutamatérgica sobre la presencia de células dopaminérgicas en la SNc. Nuestros resultados indican que la administración sistémica de MK-801 protege a las células dopaminérgicas del ATV ya que en esta zona, se observaron cuerpos celulares positivos a la enzima TH (Fig. 22). No obstante, el tratamiento farmacológico falló para evitar la pérdida de células dopaminérgicas en la SNc.

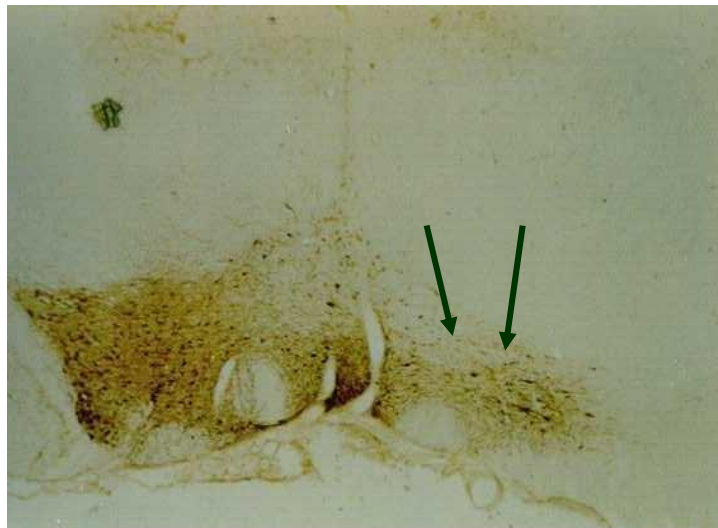


Fig. 22 Microfotografía de la inmunodetección de la enzima tirosina hidroxilasa en una sección coronal a nivel del área tegmental ventral (ATV) y la *substantia nigra compacta* (SNc) de una rata con lesión de la SNc y tratamiento con MK-801 (n=9) (10X). Las flechas indican la presencia de cuerpos celulares dopaminérgicos en la zona correspondiente al ATV.

De forma resumida, estos resultados nos permiten afirmar que el tratamiento sistémico con MK-801 tiene un efecto positivo sobre la conducta motora de los animales disminuyendo la asimetría y mejorando la coordinación motora de las ratas hemiparkinsonizadas. Este efecto conductual, se acompaña de una reducción importante de las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP y una menor pérdida de cuerpos celulares dopaminérgicos en el ATV. Estos hallazgos en su conjunto apuntan a un efecto neuroprotector del MK-801 en el modelo de 6-OHDA.

Objetivo Específico 3. Efecto del tratamiento sistémico con (-) nicotina sobre los trastornos motores, las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP, la expresión estriatal de distintos factores neurotróficos y la presencia de células dopaminérgicas en la SNc de ratas hemiparkinsonizadas.

Efecto del tratamiento con (-) nicotina sobre la coordinación motora: prueba de los puentes transversales

A continuación evaluamos el efecto de la manipulación del sistema colinérgico sobre los trastornos motores de ratas hemiparkinsonizadas, a través de la administración sistémica de (-) nicotina.

En esta secuencia de experimentos, las ratas con lesión de la SNc sin tratamiento con (-) nicotina mostraron una ejecución similar a la descrita anteriormente en el O.E. 2.

La latencia de escape fue evaluada en el puente circular grande (2.5 cm de diámetro) donde se encontró un incremento significativo de esta variable tanto en el grupo de ratas con lesión de la SNc sin tratamiento con (-) nicotina ($p < 0.01$) como en el grupo de ratas con lesión de la SNc que recibió

tratamiento farmacológico ($p < 0.05$), con respecto a los controles (Fig. 23A). Sin embargo, a pesar de este incremento en ambos grupos, la latencia de escape de las ratas con lesión de la SNc tratadas con (-) nicotina aumenta menos, lo que ubica a este grupo en una posición intermedia entre las ratas con lesión de la SNc sin tratamiento farmacológico y las ratas control (sanas y con falsa lesión de la SNc) (Fig. 23A).

La latencia de escape en el puente rectangular grande (2.5 cm de ancho) solo mostró diferencias entre los grupos controles (sanas y falsas lesionadas en la SNc) y los grupos con lesión de la SNc (con y sin tratamiento farmacológico) (datos no mostrados). No se evaluó la latencia de escape en los puentes de menor ancho y diámetro (1 cm) porque las ratas con lesión de la SNc (con y sin tratamiento farmacológico) no completan el tiempo de ejecución de la prueba.

La latencia de caída se cuantificó en todos los grupos experimentales excepto en las ratas sanas en el puente rectangular grande. En el puente circular grande (2.5 cm de diámetro), no se evidenciaron diferencias significativas entre los grupos ($p > 0.05$). En los puentes de menor ancho y diámetro (1 cm de diámetro), la latencia de caída de las ratas con lesión de la SNc (tanto las que no recibieron tratamiento con (-) nicotina, como las que lo recibieron) mostró un comportamiento muy similar con una disminución significativa ($p < 0.001$) con respecto a los controles (sanas y falsa lesión de la SNc) (Fig. 23B).

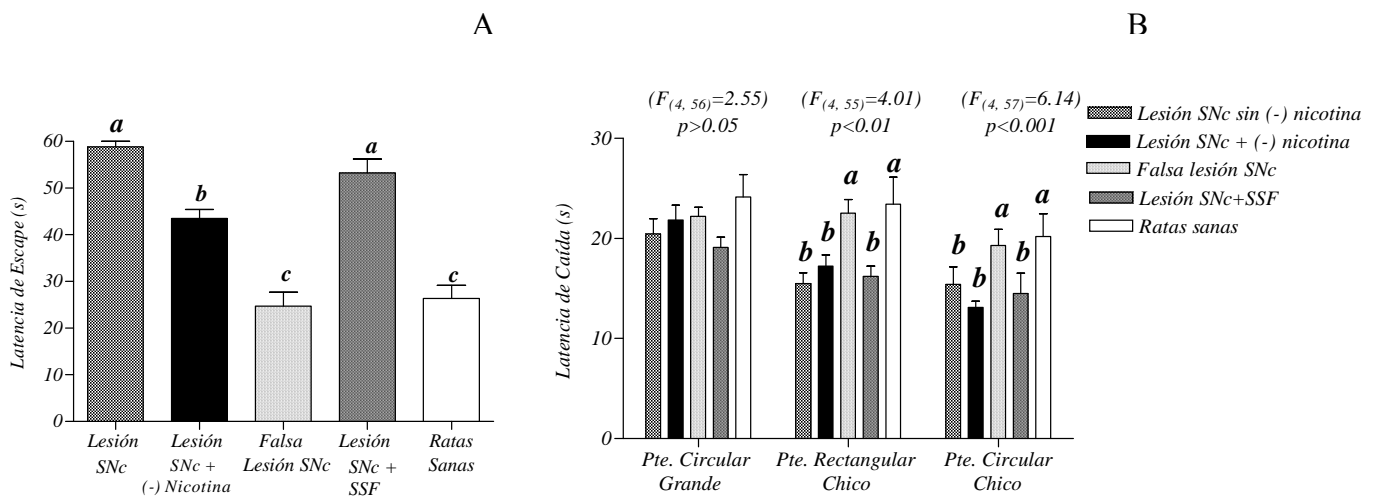


Fig.23 Efecto del tratamiento sistémico con (-) nicotina (1 mg/kg de peso s.c) en la latencia de escape y de caída de las ratas en la prueba de los puentes (Pte) transversales. A. Comparación de la latencia de escape en el Pte. circular grande entre los grupos ($F_{(4, 62)}=9.22$ $p < 0.01$). a vs b $p < 0.05$; b vs c $p < 0.01$; a vs c $p < 0.001$. B. Comparación de la latencia de caída entre los grupos dentro de cada Pte. a vs b $p < 0.01$. Grupos Experimentales: ratas con lesión de la *substantia nigra compacta* (SNc) (n=11), ratas con lesión de la SNc + (-) nicotina (n=13), ratas con falsa lesión de la SNc (n=11), ratas con lesión de la SNc + solución salina fisiológica (SSF) (n=10), ratas sanas (n=22). ANOVA de clasificación simple y prueba de Tukey. (Las barras representan $\bar{X} \pm E.E.M$).

Calidad de la ejecución motora

Una vez conocido el efecto del tratamiento con (-) nicotina sobre la latencia de escape y de caída de las ratas, evaluamos la calidad de la ejecución motora de las ratas. Para ello en primer término, realizamos una valoración cualitativa del desempeño de cada grupo de ratas por medio de la observación directa. En segundo término, calculamos el promedio de errores que globalmente cometieron los animales en cada puente y se comparó esta variable, entre los grupos experimentales.

De acuerdo a nuestras observaciones, las extremidades contralaterales a la lesión de las ratas con inyección de 6-OHDA en la SNc sin tratamiento con (-) nicotina mostraron una ligera oscilación que balancea el cuerpo de la rata, sin impulsarlo hacia adelante, por lo que no participan en el movimiento de avance. Asimismo, este grupo de ratas no avanzó en línea recta sobre los puentes, sino que alternaron el movimiento rectilíneo con giros muy estrechos que las obligaron a adoptar posiciones cada vez más inestables en la medida en que disminuyó el diámetro de los puentes (Fig. 24A).

Las ratas tratadas con (-) nicotina, aunque también giraron espontáneamente en círculos estrechos, mostraron una menor disfunción de la extremidad posterior contralateral a la lesión de la SNc, lo cual fue evidente en el apoyo de esta en el puente durante el reposo (Fig. 24B) y la locomoción (Fig. 24C).



Fig. 24 Errores más frecuentes cometidos por las ratas lesionadas durante la ejecución en la prueba de los puentes (Pte) transversales. A. Rata con lesión de la *substantia nigra compacta* (SNc) mostrando una postura muy inestable durante el giro espontáneo. B-C. Rata tratada con (-) nicotina apoyada en el Pte. rectangular grande sus dos extremidades traseras, en reposo en B y durante la ejecución de la prueba en C.

En relación con el promedio de errores, las ratas con lesión de la SNc sin tratamiento farmacológico mostraron un incremento significativo ($p < 0.05$) de esta variable durante su desempeño en el puente rectangular grande (2.5 cm de ancho). Por su parte, en este mismo puente, las ratas con lesión de la SNc tratadas con (-) nicotina mostraron un promedio de errores estadísticamente similar al de las

ratas sanas. En el puente circular grande (2.5 cm de diámetro), no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p>0.05$). Para los puentes de menores ancho y diámetro (1 cm) las ratas con lesión de la SNc, tanto las que recibieron tratamiento con (-) nicotina como las que no lo recibieron, mostraron un aumento significativo en el promedio de errores ($p<0.05$) en comparación con los grupos controles (sanas y falsa lesión de la SNc) (Fig. 25).

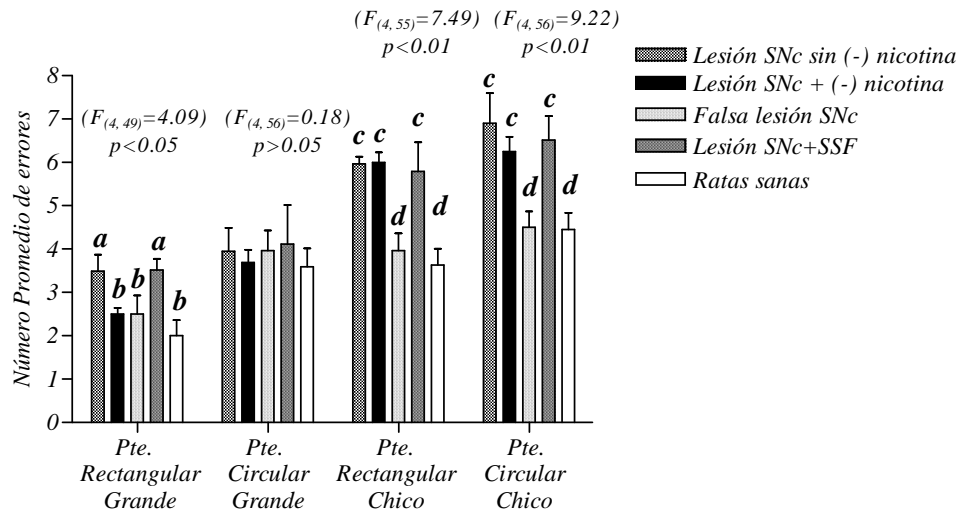


Fig.25 Comparación del promedio de errores cometidos en cada puente (Pte) transversal entre los grupos. Grupos Experimentales: ratas con lesión de la *substantia nigra compacta* (SNc) (n=11), ratas con lesión de la SNc + (-) nicotina (n=13), ratas con falsa lesión de la SNc (n=11), ratas con lesión de la SNc + solución salina fisiológica (SSF) (n=10), ratas sanas (n=22). ANOVA de clasificación simple y prueba de Tukey. a vs b $p<0.05$; c vs d $p<0.01$. (Las barras representan $\bar{X} \pm E.E.M$).

Efecto del tratamiento con (-) nicotina sobre la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina

El estudio de la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina reveló una disminución significativa ($p<0.01$) de la conducta de giro en las ratas tratadas sistémicamente con (-) nicotina en comparación con las ratas con lesión de la SNc sin tratamiento farmacológico lo cual apunta al efecto positivo del tratamiento farmacológico disminuyendo la asimetría motora (Fig. 26).

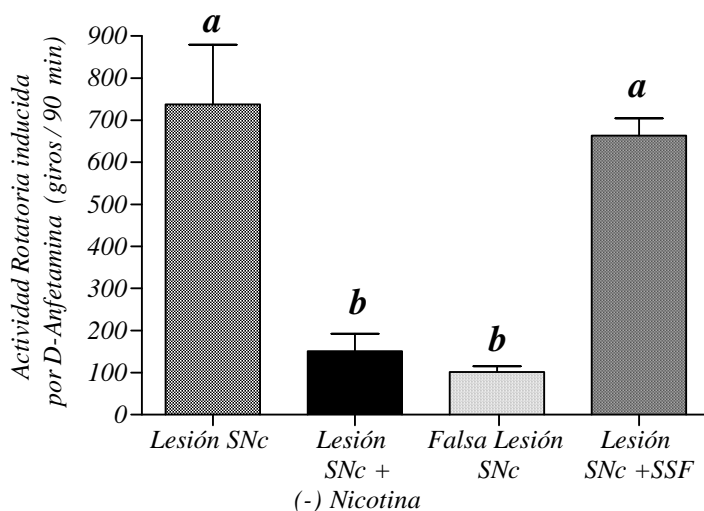


Fig. 26 Comparación de la actividad rotatoria inducida por D-Anfetamina (5 mg/kg de peso i.p) entre las ratas con lesión de la *substantia nigra compacta* (SNc) (n=15), ratas con lesión de la SNc + (-) nicotina (n=18), ratas con falsa lesión de la SNc (n=10), ratas con lesión de la SNc + solución salina fisiológica (SSF) (n=9). ANOVA No paramétrico Kruskal Wallis ($H_{(3, 50)} = 21.26$ $p<0.001$) y prueba Student-Newman-Keuls. a vs b $p<0.001$. (Las barras representan $\bar{X} \pm E.E.M$).

Efecto de la aplicación sistémica de (-) nicotina sobre las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP de ratas hemiparkinsonizadas.

Estudio de las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP

Seguidamente, nos propusimos evaluar si la administración sistémica de (-) nicotina a ratas con lesión de la SNc modificaba las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP, en comparación con las ratas lesionadas que no recibieron tratamiento farmacológico. El estudio reveló una disminución significativa, hasta valores normales, de las concentraciones extracelulares tanto de Glu como de GABA ($p < 0.01$) en el NPP de las ratas tratadas con (-) nicotina en comparación con las ratas hemiparkinsonizadas que no recibieron tratamiento con (-) nicotina (Fig. 27A y B).

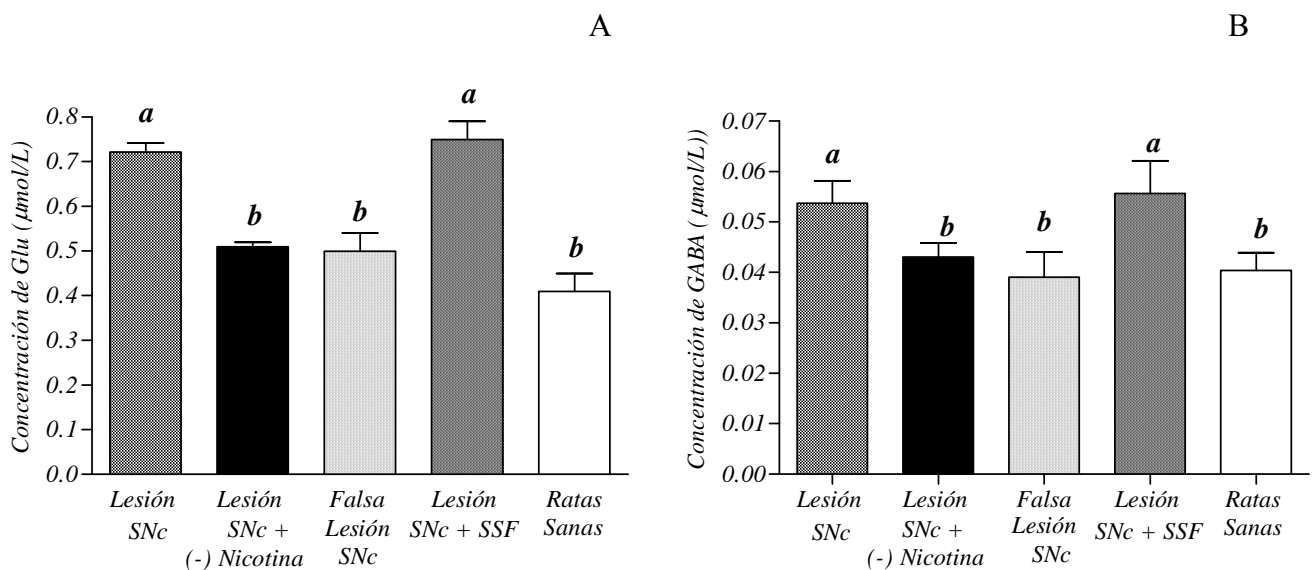


Fig. 27 Efecto del tratamiento sistémico con (-) nicotina (1 mg/kg de peso s.c) en las concentraciones extracelulares de glutamato (Glu) y ácido γ -aminobutírico (GABA) en el núcleo pedunculopontino. A.Comparación de la concentración de Glu entre los grupos ($F_{(4, 39)}=15.45$ $p < 0.001$). B.Comparación de la concentración de GABA entre los grupos ($F_{(4, 36)}=2.96$ $p < 0.05$). Grupos Experimentales: ratas con lesión de la *substantia nigra compacta* (SNc) (n=9), ratas con lesión de la SNc + (-) nicotina (n=9), ratas con falsa lesión de la SNc (n=6), ratas con lesión de la SNc + solución salina fisiológica (SSF) (n=6), ratas sanas (n=10). ANOVA de Clasificación Simple y Prueba de Tukey. a vs b $p < 0.01$. (Las barras representan $\bar{X} \pm$ E.E.M).

Efecto de la aplicación sistémica de (-) nicotina sobre la presencia de células dopaminérgicas en la SNc de ratas hemiparkinsonizadas.

El presente estudio nos permitió conocer el efecto de la administración sistémica de (-) nicotina sobre la presencia de cuerpos celulares dopaminérgicos en ratas tratadas con esta sustancia e inyectadas con 6-OHDA en la SNc. Los resultados del estudio inmunohistoquímico indicaron que el tratamiento farmacológico protege a las neuronas de la SNc de la lesión neurotóxica inducida por 6-OHDA, pudiéndose observar células TH+ ocupando las regiones medial y lateral de esta estructura (Fig. 28 A y B).

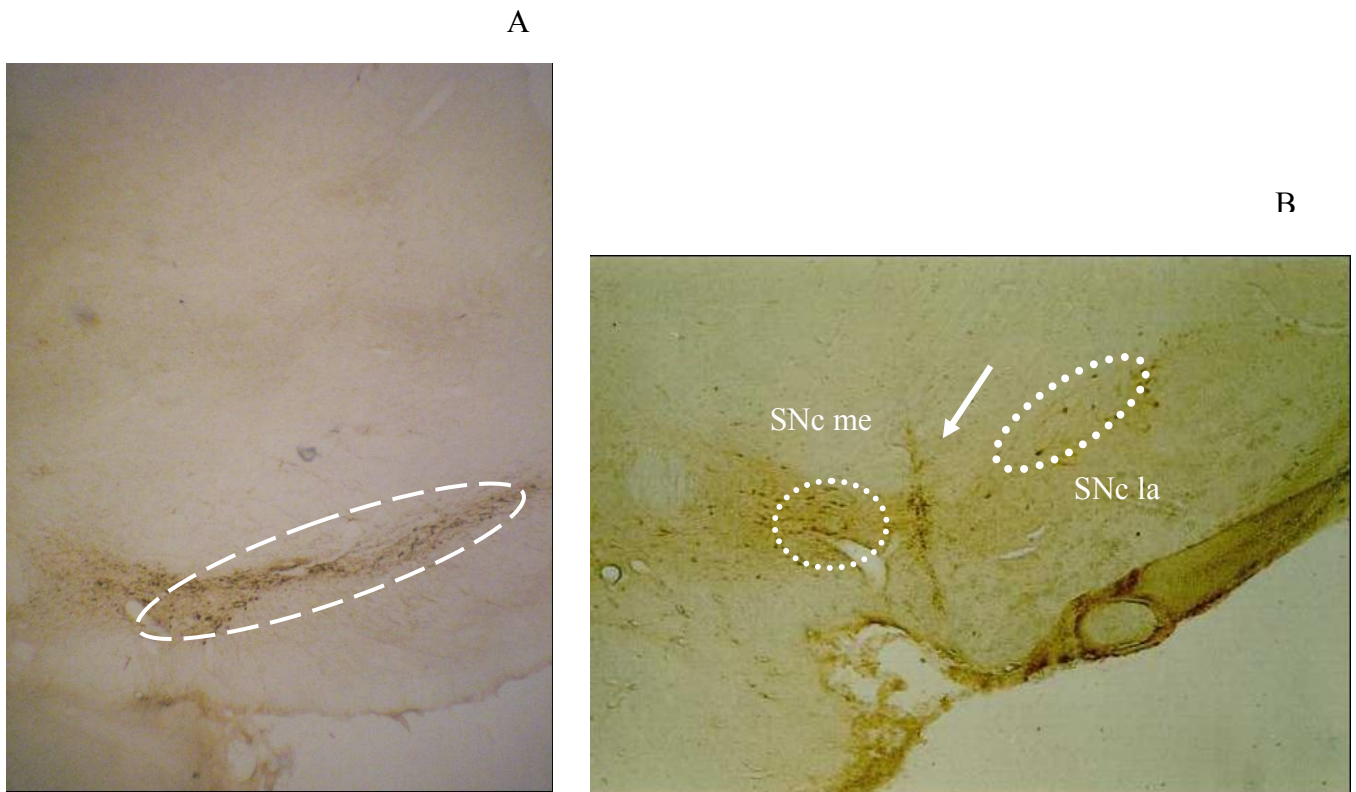


Fig. 28 Microfotografía representativa de la inmunodetección de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en un corte coronal de *substantia nigra compacta* (SNc) de una rata con lesión de la SNc + tratamiento con (-) nicotina (n=8). A. Microfotografía del hemisferio derecho donde se señalan células TH+ en toda la zona que abarca la SNc, a nivel de la coordenada AP: -4.4mm. B. Microfotografía local donde se señalizan los cuerpos celulares dopaminérgicos en las zonas medial (SNc me) y lateral (SNc la) de la SNc. La flecha indica el trazo de la aguja de inyección de la neurotoxina en la zona de la SNc (10x).

Efecto de la aplicación sistémica de (-) nicotina en la expresión estriatal del FNDC y del FNDG en ratas hemiparkinsonizadas.

Con el propósito de abordar alguno de los posibles mecanismos que podían explicar el efecto beneficioso de la administración sistémica de (-) nicotina en el modelo de hemiparkinsonismo por inyección de 6-OHDA, se estudió la expresión estriatal del FNDC y del FNDG.

La técnica de Western Blot empleada por nosotros en este trabajo, resultó ser un método sensible para detectar la cantidad de proteína de FNDC y FNDG expresada en el St. Se obtuvieron bandas de color intenso y bien delimitado (fig. 29A) en todas las corridas electroforéticas. La detección y cuantificación de actina (proteína que se expresa constitutivamente en todas las células) permitió referenciar la concentración del factor neurotrófico a los índices de expresión de proteínas en el St.

Nuestros resultados muestran que la lesión con 6-OHDA en la SNc de las ratas induce un incremento significativo ($p < 0.01$) tanto en la cantidad del FNDC como del FNDG expresado en el St, con respecto a los grupos control sano y falso lesionado en la SNc (Fig. 29 B y C).

El esquema de administración sistémica de (-) nicotina seguido en el presente trabajo produjo un aumento significativo de cantidad del FNDC expresado en el St (Fig. 29B). Por otra parte, en las

ratas hemiparkinsonizadas que recibieron el tratamiento farmacológico, la cantidad del FNDG expresada en el St, se redujo a valores similares a los del grupo control sano (Fig. 29C).

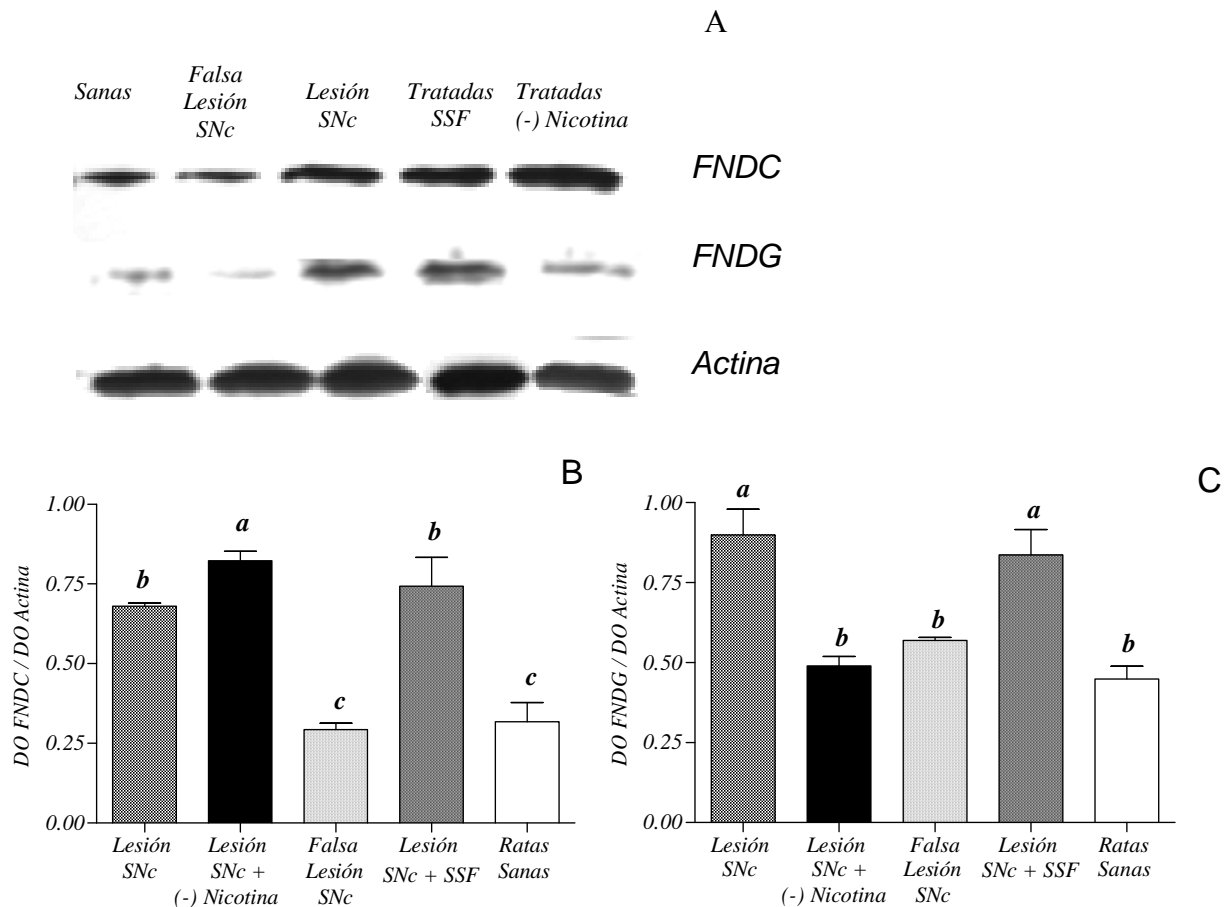


Fig. 29 Comparación de la expresión estriatal de los factores neurotróficos, expresada mediante la relación de la densidad óptica (DO) de cada uno de los factores y la DO de la actina. A. Representación de las bandas correspondientes a la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), del factor neurotrófico derivado de la glía (FNDG) y de la proteína actina en el tejido estriatal de 1 rata de cada grupo. B. Comparación de la expresión estriatal del FNDC ($H_{(4, 18)}=13.27$ $p<0.01$) entre los grupos. C. Comparación de la expresión estriatal del FNDG ($H_{(4, 15)}=11.91$ $p<0.01$) entre los grupos. Grupos Experimentales: ratas con lesión de la *substantia nigra compacta* (SNc) (n=4), ratas con lesión de la SNc + (-) nicotina (n=4), ratas con falsa lesión de la SNc (n=3), ratas con lesión de la SNc + solución salina fisiológica (SSF) (n=4), ratas sanas (n=4). ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis y prueba Student-Newman-Keuls. Fig. 29B. a vs b $p<0.05$, b vs c $p<0.01$, a vs c $p<0.001$; fig. 29C: a vs b $p<0.01$. (Las barras representan $\bar{X} \pm E.E.M$).

En lo concerniente al objetivo específico 3 los resultados más importantes pueden resumirse en un efecto positivo del tratamiento sistémico con (-) nicotina al disminuir la asimetría y mejorar la coordinación y ejecución motora de animales hemiparkinsonizados, en paradigmas como el que se evalúa en la prueba de los puentes transversales. Simultáneamente, la administración de (-) nicotina redujo las concentraciones extracelulares de aminoácidos neurotransmisores en el NPP lo cual

supone un menor desbalance entre las vías “directa” e “indirecta” del circuito motor. Estos hallazgos se acompañan de un efecto neuroprotector de esta sustancia que se traduce en una menor pérdida de los cuerpos celulares dopaminérgicos en la SNc lesionada con 6-OHDA y un incremento en la expresión del FNDC.

Objetivo Específico 4. Efecto de la lesión del NST y la infusión intracerebral de MK-801 sobre las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP de ratas previamente hemiparkinsonizadas.

Comprobación histológica de la localización de la lesión del NST

El estudio morfológico realizado con violeta de cresilo mostró la localización correcta de la inyección de ácido quinolínico en el NST. El área de inyección contempló el plano superior del extremo inferior de la decusación supraóptica, que en las ratas se corresponde con la zona del NST. La Fig. 30 muestra la trayectoria de la aguja de inyección hasta el NST.

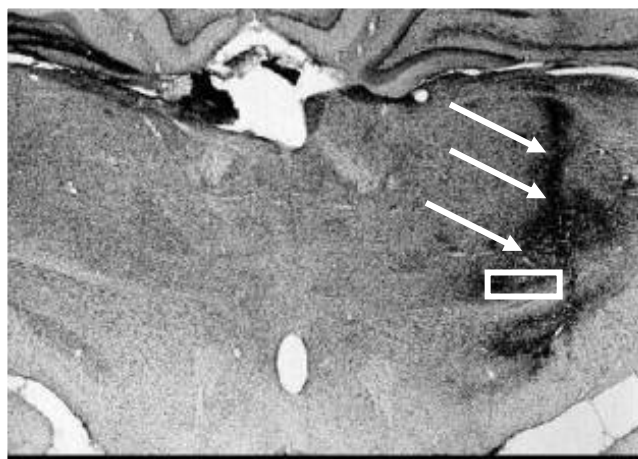


Fig. 30 Microfotografía representativa de una sección coronal de cerebro de rata a nivel de la zona del núcleo subtalámico (NST) (n=8). A. Las flechas indican el trazo de la aguja de inyección de la solución de ácido quinolínico hasta la coordenada ventral correspondiente al NST señalizada con un rectángulo (5x).

Efecto de la lesión excitotóxica del NST sobre la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina y las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP.

Efecto de la lesión del NST sobre la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina

La administración sistémica de D-anfetamina en las ratas con lesión unilateral completa de la SNc produjo un incremento significativo ($p < 0.001$) del número de giros ipsilaterales al hemisferio lesionado en comparación con las ratas controles (falsa lesión de la SNc) (Fig. 31). La lesión excitotóxica del NST de las ratas lesionadas en la SNc, redujo significativamente el número de giros inducidos por D-anfetamina ($p < 0.05$) aunque este grupo conserva diferencias significativas ($p < 0.01$) con las ratas controles (falsa lesión de la SNc y falsa lesión de la SNc y el NST) (Fig. 31).

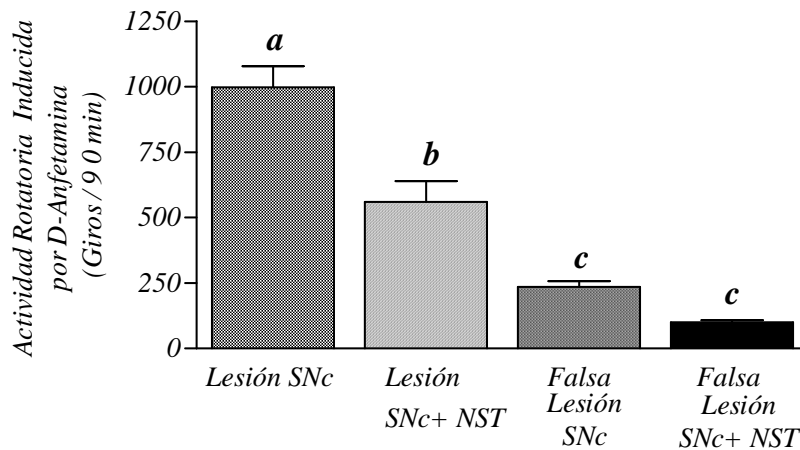


Fig.31 Efecto de la lesión del núcleo subtalámico (NST) en la asimetría motora evaluada a través de la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina (5 mg/kg i.p). Grupos Experimentales: ratas con lesión de la *substantia nigra compacta* (SNc) (n=13), ratas con lesión de la SNc y el NST (n=9), ratas con falsa lesión de la SNc (n=10), ratas con falsa lesión de la SNc y del NST (n=5). ANOVA no paramétrico Kruskal Wallis ($H_{(4, 36)}=9.02$ $p<0.01$) y prueba Student-Newman-Keuls. a vs b $p<0.05$; b vs c $p<0.01$; a vs c $p<0.001$. (Las barras representan $X \pm E.E.M$).

Efecto de la lesión del NST sobre las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP

Seguidamente estudiamos el efecto del tratamiento quirúrgico a través de la lesión del NST, sobre las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP.

Nuestros resultados muestran que la lesión excitotóxica del NST en ratas previamente hemiparkinsonizadas produce una reducción significativa, hasta valores normales ($p<0.001$), de las concentraciones extracelulares de Glu en el NPP en comparación con las ratas con lesión unilateral completa de la SNc que no recibieron este tratamiento quirúrgico (Fig. 32A).

Por otra parte, la lesión del NST disminuyó de manera significativa ($p<0.01$) las concentraciones extracelulares de GABA en el NPP en comparación con las ratas hemiparkinsonizadas sin lesión del NST (Fig. 32B). No obstante, esta disminución no alcanzó valores normales, y la variable se mantiene en una posición intermedia y significativamente diferente entre las ratas hemiparkinsonizadas y las ratas sanas (Fig. 32B).

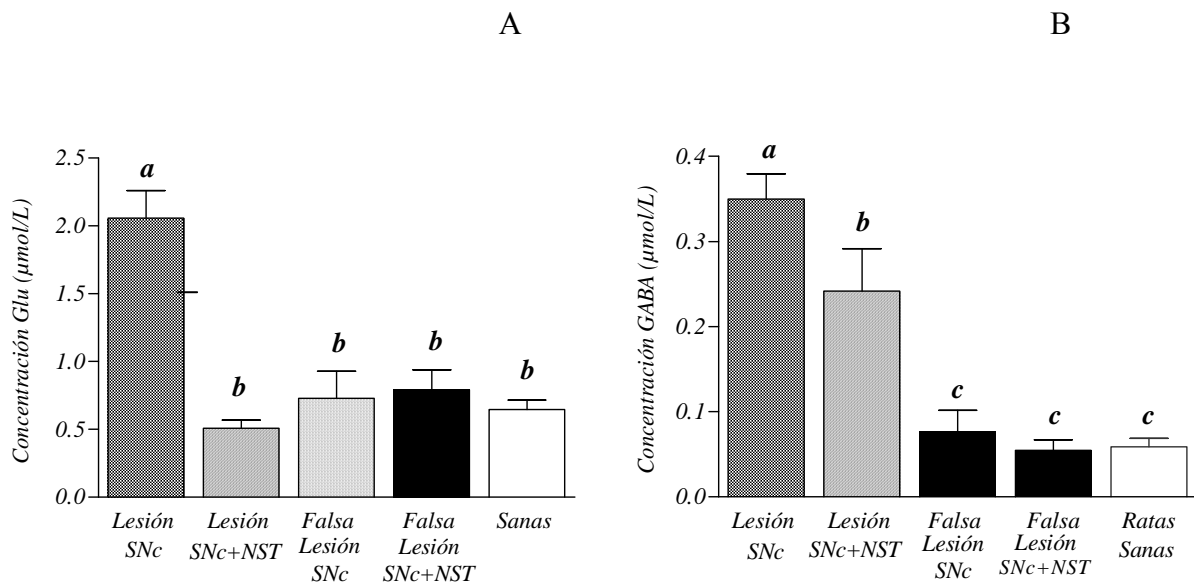


Fig.32 Efecto de la lesión del núcleo subtalámico (NST) en las concentraciones extracelulares de glutamato (Glu) y ácido γ -aminobutírico (GABA) en el núcleo pedunculopontino A. Comparación de la concentración de Glu ($F_{(4, 46)}=23,88$ $p<0.001$) entre los grupos. B. Comparación de la concentración de GABA ($F_{(4, 44)}=14,67$ $p<0.001$) entre los grupos. Grupos Experimentales: ratas con lesión de la *substantia nigra compacta* (SNc) ($n=11$), ratas con lesión de la SNc y del NST ($n=9$); ratas con falsa lesión de la SNc ($n=10$); ratas con falsa lesión de la SNc y del NST ($n=5$), ratas sanas ($n=13$). ANOVA de clasificación simple y prueba de Tukey. Fig. 32A: a vs b $p<0.001$, Fig. 32B: a vs b $p<0.05$, b vs c $p<0.01$, a vs c $p<0.001$. (Las barras representan $X \pm E.E.M$).

Efecto de la infusión intracerebral de MK-801 en el NPP de ratas con lesión de la SNc, sobre las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en este núcleo.

La lesión neurotóxica inducida por 6-OHDA, al igual que en experimentos anteriores, produjo un incremento significativo de las concentraciones extracelulares de Glu ($F_{(2, 181)}=6.68$ $p<0.05$) y GABA ($F_{(2, 133)}=5.76$ $p<0.05$) en el NPP con respecto a las ratas controles (sanas y falsa lesión de la SNc). La infusión intracerebral de MK-801 ($10\mu\text{mol/L}$) en este núcleo produjo una disminución significativa de esta variable después de 20 min de infusión con respecto a las concentraciones basales (antes de la infusión) en los tres grupos experimentales, aunque este comportamiento es más marcado en las ratas con lesión unilateral completa de la SNc (Fig. 33A y B).

El efecto inducido por el MK-801 se mantiene en el grupo de ratas hemiparkinsonizadas hasta dos horas después de finalizada la infusión del antagonista glutamatergico, en que las concentraciones extracelulares de Glu y GABA permanecen significativamente disminuidas con respecto a los valores basales.

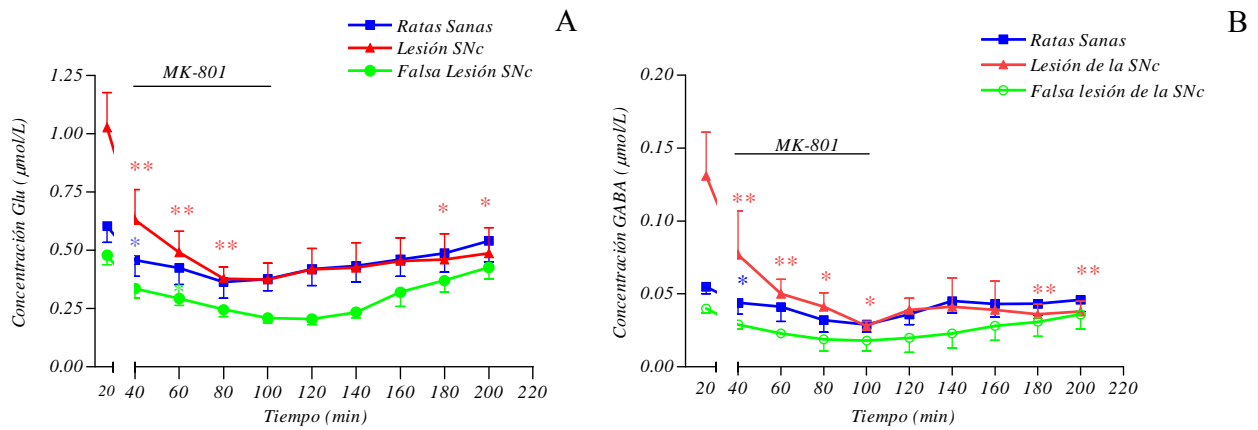


Fig. 33 Efecto de la infusión de MK-801 (10 $\mu\text{mol/l}$) sobre las concentraciones de glutamato (Glu) y ácido γ -aminobutírico (GABA) en el núcleo pedunculopontino. El valor graficado a los 20 min representa el valor promedio de las seis determinaciones basales (sin infusión de MK-801). La barra entre los 40 y 100 min representa el tiempo de infusión de MK-801. A. Comparación de las concentraciones de Glu entre los tiempos de colecta de los dializados ($F_{(9, 186)}=11.2$ $p<0.01$). B. Comparación de la concentración de GABA entre los tiempos de colecta de los dializados ($F_{(9, 135)}=9.22$ $p<0.01$). Grupos Experimentales: ratas sanas (n=10), ratas con lesión unilateral completa de la *substantia nigra compacta* (SNc) (n=9), ratas con falsa lesión de la SNc (n=9). ANOVA bifactorial de medidas repetidas y prueba de Bonferroni * $p<0.05$ ** $p<0.01$. El color del asterisco está en correspondencia con la curva a la que representa. (Las líneas representan $\bar{X}+E.E.M$ para el grupo de ratas con lesión de la SNc y $\bar{X}-E.E.M$ para los restantes grupos).

Con relación al objetivo específico 4, nuestros hallazgos más importantes evidencian un impacto de la lesión neurotóxica del NST disminuyendo la asimetría motora y reduciendo las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP de las ratas hemiparkinsonizadas. Asimismo, el bloqueo local de la neurotransmisión glutamatérgica mediada por receptores NMDA redujo significativamente la concentración de Glu y GABA en el NPP, efecto que permanece en las ratas hemiparkinsonizadas dos horas después de finalizada la infusión de MK-801.

DISCUSIÓN**I. CAMBIOS NEUROQUÍMICOS, MOLECULARES Y MORFOLÓGICOS EN EL NPP DE RATAS HEMIPARKINSONIZADAS****I. Concentraciones extracelulares de Glu y GABA en elNPP**

La mayor parte de los estudios clínicos y experimentales que intentan explicar los trastornos motores relacionados con el síndrome parkinsoniano han prestado especial atención al clásico lazo: corteza motora–St–*globus pallidus*–tálamo–corteza motora. Sin embargo, a las proyecciones desde los GB hasta los núcleos pontinos y de estos a la médula espinal se les ha prestado menor atención (Zweig y cols, 1989; Semba y Fibiger, 1992; Bevan y cols, 2002).

No obstante, un número creciente de evidencias apuntan hacia la participación del NPP en la fisiopatología del parkinsonismo (Aziz y cols, 1998; Pahapill y Lozano, 2000; Takada y cols, 2000). Diferentes estudios han demostrado un incremento en la actividad eléctrica (Breit y cols, 2001) y en la actividad metabólica (Carlsoon y cols, 1999) de las células pontinas en modelos experimentales de EP. A pesar de ellos y hasta donde conocemos, no existen descripciones previas de los cambios en las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP de las ratas hemiparkinsonizadas. Por esta razón, los resultados presentados en el presente trabajo en relación con dichos cambios, constituyen un aporte científico al conocimiento de las modificaciones de la neurotransmisión en el NPP en condición parkinsoniana.

El incremento significativo en las concentraciones extracelulares de Glu en el NPP de las ratas hemiparkinsonizadas, descrito en esta tesis, concuerda con las evidencias de que la neurotransmisión glutamatérgica en los GB se modifica sensiblemente en el parkinsonismo (Bianchi y cols, 2003; Hamani y cols, 2003). Se sabe que la muerte de las células dopaminérgicas de la SNc se acompaña de una pérdida del control inhibitorio que ejerce la DA a través del receptor D₂, sobre la “vía indirecta” del circuito motor de los GB (Gerfen 2000). En consecuencia, se produce un aumento de la transmisión a través de esta vía que involucra al NST cuyas células utilizan Glu como neurotransmisor (Wichmann y De Long, 2002; Hamani y cols, 2003). Por esta razón, pensamos que el incremento de las concentraciones extracelulares de Glu en el NPP de las ratas hemiparkinsonizadas puede responder a la hiperactividad subtalámica por ser este, el núcleo donde se origina la proyección glutamatérgica más prominente que recibe el NPP (Rosales y cols, 1997).

Adicionalmente, este incremento en la actividad del NPP puede contribuir a perpetuar la hiperactividad subtalámica pues se conoce que ambas estructuras (NST y NPP), están conectadas a través de un lazo monosináptico (Semba y Fibiger, 1992; Bevan y Bolam, 1995, Breit y cols, 2006). Orieux y cols describen un incremento significativo en la expresión del ARNm que codifica para la subunidad I de la citocromo oxidasa en las neuronas pontinas que proyectan al NST en ratas

parkinsonizadas, hecho que apunta hacia la participación del NPP en la hiperactividad subtalámica (Orieux y cols, 2000).

Por otra parte, este aumento significativo de Glu en el espacio extracelular del NPP puede ser un elemento clave en el propio funcionamiento de este núcleo en condición parkinsoniana. Se ha señalado en la literatura que las proyecciones glutamatérgicas que alcanzan la SNc tanto desde el NST como desde el NPP pudieran participar de los mecanismos compensatorios que estimulan a las células dopaminérgicas nigrales en etapas presintomáticas de la enfermedad. Pero en estadios más avanzados de esta enfermedad, el incremento de la actividad glutamatérgica excitatoria puede tener un papel deletéreo sobre las células dopaminérgicas (Bezard y cols, 1997a, b y Bezards y Gross, 1998).

Otros estudios han revelado que en ratas parkinsonizadas se produce un incremento significativo de las concentraciones extracelulares de Glu en otras estructuras que al igual que el NPP, reciben aferencias glutamatérgicas procedentes del NST; tal es el caso del GP y la SNr (Hirsch y cols, 2000a). Este aumento pudiera contribuir a perpetuar la hiperactividad del complejo GP/SNr, cuyas descargas gabaérgicas inhibitorias determinan signos como la hipocinesia y la bradicinesia que caracterizan a la EP (Obeso y cols, 2000a; Matsumura, 2005).

En relación con las concentraciones extracelulares de GABA, se encontró un incremento de este neurotransmisor en el NPP de las ratas hemiparkinsonizadas. En nuestro criterio, este hallazgo puede explicarse por la hiperactividad de la SNr y el Gpm. Se conoce que en las ratas, las neuronas glutamatérgicas del NPP reciben una proyección gabaérgica procedente de la SNr (Grofova y Zhiou, 1998; Lee y cols, 2000). Por otro lado, los estudios electrofisiológicos han demostrado que la estimulación de la SNr induce un efecto inhibitorio monosináptico en las neuronas pontinas, el cual parece ser mediado por receptores gabaérgicos GABA_A que se expresan sobre las células del NPP (Saitoh y cols, 2003). Los axones gabaérgicos nigrales que proyectan al NPP emiten colaterales al *colliculus superior*, lo cual ha sugerido que existe una relación funcional entre ambas estructuras mesencefálicas (Cebrián y cols, 2005). La hiperactividad de la SNr y el Gpm constituye un rasgo distintivo de los cambios que se establecen en el funcionamiento de los GB en la condición parkinsoniana (Mitchell y cols, 1985; Rodríguez y cols, 2000).

Asimismo se conoce que el NPP envía proyecciones colinérgicas y glutamatérgicas a la SNr mediada por receptores nicotínicos y glutamatérgicos ionotrópicos respectivamente (Court y cols, 2000; Zhou y cols, 2003). Por lo tanto, no descartamos la existencia de un lazo que conecte de forma recíproca ambas estructuras. En este caso, el incremento de las concentraciones extracelulares de GABA detectadas en nuestro estudio tendría una repercusión fundamental sobre el funcionamiento tanto del NPP como de la SNr.

Conociendo entonces, que las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP se modifican en el modelo de 6-OHDA, y que esta estructura posee una amplia representación de receptores colinérgicos, gabaérgicos, glutamatérgicos y peptidérgicos, nos dimos a la tarea de evaluar el efecto de la lesión neurotóxica de la SNc sobre la densidad de algunas de las poblaciones de receptores mencionadas anteriormente.

2. Densidad de receptores colinérgicos muscarínicos en el NPP y en el St

Los receptores muscarínicos presentes en el NPP tienen características de autorreceptores por tratarse de receptores localizados sobre neuronas colinérgicas del propio núcleo (Vilaro y cols, 1994). Se ha descrito la presencia de los subtipos: M₂, M₃ y M₄ en el NPP de PNH y M₂, M₃ y M₅ en roedores y se sabe que ellos participan en mecanismos de retroalimentación controlando la síntesis y liberación de ACo por las células pontinas (Grofova y Zhiou, 1998; Alcantara y cols, 2001; Waelbroeck, 2003). La activación de las neuronas colinérgicas pontinas proporciona un impulso colinérgico que alcanza a las neuronas dopaminérgicas tanto de la SNc como del ATV (Lee y cols, 2000).

Nuestros resultados indican un incremento significativo de la densidad de receptores colinérgicos muscarínicos tanto en el NPP como en el St derecho ipsilateral a la inyección de 6-OHDA. No conocemos de otros trabajos que exploren cambios en la densidad de receptores colinérgicos muscarínicos en el NPP y el St en el modelo de hemiparkinsonismo por inyección de 6-OHDA. Sin embargo, sí existen trabajos que demuestran la presencia de modificaciones importantes de la neurotransmisión colinérgica en este modelo experimental. Anglade y cols en 1995 señalaron un incremento significativo en el tamaño y número de terminales colinérgicas en la SNc de ratas parkinsonizadas (Anglade y cols, 1995). Este hallazgo habla a favor de la puesta en marcha de mecanismos de neuroplasticidad en la sinapsis colinérgica, pontina-nigral (Winn, 2006). A la vez, es consistente con la hipótesis de que las neuronas colinérgicas pontinas tienen un efecto estimulador de las neuronas dopaminérgicas que sobreviven a la lesión neurotóxica (Bezards y cols, 2001).

Otros autores han señalado la pérdida de neuronas colinérgicas en el NPP en la EP (Hirsch y cols, 1987). En estas condiciones, se ha planteado que los subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos acoplados al sistema de la fosfolipasa (M₁, M₃, M₅) presentes en las neuronas colinérgicas residuales pueden acentuar la estimulación colinérgica de las células dopaminérgicas de la SNc (Yeomans y cols, 2001).

En concordancia con los hallazgos descritos, el aumento en la densidad de receptores muscarínicos en el NPP de las ratas hemiparkinsonizadas detectada en el presente estudio puede formar parte de los cambios neuroplásticos que experimenta el sistema colinérgico en la EP.

En otras estructuras como el hipocampo y el St se conoce que la activación de los subtipos de receptores muscarínicos M₂ y M₄, de localización presináptica, disminuye la transmisión mediada

por glutamato (Scanziani y cols, 1995; Rawls y McGinty, 1998). Es posible que en el NPP de las ratas hemiparkinsonizadas la actividad de los receptores muscarínicos module igualmente la neurotransmisión glutamatérgica, si tomamos en cuenta que este núcleo envía proyecciones y recibe proyecciones glutamatérgicas al NST (Bevan y Bolam, 1995). Este efecto modulador sería clave en el modelo de 6-OHDA que se caracteriza por un incremento de la actividad glutamatérgica a partir de la desinhibición de la “vía indirecta” del circuito motor (Obeso y cols, 2000a).

Por otra parte, no conocemos cual de los subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos contribuye de forma preferencial al incremento en la densidad detectada en nuestro estudio. Por esta razón, sería interesante abordar esta problemática en un futuro empleando ligandos radiactivos selectivos para los distintos subtipos de receptores muscarínicos. Este abordaje nos permitirá dilucidar cual o cuales de ellos están participando de forma predominante en este cambio neuroplástico.

En el caso del St derecho, ipsilateral a la lesión de la SNc, el incremento encontrado en la densidad de receptores muscarínicos es coincidente con los resultados publicados para tejido estriatal de pacientes parkinsonianos (Nordberg y cols, 1985). Adicionalmente, otros autores han señalado que el número de sitios de unión estriatal para los subtipos de receptores muscarínicos se modifica en función del tiempo de evolución de la enfermedad (Piggot y cols, 2003).

Los estudios inmunohistoquímicos y autorradiográficos han mostrado que el St contiene niveles elevados de ACo, receptores colinérgicos muscarínicos y numerosos sitios de alta afinidad para la recaptura de colina (Kasa, 1986). La ACo estriatal está fundamentalmente contenida en las interneuronas colinérgicas cuyos axones se ramifican e inervan a las neuronas estriatales de proyección (Parent y cols, 1995). Estas neuronas integran los impulsos glutamatérgicos excitatorios, corticoestriatales y talámicos, con los impulsos dopaminérgicos nigroestriatales (Rawls y McGinty, 1998, Deutch, 2006). La literatura señala que los receptores muscarínicos estriatales están distribuidos en varias poblaciones celulares: sobre las terminales presinápticas corticoestriatales (subtipos M₁, M₂ y M₄), en las neuronas gabaérgicas espinosas de talla mediana que proyectan al GPI (subtipo M₁, de localización presináptica en la vía St-GPI), así como sobre las neuronas que proyectan a la SNr (subtipo M₄, de localización presináptica en la “vía directa” del circuito motor) (Alcantara y cols, 2001; Yan y cols, 2001).

En este contexto, el incremento de la densidad de receptores colinérgicos muscarínicos estriatales detectado en nuestro estudio adquiere una importancia particular. En el orden presináptico, la activación de los receptores muscarínicos disminuye la liberación de Glu por las terminales corticoestriatales (Rawls y McGinty, 1998). Esta modulación resulta muy importante en la condición parkinsoniana, en la que se describe una hiperactividad de la sinapsis glutamatérgica corticoestriatal secundaria a la denervación dopaminérgica (Calabresi y cols, 2000). En el orden postsináptico, si

consideramos que los subtipos de receptores muscarínicos M_1 y M_4 , están acoplados a vías de señalización diferentes, la activación de ambos simultáneamente puede tener efectos opuestos en las neuronas estriatales de proyección (Zhou y cols, 2002, 2003). Las acciones contrapuestas que ellos ejercen sobre la formación del AMPc y la cascada de eventos moleculares que ello desencadena, contribuye a modular de forma muy fina la actividad de las neuronas estriatofugales (Yan y cols, 2001).

En general pensamos, que el aumento en la densidad de receptores colinérgicos muscarínicos en el St de las ratas hemiparkinsonizadas forma parte de los cambios que operan en el sistema colinérgico en la EP y son consecuencia del desbalance entre el tono dopaminérgico y colinérgico asociado a la pérdida de la innervación dopaminérgica nigroestriatal, que caracteriza a la condición parkinsoniana.

3. Densidad de receptores gabaérgicos BDZ en el NPP

La disminución encontrada en nuestro estudio, en la densidad de receptores BDZ en el NPP derecho, ipsilateral a la inyección de la 6-OHDA, concuerda con las evidencias existentes sobre los cambios en la actividad gabaérgica en la EP (Calon y cols, 1999, 2002, 2003).

Los receptores a neurotransmisores no son entidades estáticas. La destrucción de las terminales nerviosas donde se originan las moléculas neurotransmisoras provoca una supersensibilidad funcional de los sitios postsinápticos (Bezard y Gross, 1998). Esta supersensibilidad se ha definido como un incremento de la afinidad del neurotransmisor por su receptor, así como un aumento en el número de receptores por unidad de área de la membrana postsináptica (Hurley y Jenner, 2006). Contrariamente, la administración de fármacos que inhiban la recaptura o la destrucción de los neurotransmisores incrementando la exposición del neurotransmisor a su receptor, o los cambios que propicien un incremento de la actividad presináptica, suponen una subsensibilidad de los receptores en las neuronas postsinápticas (Bezard y Gross, 1998). Los mecanismos moleculares que median estos efectos se han estudiado para los receptores β -adrenérgicos, en los cuales se conoce que la exposición prolongada a su agonista induce una disminución en la densidad de las proteínas receptoras (Neve y cols, 2004). Para este receptor se ha señalado que estos mecanismos moleculares cursan a través de la fosforilación de la proteína receptora, su unión a proteínas de la familia de las β -arrestina, y desacople de la unión del receptor a la proteína G. Por último, se ha descrito el secuestro o internalización del receptor dentro de un compartimento intracelular (Neve y cols, 2004). Esta secuencia se revierte cuando cesa la exposición del agonista a su receptor.

La cascada de eventos descrita anteriormente constituye una expresión de los mecanismos de plasticidad que a nivel molecular pueden regular la densidad de los receptores en respuesta a cambios de las concentraciones de los neurotransmisores o sus agonistas en la hendidura sináptica (Calne y Zigmond, 1991; Dani y cols, 2001; Viallet y Witjas, 2003).

Las neuronas glutamatérgicas de la *pars dissipata* del NPP reciben una proyección gabaérgica procedente de la SNr mediada por receptores gabaérgicos GABA_A que se encuentran sobre las células pontinas (Saitoh y cols, 2003). En nuestra consideración, la disminución de la densidad de receptores gabaérgicos BDZ encontrada en este estudio en el NPP, obedece a una disminución compensatoria en respuesta al incremento de la actividad gabaérgica procedente del complejo GPM/SNr en la condición parkinsoniana. Esta disminución pudiera ser parte de los mecanismos neuroplásticos moleculares que se ponen en marcha en el modelo de 6-OHDA (Wichmann y De Long, 2002; Viallet y Witjas, 2003).

La literatura señala que el incremento de la descarga inhibitoria gabaérgica sobre el NPP puede contribuir a acentuar la hipocinesia y los trastornos posturales que se presentan en la EP (Florio y cols, 2007; Stefani y cols, 2007). Se han realizado varios intentos experimentales de reducir la actividad gabaérgica en el NPP y en este sentido, los receptores gabaérgicos BDZ adquieren una singular importancia. Así, la microinyección de antagonistas del receptor GABA_A en el NPP, como la bicuculina, disminuye la frecuencia y el tiempo medio de apertura del canal a Cl⁻ y en consecuencia disminuye la diferencia de potencial en la membrana, favoreciendo la descarga de las neuronas glutamatérgicas pontinas (Nandi y cols, 2002). La bicuculina es un antagonista GABA_A que compete con el neurotransmisor por uno o varios sitios de unión al receptor y se ha postulado que uno de ellos es el sitio BDZ (Olsen y DeLorey, 1999). Esta manipulación farmacológica del receptor GABA_A a través de su sitio BDZ en PNH hemiparkinsonizados, repercute en una disminución de la acinesia y otros signos motores que caracterizan a la EP, lo que atribuye a estos receptores un papel fundamental en la fisiopatología de dichos signos y síntomas (Nandi y cols, 2002).

4. Densidad de receptores mu opioides en el NPP

Los cambios en la neurotransmisión peptidérgica en los GB secundarios a la degeneración nigral han sido abordados en la literatura a partir de la década del 90 (Fernández y cols, 1994).

Los resultados de nuestro estudio revelan una disminución en la densidad de receptores *mu* opioides en el NPP del hemisferio lesionado con 6-OHDA. Aunque se sabe que este núcleo posee una representación importante de receptores a péptidos opioides, no se ha descrito ninguna aferencia peptidérgica que alcance el territorio pontino (García-Rill, 1991).

No obstante, las interacciones entre los péptidos opioides y sus receptores, no siempre siguen la vía clásica sináptica de liberación del neurotransmisor en una terminal presináptica y unión a receptores en terminales postsinápticas (Bach-y-Rita, 1993; Akil y cols, 1998). Los péptidos pueden actuar a través de vías alternativas de comunicación como la difusión de sus moléculas hacia receptores de localización extrasináptica (Bach-y-Rita, 1993). Por esta razón se les contempla como neuromoduladores y no como neurotransmisores clásicos (Akil y cols, 1998).

Existe mucha controversia en la actualidad sobre la clasificación de los receptores opioides (Akil y cols, 1998). Dada la existencia de tres familias de ligandos endógenos (encefalinas, endorfinas y dinorfinas) y tres receptores clonados: mu (μ), delta (δ) y kappa (κ), se esperaba una correspondencia de 1:1 que no ha sido probada y varios ligandos pueden asociarse con un mismo receptor (Mansour y cols, 1997; Gutstein y Akil, 2003).

La actividad peptidérgica se modifica sensiblemente en el parkinsonismo (Fernández y cols, 1994; Cannizaro y cols, 2003). Los estudios utilizando ensayos de unión, han revelado marcadas diferencias regionales en el número de receptores a neuropéptidos hallados en cerebro de pacientes parkinsonianos con respecto a sujetos sanos (Fernández y cols, 1994).

Los resultados de nuestro estudio son coincidentes con los publicados por otros autores para otros núcleos del cerebro. Así, la densidad de receptores *mu* opioides, disminuye drásticamente en el St, GP y SN de ratas hemiparkinsonizadas en comparación con los controles sanos (Johansson y cols, 2001).

Se ha descrito una estrecha interacción entre la actividad dopaminérgica y opioide a nivel del St que tiene implicaciones fundamentales para el control motor (Samadi y cols, 2003). Esta interacción se establece a partir de vías de señalización intracelular comunes a ambos sistemas de neurotransmisión que involucran la regulación de la actividad de la enzima adenilato ciclasa y el sistema del AMPc. Por ende, esta interacción mantiene un control muy fino sobre la fosforilación de sustratos proteicos en las neuronas de proyección estriatal (Samadi y cols, 2003).

Asimismo, se conoce que los receptores *mu* opioides están colocalizados junto a los receptores glutamatérgicos NMDA en las terminales corticoestriatales a nivel presináptico (Akil y cols, 1998). La activación simultánea de ambos receptores tiene efectos opuestos sobre la entrada de calcio a la célula, lo cual ha sugerido que los receptores *mu* modulan la liberación de Glu en la sinapsis corticoestriatal (Samadi y cols, 2003).

En condición parkinsoniana, estas interacciones se modifican sensiblemente en el St y probablemente en otros núcleos donde ellas están igualmente presentes (Johansson y cols, 2001). El NPP, es un núcleo donde convergen aferencias glutamatérgicas, gabaérgicas y dopaminérgicas entre otras (Semba y Fibiger, 1992; Bevan y Bolam, 1995; Mena-Segovia y cols, 2004). La inervación dopaminérgica que fisiológicamente alcanza el NPP está severamente comprometida en la EP y sus modelos experimentales (Hamani y Lozano, 2003). Esta disminución del tono dopaminérgico en el NPP pudiera repercutir en la pérdida de la interacción entre este sistema de neurotransmisión y el sistema peptidérgico opioide en esta estructura. Podemos entonces hipotetizar, que la disminución en la densidad de los receptores *mu* opioides en el NPP de las ratas hemiparkinsonizadas detectado en nuestro estudio, pudiera obedecer a la pérdida de la interacción anteriormente descrita a nivel del NPP.

Por último, se le ha atribuido recientemente un papel importante a los receptores *mu* opiodes regulando la supervivencia de los progenitores celulares y activando vías de señalización que promueven señales de supervivencia y proliferación celular (Iglesias y cols, 2003; Harburg y cols, 2007). La disfunción de los sistemas peptidérgicos mediado por receptores *mu* se ha asociado recientemente al disparo de mecanismos de muerte celular (Harburg y cols, 2007). En este sentido la disminución en la densidad de receptores *mu* opioides en el NPP de las ratas hemiparkinsonizadas pudiera estar vinculada a la disfunción del sistema peptidérgico en este núcleo donde nosotros detectamos la ocurrencia de un proceso de muerte celular.

5. Muerte celular en el NPP de ratas hemiparkinsonizadas

La literatura señala la pérdida de aproximadamente el 40-50% de las células colinérgicas del NPP, específicamente en su parte lateral en la EP y en la parálisis supranuclear progresiva (Hirsch y cols, 1987). Zweig y cols en 1989 encontraron una fuerte correlación entre la pérdida de células dopaminérgicas de la SNc y la de células presumiblemente colinérgicas en el NPP de sujetos parkinsonianos fallecidos (Zweig y cols, 1989). Este hallazgo ha sugerido que ambos grupos celulares pudieran sufrir el mismo tipo de proceso destructivo (Pahapill y Lozano, 2000).

El tema de la muerte celular en el NPP ha sido menos abordado en los modelos experimentales de EP y nuestros resultados proveen la primera descripción de muerte celular pontina en el modelo de hemiparkinsonismo por inyección de la neurotoxina 6-OHDA. Sin embargo, el método empleado por nosotros para identificar la fragmentación del ADN (células TUNEL+), sin la utilización de doble marcaje, no permite distinguir entre neuronas y glía o entre fenotipos neuronales (glutamatérgicos o colinérgicos). Por esta razón, no podemos asociar las células muertas encontradas en nuestro estudio a un fenotipo particular.

Por otra parte, Heise y cols publicaron que la morfología, la distribución y el número de células colinérgicas en el NPP de primates y ratas hemiparkinsonizadas no difirió de los controles sanos (Heise y cols, 2005).

Este resultado puede explicarse tomando en cuenta que el grupo de Heise empleó la enzima óxido nítrico sintetasa como marcador de neuronas colinérgicas vivas. Por otra parte, la neurotoxina 6-OHDA fue inyectada en la vía nigroestriatal lo que supone una muerte retrógrada más lenta de las células dopaminérgicas de la SNc, y la generación de un modelo de hemiparkinsonismo parcial que simula las etapas iniciales presintomáticas de la EP (Carman y cols, 1991; Sauer y Oertel, 1994; Dowd y Dunnett, 2005; Heise y cols 2005). En nuestra consideración, debe abordarse un futuro estudio de doble marcaje de TUNEL y marcadores selectivos para neuronas colinérgicas o glutamatérgicas, que permitiría dilucidar la naturaleza exacta de las células comprometidas en el proceso de muerte detectado en el NPP de las ratas hemiparkinsonizadas.

El proceso de muerte celular que tiene lugar en el NPP pudiera explicarse por el desequilibrio

neuroquímico caracterizado por un aumento significativo del tono glutamatérgico, junto a la pérdida de la innervación dopaminérgica procedente de la SNc. Posiblemente, cada uno de estos cambios aporte señales importantes que en conjunto pudieran convertirse en eventos disparadores de la muerte celular.

El incremento del tono glutamatérgico en el NPP, representado en nuestro estudio por un aumento de las concentraciones extracelulares de Glu, se asocia al incremento en las concentraciones intracelulares de calcio más allá de las posibilidades que ofrecen los mecanismos homeostáticos que mantienen dichas concentraciones en valores constantes (100 nM) (Hirsch y cols, 2000b; Dingledine y Bain, 1999; Nakatsu y cols, 2006). La toxicidad celular mediada por un incremento de la actividad glutamatérgica, frecuentemente referida como excitotoxicidad, es considerada un factor común a diferentes enfermedades neurológicas tales como la epilepsia, las enfermedades neurodegenerativas y el daño isquémico entre otras (Obrenovitch, 2001).

Las células del NPP que están bajo la influencia del aumento de la neurotransmisión glutamatérgica, también pudieran ser susceptibles al daño oxidativo. Los procesos de excitotoxicidad implican el fracaso en el funcionamiento tanto de las bombas iónicas dependientes de ATP como de los procesos metabólicos mitocondriales y estos fallos de conjunto, pueden promover un incremento del estrés oxidativo intracelular (Martín, 2001; Schubert y Piasecki, 2001).

Por otra parte, otros eventos relacionados con el incremento en la producción intracelular de radicales libres y la muerte celular, pudieran asociarse con la pérdida del tono dopaminérgico en las células pontinas. Se sabe que la administración de fármacos agonistas de los receptores dopaminérgicos D₁ atenúa el desarrollo de los procesos de muerte celular necrótica de origen oxidativo en cultivo de células corticales de ratón (Hoh y Gwag, 1997).

La estimulación glutamatérgica, en ausencia de innervación dopaminérgica, promueve la activación de una cascada de vías de señalización intracelular que involucra a la familia de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAP, del inglés, Mitogen-activated kinase). Esta familia de proteínas participa en la activación de las subunidades del receptor NMDA lo cual pudiera tener un efecto sinérgico con el incremento de las concentraciones extracelulares de Glu en el NPP y contribuir a perpetuar los mecanismos excitotóxicos de muerte celular (Skapper y cols, 2001).

Así, en nuestro estudio, en las neuronas pontinas del hemisferio lesionado pudieran confluír los mecanismos mencionados anteriormente que se derivan del aumento de la neurotransmisión glutamatérgica y la pérdida de la aferencia dopaminérgica procedente de la SNc.

El escaso número de células que expresaron positividad a TUNEL y DAPI (indicativo de muerte apoptótica) en el presente estudio, nos hace pensar que, en el NPP la muerte celular siga un curso necrótico. No obstante, no descartamos la posibilidad de que pueda también presentarse muerte apoptótica. Inicialmente la positividad a TUNEL fue descrita como evidencia de la presencia de un

proceso apoptótico, aunque en la actualidad se sabe que este es un marcador tanto de mecanismos de muerte de origen apoptótico como necrótico (Bahr y cols, 2002; Jordán, 2003). La literatura actual sugiere que los procesos apoptóticos y necróticos transcurren con formas morfológicas intermedias (Martín, 2001). De modo que la habilidad de la célula para ejecutar su programa de muerte puede ser modificado por un daño a las células vecinas o un daño celular impuesto. Este último, conduce a una falla energética y a la interrupción de las etapas de la muerte celular programada con promoción de las cascadas necróticas correspondientes (Schmechel, 1999; Bernhardt, 2004).

Con respecto al NPP izquierdo, donde no se observó inmunorreactividad a TUNEL, este hallazgo nos indica que la actividad pontina contralateral a la inyección de la neurotoxina 6-OHDA se conserva intacta. Este hallazgo refuerza el papel que desempeña el desbalance de los diferentes sistemas de neurotransmisión asociado a la condición parkinsoniana en el disparo de mecanismos de muerte celular en estructuras como el NPP.

Los resultados discutidos hasta este momento nos permiten afirmar que la lesión neurotóxica de la SNc por inyección de la neurotoxina 6-OHDA se acompaña de un aumento de las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP, que puede obedecer al desbalance entre las vías “directa” e “indirecta” de los GB que caracteriza a la EP. Asimismo, se presentan cambios moleculares a nivel de la densidad de las poblaciones de receptores colinérgicos muscarínicos, gabaérgicos BDZ y *mu* opioides en el NPP, que en su conjunto parecen responder a mecanismos compensatorios de ajuste que se instalan en un intento por contrarrestar el desbalance entre los sistemas de neurotransmisores en condiciones de denervación dopaminérgica. Paralelamente a la ocurrencia de estos cambios se presenta un proceso de muerte celular en el NPP ipsilateral a la inyección de la neurotoxina 6-OHDA, a lo cual puede estar contribuyendo el incremento de las concentraciones extracelulares de Glu y la pérdida de la innervación dopaminérgica nigro pontina entre otros factores los que pueden erigirse en eventos disparadores de mecanismos de muerte celular por excitotoxicidad.

II. EFECTO NEUROPROTECTOR DEL TRATAMIENTO SISTÉMICO CON MK-801 EN RATAS HEMIPARKINSONIZADAS

1. Efecto sobre los trastornos motores y la presencia de células dopaminérgicas

Nuestros resultados indican que el esquema de administración sistémica del antagonista glutamatérgico MK-801 seguido en el presente trabajo modifica el cuadro de parkinsonismo que produce esta neurotoxina. En general, las ratas hemiparkinsonizadas y tratadas con MK-801 presentan menor latencia de escape y mayor latencia de caída que las ratas hemiparkinsonizadas que no recibieron tratamiento farmacológico. Igualmente, las ratas tratadas con el antagonista

glutamatérgico presentan menor asimetría motora, valorada a partir del número de giros inducidos por D-anfetamina.

No existe actualmente un tratamiento neuroprotector eficaz para la EP capaz de enlentecer de forma eficiente o revertir el proceso neurodegenerativo una vez que éste se ha instalado (Savitt y cols, 2006). Sin embargo, en los modelos experimentales de la EP se ha abordado el efecto de disminuir la actividad glutamatérgica con lesiones tempranas del NST, así como aplicando esquemas de tratamiento, fundamentalmente con antagonistas de los receptores NMDA, con resultados promisorios (Brouillet y Beal, 1993; Piallat y cols, 1996; Hadj Tahar y cols, 2004).

Los resultados obtenidos a partir de los estudios con lesiones selectivas del NST previos a la lesión de la SNc indican un efecto neuroprotector de este tratamiento sobre las células nigrales (Piallat y cols, 1996; Paul y cols, 2004). Estos hallazgos han sugerido que la vía glutamatérgica NST-SNc desempeña un papel fundamental en la degeneración de las células dopaminérgicas de la SNc, dando paso a la administración de drogas antiglutamatérgicas como tratamiento en la EP (Sonsalla y cols, 1998).

La literatura sugiere a partir de estudios en modelos de EP, que el bloqueo de los receptores glutamatérgicos NMDA puede aliviar los síntomas parkinsonianos y aumentar la efectividad de la terapia dopaminérgica (Hadj Tahar y cols, 2004). Se sabe que en roedores, la administración de bajas dosis de MK-801 puede tener una acción sinérgica con los fármacos dopaminérgicos y mejorar la acinesia inducida por la deficiencia de DA (Marin y cols, 1996). No se conoce con exactitud la localización del receptor NMDA a través del cual los antagonistas administrados sistémicamente producen su efecto beneficioso. Los receptores NMDA estriatales y los de localización subtalámica, parecen ser fuertes candidatos para mediar los efectos de estos fármacos en la EP. La inyección local de antagonistas glutamatérgicos en el St rostral y en el NST tiene un claro efecto antiparkinsoniano (Blandini y cols, 2001b, Nash y Brotchie, 2002, Hallet y Standaert, 2004).

En relación con los resultados de nuestro estudio, el esquema de administración empleado coincide con el utilizado por otros autores y responde a dos efectos del MK-801 descritos en la literatura: incremento de la expresión estriatal de dinorfinas (Campbell y cols, 2006), y modificación en la frecuencia de descarga de las neuronas glutamatérgicas subtalámicas (Allers y cols, 2005).

La administración del antagonista NMDA previa a la inyección de 6-OHDA aplicada en nuestro estudio, obedece al efecto del MK-801 potenciando la expresión génica estriatal de las dinorfinas en las neuronas que dan origen a la “vía directa” (Campbell y cols, 2006). Este efecto pudiera prevenir la disminución en la transmisión estriatonigral que se instala tempranamente en el modelo de 6-OHDA (Robinson y cols, 1994; Campbell y cols, 2006). No obstante, se ha descrito que la muerte de las células dopaminérgicas de la SNc en roedores inducida por 6-OHDA, sigue un curso que dura 4 semanas, al término de las cuales se establecen de forma irreversible la asimetría motora y los

restantes síntomas que caracterizan al modelo (Johnston y cols, 1999). Durante este tiempo, se produce un incremento gradual de la actividad glutamatérgica, y específicamente a los quince días se ha descrito el pico de actividad glutamatérgica de origen subtalámico, el cual antecede a la aparición de los síntomas parkinsonianos (Bezard y cols, 1999, Vila y cols, 2000). La segunda y tercera administración de MK-801 aplicadas en nuestro estudio intentan bloquear la exposición de las células dopaminérgicas a la aferencia glutamatérgica incrementada en un período crítico de activación subtalámica (Vila y cols, 2000).

De acuerdo a nuestros resultados en la prueba de los puentes transversales, la ejecución motora de las ratas hemiparkinsonizadas no tratadas con MK-801 se caracterizó por una postura asimétrica que compromete el equilibrio y el soporte en una superficie longitudinal angosta. El hemicuerpo contralateral a la lesión de la SNc no participó de los ajustes posturales ni de la locomoción, lo cual comprometió la velocidad y calidad de ejecución de la prueba.

Otros autores han evaluado los impedimentos motores de las ratas hemiparkinsonizadas a través de pruebas conductuales que, al igual que la utilizada en el presente estudio, no requieren estimulación farmacológica. Whishaw y cols en 1997, señalaron que las ratas con lesión unilateral de la SNc mostraban disfunciones motoras en los dos hemicuerpos con predominio de las mismas en el hemicuerpo contralateral a la lesión de la SNc (Whishaw y cols, 1997). Asimismo, Johnston y cols en 1999, señalaron que las ratas hemiparkinsonizadas realizan cuartos de giros espontáneamente (Johnston y cols, 1999). Estos autores hipotetizaron que los giros pueden asociarse a una inclinación preferencial de los músculos del cuello, del tronco y de las extremidades anteriores, resultado de la dificultad en lograr la estabilidad postural, al trasladar la posición del centro de gravedad del cuerpo a las extremidades “sanas” (Johnston y cols, 1999).

En nuestro estudio, la ejecución motora de las ratas tratadas con MK-801 tuvo una mejoría notable. Este grupo de ratas alcanzó más rápido la plataforma que las ratas hemiparkinsonizadas que no recibieron tratamiento farmacológico. Asimismo, las ratas tratadas con MK-801 exhibieron una mejor estrategia de soporte y equilibrio que las ratas hemiparkinsonizadas sin tratamiento farmacológico. Esta ejecución, se tradujo en una mayor latencia de caída en todos los puentes con independencia del diámetro y la forma de estos.

Al mismo tiempo, las ratas tratadas con MK-801 mostraron errores relacionados con la sujeción eficaz del puente. Estos errores se acentuaron a medida que disminuyó el diámetro del puente, lo que propició que las ratas tratadas con MK-801 mostraran una calidad de ejecución similar a la de las ratas hemiparkinsonizadas en los puentes de menores diámetros (1 cm).

La ejecución en los puentes de mayores ancho y diámetro no requiere ajustes finos de la fuerza y la coordinación del movimiento, mientras que los puentes menores demandan mayor precisión y exactitud para lograr una ejecución motora óptima (Thullier y cols, 1996).

Nuestros resultados sugieren que los mecanismos que subyacen en el control de la coordinación motora más burda están conservados en los animales tratados con el antagonista glutamatérgico MK-801. Entretanto, la administración de este fármaco no es suficiente para corregir los trastornos de la coordinación motora y postural más fina.

La prueba de los puentes transversales junto a otros paradigmas conductuales espontáneos se ha aplicado para evaluar deficiencias motoras sutiles que escapan al efecto de una prueba farmacológica en modelos experimentales de enfermedades que cursan con trastornos del movimiento (Amalric y cols, 1995; Thullier y cols, 1996; Schallert y cols, 2000; Blandini y cols, 2001a; Carvalho y Nikkhah, 2001; Kelsey y cols, 2004, Phillips y cols, 2006).

Amalric y cols en 1995, demostraron que la administración sistémica de MK-801 revirtió parcialmente el tiempo de reacción mostrado por las ratas hemiparkinsonizadas para liberar una palanca en respuesta a la incidencia previa de luz (Amalric y cols, 1995). Kelsey y cols en el 2004, demostraron que las ratas hemiparkinsonizadas tratadas con MK-801, mejoraron el ajuste postural contralateral, sin afectar el desempeño de la extremidad ipsilateral a la lesión de la SNc. En contraste, las ratas no tratadas con MK-801, presentaron una deficiencia evidente en el número de pasos correctores ejecutados con la extremidad contralateral (Kelsey y cols, 2004).

Se conoce que el receptor NMDA regula la actividad del receptor dopaminérgico D₁ a través de una interacción directa proteína-proteína. Así la estimulación del receptor NMDA puede incrementar la expresión del receptor D₁ en la membrana celular mientras que la oligomerización entre los receptores NMDA y D₁ puede prevenir la internalización del receptor dopaminérgico D₁ y su desensibilización siguiendo su estimulación. Este efecto modulador puede explicar la habilidad de los antagonistas del receptor NMDA para atenuar los trastornos motores tanto en los pacientes parkinsonianos como en los modelos experimentales de la EP (Hurley y Jenner, 2006).

En relación con el estudio de la asimetría motora a través de la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina, nuestros resultados indican una disminución significativa del número de giros en las ratas tratadas con MK-801. Esta disminución puede explicarse considerando dos aspectos fundamentales que no se excluyen mutuamente: la disminución de la asimetría en la actividad glutamatérgica y la menor pérdida de cuerpos celulares dopaminérgicos en la zona del ATV.

Se sabe que la administración de antagonistas glutamatérgicos revierte, al menos, algunas de las cascadas de cambios neuroquímicos que se desencadenan en los GB posterior a la denervación dopaminérgica (Blandini y cols, 2001b). Vila y cols en 1999, señalaron un incremento de la expresión del ARNm de la subunidad I de la citocromo oxidasa en el NST de ratas hemiparkinsonizadas que se revirtió con la administración sistémica de MK-801 (Vila y cols, 1999). Otros autores han enfatizado en que los antagonistas NMDA pudieran alterar el impacto de la actividad glutamatérgica subtalámica sobre sus núcleos diana tanto en la tasa como en el patrón de descarga

(Greenamyre y O'Brien, 1991). Blandini y cols, en el 2001, demostraron que la infusión local de antagonistas NMDA como el MK-801 en el NST, reduce drásticamente los giros inducidos por D-anfetamina en ratas hemiparkinsonizadas (Blandini y cols, 2001a y b).

La disminución de la conducta rotatoria se ha tomado como una medida de compensación de la asimetría motora que exhiben las ratas hemiparkinsonizadas (Zigmond y Stricker, 1984). Si consideramos la vía de administración sistémica del MK-801 utilizada en el presente estudio, es posible que el tratamiento farmacológico actúe reduciendo el desbalance en la actividad glutamatérgica subtalámica entre ambos hemisferios (Hallet y Standaert, 2004). Este efecto pudiera atenuar la asimetría motora de las ratas y en consecuencia reducir la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina.

Por otra parte, nuestros resultados sugieren que el tratamiento con MK-801 posee un efecto protector del daño neurotóxico de los cuerpos celulares dopaminérgicos en la zona del ATV. El ATV forma parte del sistema dopaminérgico mesolímbocortical y proyecta al núcleo *accumbens* (Björklund y Lindvall, 1984).

En términos de asimetría motora en el modelo de 6-OHDA, Metz y Whishaw en el 2002, publicaron que las ratas con bajo índice de actividad rotatoria mostraron un pequeño número de células dopaminérgicas intactas en la parte lateral de la *substantia nigra* y en el ATV. Entretanto, ninguna de las ratas con alto índice de rotaciones mostró cuerpos celulares residuales en estas áreas (Metz y Whishaw, 2002).

Asimismo, está descrito que la reinervación de la zona que ocupa el ATV mediante el trasplante de células mesencefálicas, induce una disminución en el número de giros y un comportamiento en meseta de esta variable para un pequeño número de neuronas dopaminérgicas sobrevivientes (Brundin y cols, 1987).

Los experimentos con células mesencefálicas fetales trasplantadas en el St denervado de DA en roedores demostraron una fuerte correlación entre la reducción del número de giros y el logaritmo del número de neuronas que sobreviven en el St trasplantado, lo cual sugiere un comportamiento no lineal a la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina (Brundin y cols, 1987; Kirik y cols, 1998).

Aún cuando en el presente estudio no se cuantificó el número de células dopaminérgicas observadas en el ATV, pensamos que desde el punto de vista cualitativo la presencia de células en esta área en los animales tratados con MK-801 fue mayor que en los que no recibieron tratamiento farmacológico. En este sentido, nuestros resultados son coincidentes con los publicados con anterioridad (Metz y Whishaw, 2002). Así, en nuestra consideración, la menor pérdida de cuerpos celulares dopaminérgicos en el ATV de las ratas hemiparkinsonizadas y tratadas con MK-801 puede ser parte del sustrato neural que explique la disminución de la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina en este grupo de ratas.

2. Concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP

Nuestros resultados muestran una reducción de las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP de las ratas tratadas con MK-801 e inyectadas con 6-OHDA. Estos hallazgos pueden estar relacionados con el efecto del tratamiento farmacológico atenuando la actividad glutamatérgica corticoestriatal y corrigiendo el desbalance de otros neurotransmisores como la DA, lo cual le atribuiría un efecto neuroprotector al tratamiento aplicado.

En condiciones fisiológicas, los impulsos dopaminérgicos nigrales y las terminales glutamatérgicas corticales convergen en las neuronas de proyección estriatal (Calabresi y cols, 2000). En el St se produce una interacción muy fina entre las sinapsis glutamatérgicas corticoestriatales y las dopaminérgicas nigroestriatales (Smith y cols, 1998). En condición parkinsoniana se produce un desbalance en la neurotransmisión estriatal. La denervación dopaminérgica causa dos efectos que involucran principalmente a la transmisión excitatoria estriatal: incremento de la amplitud y frecuencia de los potenciales sinápticos despolarizantes mediados por Glu, y la pérdida de la plasticidad sináptica corticoestriatal (Calabresi y cols, 2000; Deutch, 2006). Ambos efectos convergen en el incremento de la descarga de potenciales de acción de las células estriatales cuando estas son despolarizadas por la descarga de la terminal presináptica corticoestriatal (Groenewen, 2003). Este efecto es consistente con el incremento de la liberación de Glu a partir de las terminales corticoestriatales detectado en ratas hemiparkinsonizadas (Yamamoto y Davis, 1992).

Por otra parte, los estudios morfológicos demuestran que la denervación dopaminérgica causa cambios estructurales en el St que son capaces de interferir con la generación de los mecanismos de plasticidad sináptica corticoestriatal (Chase, 2004; Deutch, 2006). Las espinas dendríticas de las neuronas estriatales, se reducen en número, forma y tamaño en el St de las ratas parkinsonizadas (Chase y Justin, 2000; Chase, 2004). Precisamente las espinas dendríticas se han propuesto como el sitio anatómico para la expresión de la plasticidad sináptica corticoestriatal (Chase, 2004). Por lo tanto, el remodelamiento de estas estructuras neuronales puede impedir el desarrollo de los mecanismos de potenciación o depresión de la eficiencia de la transmisión sináptica estriatal (Calabresi y cols, 2000; Chase, 2004).

La administración sistémica de antagonistas de los receptores glutamatérgicos NMDA tiene múltiples efectos sobre el funcionamiento de los núcleos que forman los GB (Vila y cols, 1999, 2000). Sin embargo, no existen referencias previas en la literatura que aborden el efecto de la administración sistémica de MK-801 en el modelo de 6-OHDA sobre la neurotransmisión mediada por Glu y GABA en el NPP por lo cual los resultados del presente estudio constituyen un aporte al conocimiento en este campo.

Recientemente, se ha publicado una reducción en la tasa de descarga y un cambio en el patrón de actividad eléctrica de las células glutamatérgicas del NST de ratas hemiparkinsonizadas bajo el

efecto de la administración sistémica de MK-801 (0.1-0.2mg/kg de peso) (Allers y cols, 2005). Aunque la dosis utilizada en nuestro estudio es superior, pensamos que este efecto sobre las células subtalámicas pudiera también estar presente y modular la liberación de Glu en el NPP.

Se sabe que la administración local de MK-801 en el St, tiene efectos diferentes en dependencia de la localización de las inyecciones intraestriatales. Este efecto diferencial está en concordancia con una distribución topográfica también diferencial de los receptores NMDA dentro del territorio estriatal (Nash y Brotchie, 2002). Así, la perfusión de MK-801 en la zona donde se originan las neuronas de proyección que forman la vía St-GPI, puede tener efectos parkinsonizantes que se atribuyen a la desinhibición de este circuito. En contraposición, la inyección de este antagonista en: las neuronas estriatofugales que dan origen a la vía St-SNr, en el NST o la SNr, produce marcados efectos antiparkinsonianos (Marti y cols, 2000).

A partir de los hallazgos descritos anteriormente, podemos hipotetizar que la administración sistémica de MK-801 seguida en el presente estudio pudiera corregir algunos de los efectos de la denervación dopaminérgica sobre la neurotransmisión excitatoria corticoestriatal. El restablecimiento de la plasticidad sináptica corticoestriatal junto al bloqueo de los receptores glutamatérgicos NMDA localizados sobre las células estriatales, pudieran atenuar el desbalance entre la vía “directa” e “indirecta” del circuito motor de los GB asociada a la denervación dopaminérgica. La reducción de las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP de las ratas hemiparkinsonizadas y tratadas con MK-801 detectada en nuestro estudio pudiera responder al efecto del fármaco disminuyendo el desbalance del circuito motor.

El estudio del efecto del bloqueo sistémico de la transmisión glutamatérgica en las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP reviste especial importancia ya que este núcleo ejerce un control sobre los movimientos voluntarios de varias partes del cuerpo, en estrecha asociación con otros núcleos del cerebro (Matsumura, 2005). Se sabe que en el NPP convergen impulsos corticales procedentes de zonas motoras de corteza, y que los mapas que representan las diversas partes del cuerpo están conservados a este nivel (Matsumura y cols, 2000). Otros estudios han reforzado la participación del NPP en la iniciación y modulación de la marcha y se ha señalado que sus neuronas glutamatérgicas están relacionadas con la iniciación de los movimientos programados mientras que la actividad de las neuronas colinérgicas está vinculada al mantenimiento de un patrón de marcha estable, seguro, constante y uniforme (García-Rill, 1996; Bhidayasiri y cols, 2002; Hathout y Bhidayasiri, 2005).

Nuestros hallazgos sugieren que el bloqueo farmacológico de los receptores NMDA inmediatamente antes de inyectar la neurotoxina 6-OHDA y con dos administraciones de refuerzo, mejora la asimetría, la coordinación y la ejecución en paradigmas motores que exploran la sujeción, locomoción y ajustes posturales. A su vez, este tratamiento restaura las concentraciones

extracelulares de GABA en el NPP y disminuye significativamente las concentraciones extracelulares de Glu con respecto al estado parkinsoniano. Los cambios en la neurotransmisión aminoacídica en el NPP, las menores concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP y la menor pérdida de cuerpos celulares dopaminérgicos en el ATV pudieran ser parte del sustrato morfofisiológico que sustenta estos efectos.

III. EFECTO NEUROPROTECTOR DEL TRATAMIENTO SISTÉMICO CON (-) NICOTINA EN RATAS HEMIPARKINSONIZADAS

1. Efecto sobre los trastornos motores

Nuestros resultados indican que el tratamiento sistémico con el agonista de los receptores colinérgicos nicotínicos, (-) nicotina, aplicado en el presente estudio, promovió una mejoría motora en los animales que se tradujo en menores latencia de escape y número promedio de errores en los puentes de mayores ancho y diámetro (2.5 cm) en comparación con las ratas hemiparkinsonizadas que no recibieron tratamiento farmacológico. No obstante, esta mejoría se pierde en los puentes menores, en que la ejecución motora de las ratas tratadas con (-) nicotina, no difiere de las ratas hemiparkinsonizadas sin tratamiento farmacológico. Igualmente, la administración sistémica de (-) nicotina redujo de forma importante la asimetría motora, evaluada a través de la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina.

Varios autores han propuesto un efecto neuroprotector de la exposición a nicotina sobre el sistema dopaminérgico a partir de una relación inversa entre la adicción a esta sustancia y la incidencia de EP (Morens y cols, 1995).

El esquema de administración de (-) nicotina aplicado en el presente estudio, es referido en la literatura como administración subcrónica y coincide con el aplicado para estudiar el papel neuroprotector de esta sustancia en modelos de EP por administración de agentes quelantes (Maggio y cols, 1998). En nuestro trabajo, suministramos la (-) nicotina inmediatamente antes de la inyección de 6-OHDA con dos propósitos. El primero de ellos consistente en estimular tempranamente los mecanismos promotores de la liberación de FNT, y el segundo obedece a las propiedades antioxidantes de la (-) nicotina, que pudieran atenuar los efectos de la inyección de la neurotoxina 6-OHDA (Jenner, 1998; Quick y Kulak, 2002). La literatura señala que aunque la (-) nicotina se inactiva rápidamente, una dosis de 1 mg/kg s.c puede cruzar la barrera hematoencefálica y alcanzar el cerebro en aproximadamente 8 s. Para estas condiciones se ha estimado una concentración intracerebral de 5 nmol/l de nicotina, que mantiene los receptores nicotínicos en un estado desensibilizado por alrededor de 8 h (Levin, 2002). En nuestro estudio las dos dosis siguientes administradas cada 30 min intentan mantener y potenciar el efecto inicial. Se administraron dosis de refuerzo siguiendo el mismo esquema 7, 14 y 21 días después de la lesión de la SNc para reforzar el

efecto de la exposición a esta sustancia (Brust, 2000; Rowell, 2002). Estas últimas dosis intentan mantener el apoyo trófico y promover simultáneamente la liberación de DA estriatal con el propósito de suplir la deficiencia dopaminérgica asociada a la inyección de la neurotoxina 6-OHDA (Jones y cols, 2001; Wonnacott y cols, 2002, 2005).

En nuestro estudio conductual, aplicando la prueba de los puentes transversales, todos los animales mostraron la típica secuencia alternante de movimiento con un acoplamiento diagonal que caracteriza a la locomoción cuadrúpeda (García-Rill y cols, 1987). No obstante, las ratas hemiparkinsonizadas mostraron un impedimento en el uso de los miembros contralaterales a la lesión tanto para efectuar ajustes posturales como de marcha.

En la literatura, se han descrito estrategias de marcha y postura similares a los observados por nosotros para las ratas hemiparkinsonizadas evaluadas con otras pruebas espontáneas que exploran la coordinación motora, la postura y la marcha (Miklyeva y cols, 1995, Schallert y cols, 2000). Se ha señalado que la deficiencia dopaminérgica estriatal se traduce en un impedimento para ejercer la fuerza necesaria que requiere lograr el desplazamiento coordinado de todas las partes del cuerpo. Dicho impedimento, puede estar relacionado con una incapacidad para dirigir los miembros afectados, rigidez de estos, disminución de los reflejos u otras disfunciones sensorimotoras (Morgan y cols, 1993; Wishaw y cols, 1992, 1994).

Existen trabajos previos en los que se han abordado los componentes motivacionales, los procesos de memoria y aprendizaje, así como los mecanismos que explican los procesos adictivos bajo el efecto de diferentes esquemas de administración sistémica de (-) nicotina (Dani y cols, 2001, Corrigan y cols, 2001). Sin embargo, no existen antecedentes de evaluar el efecto de la aplicación subcutánea de esta sustancia en la ejecución motora en el modelo de hemiparkinsonismo por inyección de la neurotoxina 6-OHDA, de manera que nuestros resultados aportan evidencias novedosas sobre este tema.

El tratamiento con (-) nicotina tuvo un impacto positivo en la ejecución motora de las ratas en los puentes de mayores ancho y diámetro (2.5 cm). En el grupo de ratas hemiparkinsonizadas y tratadas con (-) nicotina, la menor disfunción del miembro trasero contralateral a la lesión de 6-OHDA, le permitió una mejor coordinación de las extremidades posteriores. Este hecho, puede contribuir a que este grupo de ratas demore menos tiempo en alcanzar la plataforma que las ratas hemiparkinsonizadas que no recibieron tratamiento farmacológico. De igual modo, esta mejoría, puede sustentar la similitud del promedio de errores cometidos por las ratas tratadas con (-) nicotina y las ratas sanas en el puente rectangular grande (2.5 cm de diámetro). No obstante, nuestros resultados apuntan a que este efecto positivo se empobrece cuando los determinantes del soporte, el equilibrio y la locomoción, como pueden ser la forma y el tamaño de la superficie de apoyo, toman valores críticos.

El tratamiento con (-) nicotina no previno la tendencia espontánea a girar en círculos estrechos que se describe para las ratas hemiparkinsonizadas. Esta conducta desequilibra aún más el centro de masa del cuerpo de la rata, lo cual puede adicionarse a la dificultad que imponen el diámetro y la forma del puente (Schallert y cols, 2000). En menores superficies de apoyo, la tendencia al giro acentúa la discapacidad motora y resulta en un fracaso de los intentos de sujeción y soporte (Miklyaeva y cols, 1995).

Este mosaico de resultados sugiere que cuando el diámetro y la forma del puente se conjugan para alcanzar una complejidad máxima, el tratamiento sistémico con (-) nicotina aplicado en el presente estudio, fracasa para obtener una mejor ejecución motora de los animales. En estos casos, predominan los trastornos motores asociados a la lesión neurotóxica de la SNc y las ratas exhiben una ejecución motora similar a la de las ratas hemiparkinsonizadas que no recibieron tratamiento farmacológico.

En relación con la menor asimetría motora que presentan las ratas hemiparkinsonizadas y tratadas con (-) nicotina, evaluada a través de los giros inducidos por D-anfetamina, pensamos que este resultado está íntimamente relacionado con la menor pérdida de cuerpos celulares dopaminérgicos en la SNc de este grupo de ratas.

La literatura señala, que las células dopaminérgicas de la SNc que sobreviven a la lesión neurotóxica pueden liberar DA de sus vesículas de almacenamiento bajo el efecto de la administración de D-anfetamina sistémica (Calne y Zigmond, 1991; Zigmond y cols 2002). El resultado neto sería un menor número de giros inducidos por este fármaco y por ende una menor asimetría motora.

Por otra parte, uno de los efectos atribuidos al papel neuroprotector de la (-) nicotina en la EP, es la activación de los receptores colinérgicos nicotínicos localizados sobre las terminales axónicas dopaminérgicas nigroestriatales (Quick, 2004). Se conoce que esta activación promueve la liberación de DA de las terminales intactas (Quick, 2004). Los estudios de estimulación de los receptores dopaminérgicos estriatales postsinápticos en ratas sanas sugieren que, probablemente, una pequeña cantidad de DA es suficiente a nivel celular para estimular a dichos receptores (Smith y cols, 1997).

En la disminución de la actividad rotatoria de las ratas hemiparkinsonizadas y tratadas con (-) nicotina observada en nuestro estudio, pensamos que convergen el efecto promotor de la liberación de DA ejercido por la (-) nicotina junto a la menor pérdida de cuerpos celulares dopaminérgicos en la SNc lateral y medial.

2. Concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP y presencia de células dopaminérgicas en la SNc

Nuestros resultados muestran que la administración sistémica de (-) nicotina redujo a valores normales, las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP de las ratas

hemiparkinsonizadas y promovió una menor pérdida de cuerpos celulares dopaminérgicos en la SNc.

Pensamos que la restauración de los valores normales de las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP de las ratas hemiparkinsonizadas tratadas con (-) nicotina, responde a los efectos generales del tratamiento farmacológico, previniendo el desbalance entre los sistemas de neurotransmisores de las dos vías del circuito motor de los GB. En el NPP convergen los impulsos gabaérgicos y glutamatérgicos procedentes de las vías “directa” e “indirecta” del circuito motor (Mena-Segovia y cols, 2004). En consecuencia, cualquier cambio en el funcionamiento del circuito motor, repercutirá en la liberación de neurotransmisores en el NPP y por ende en la concentración de estos en su espacio extracelular (Herrera-Marschitz y cols, 1996).

El tratamiento con (-) nicotina puede dar paso a una mejoría de la actividad dopaminérgica cuyo sustrato en nuestro estudio sería la presencia de cuerpos celulares dopaminérgicos en la SNc medial y lateral. Las células dopaminérgicas supervivientes pudieran ejercer cierto control sobre el St corrigiendo en alguna medida el desbalance entre las vías del circuito motor. La (-) nicotina disminuye la actividad de las enzimas MAO-A y MAO-B relacionadas con el metabolismo de la DA (Jenner, 1998). Este efecto redundaría en una menor oxidación enzimática de la DA y menor estrés oxidativo de las células dopaminérgicas nigrales (Jenner, 1998). Adicionalmente se conoce que la neurotoxina 6-OHDA sufre un proceso oxidativo a expensas de la enzima MAO-A, como resultado del cual se forma peróxido de hidrógeno y se incrementa el estrés oxidativo que puede conducir a la muerte de las células dopaminérgicas de la SNc (Blum y cols, 2001). La administración sistémica de (-) nicotina puede prevenir o atenuar esta cascada de eventos moleculares cuyo resultado sería una menor pérdida de células dopaminérgicas en la SNc (Soto-Otero y cols, 2002).

En esta misma dirección, el esquema de administración empleado en nuestro trabajo, buscaba mantener los receptores colinérgicos nicotínicos centrales desensibilizados. La literatura señala que los receptores nicotínicos, aún desensibilizados mantienen una respuesta remanente a la nicotina que activa proteínas fosfatasa de la familia de la calcineurina (Giniatullin y cols, 2005; Wonnacott y cols, 2005). Esta familia de proteínas, funcionan como sensores de alta afinidad ya que se activan con muy bajas concentraciones intracelulares de calcio (Giniatullin y cols, 2005). En condiciones fisiológicas, se mantiene un balance entre las proteínas quinasas que actúan como sensores de baja afinidad (requieren una señal de calcio cuantitativamente superior) y las fosfatasas. En condiciones de desensibilización de los receptores nicotínicos, este balance se inclina a favor de las proteínas fosfatasas que defosforilan sustratos proteicos y enlentecen o evitan el disparo de mecanismos de muerte celular (Giniatullin y cols, 2005).

El efecto de la (-) nicotina propiciando una menor actividad de las enzimas MAO-A y B, así como el balance a favor de la actividad fosfatasa intracelular, pueden contribuir a la menor pérdida de

células dopaminérgicas en la SNc de las ratas hemiparkinsonizadas y tratadas con (-) nicotina observada en nuestro trabajo.

La restauración de la actividad dopaminérgica nigroestriatal en alguna medida pudiera tener dos aportes fundamentales: corregir el incremento del tono glutamatérgico estriatal mediante el restablecimiento de la interacción DA-Glu a nivel estriatal y restablecer la estimulación dopaminérgica sobre sus receptores estriatales (Chase, 2004). Ambos efectos confluyen en la corrección del desbalance en el funcionamiento de las vías “directa” e “indirecta” del circuito motor y pueden ser parte de los mecanismos que expliquen la restauración de las concentraciones extracelulares normales de Glu y GABA en el NPP.

3. Cantidad de FNDC y FNDG expresado en el St de las ratas hemiparkinsonizadas

Nuestra hipótesis sobre el efecto de la (-) nicotina en el modelo de 6-OHDA concuerda con la hipótesis propuesta por Maggio y cols (1997). Estos autores sugieren que el efecto neuroprotector de la (-) nicotina en los distintos modelos de EP no debe concebirse como una interacción directa del fármaco con los mecanismos individuales de toxicidad de cada una de las neurotoxinas utilizadas en los modelos. En vez de ello, la protección pudiera basarse en activar mecanismos que modifican la susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas al daño excitotóxico (Maggio y cols, 1997). La activación de los receptores colinérgicos nicotínicos presentes en las células dopaminérgicas de la SNc genera la entrada de Ca^{++} a las neuronas, lo cual puede desencadenar la fosforilación de un grupo de proteínas quinasas, la transcripción de genes de respuesta temprana, la síntesis de nuevas proteínas y todo ello potenciar los mecanismos de plasticidad sináptica y el remodelamiento neuronal (Belluardo y cols, 2000).

Uno de los mecanismos esbozados en la literatura para explicar los efectos beneficiosos del tratamiento sistémico con (-) nicotina sobre los síntomas parkinsonianos es el incremento en la expresión de FNT (Maggio y cols, 1997, 1998; Belluardo y cols, 2000).

En consonancia con esta idea, estudiamos la cantidad de la proteína FNDC y FNDG expresada en el St y nuestros resultados sugieren que la lesión de la SNc provoca un aumento en la expresión estriatal de ambos FNT. Asimismo, el esquema de tratamiento con (-) nicotina seguido en el presente estudio propició un incremento aún mayor en la cantidad de FNDC expresado en el tejido estriatal, no siendo así para el FNDG.

En lo que respecta al FNDC, nuestros resultados concuerdan con lo publicado en la literatura. Bustos y cols, 2004, señalaron un incremento tanto en la expresión del ARNm como en la cantidad de FNDC en el St de las ratas hemiparkinsonizadas (Bustos y cols, 2004). Este hallazgo se ha relacionado con la activación de los receptores glutamatérgicos NMDA estriatales ya que se conoce que el FNDC controla de manera dosis-dependiente la expresión de distintas subunidades de este

receptor en células mesencefálicas en cultivo (Campusano y cols, 2001; Taylor y cols, 2003). Asimismo Knott y cols en el 2002, señalaron un incremento en la inmunoreactividad para el FNDC en asociación con la proteína ácida fibrilar glial en astroglia y microglia ramificada en un estudio *postmortem* en el St y en la SNc de sujetos parkinsonianos (Knott y cols, 2002).

Las neurotrofinas como el FNDC pueden ser sintetizadas por la glía y un incremento en la actividad de estas moléculas sugiere una respuesta glial a las señales originadas en las neuronas dopaminérgicas expuestas a un daño excitotóxico, oxidativo o de otra naturaleza (Knott y cols, 2002). En la literatura se reseña que la administración crónica y subcrónica de (-) nicotina a roedores produce un aumento tanto en la expresión del ARNm como en las concentraciones del FNDC y nuestro diseño de administración de (-) nicotina, es coincidente con el utilizado por estos autores (Maggio y cols, 1997).

Por su parte, la recuperación de la cantidad de proteína FNDG en el St de las ratas hemiparkinsonizadas tratadas con (-) nicotina, observada en el presente estudio, pudiera estar relacionada con el esquema de administración subcrónica de (-) nicotina. Los trabajos que refieren de la literatura un incremento en esta variable, han contemplado esquemas de exposición crónica a esta sustancia (Sun y cols, 2005). De cualquier modo, no descartamos un efecto neuroprotector del FNDG aún con una cantidad de proteína similar a la de las ratas sanas. Eslamboli y cols en el 2005, han planteado que la recuperación funcional de animales parkinsonizados puede resultar comprometida cuando se liberan altos niveles de FNDG usando un vector lentiviral (Eslamboli y cols, 2005). Estos autores han propuesto dos posibles mecanismos que pueden explicar este efecto no deseado: una disminución en la actividad de la enzima TH en las terminales dopaminérgicas preservadas, y un brote aberrante de fibras TH-positivas en los núcleos de salida de los GB.

Nuestros resultados sustentan un efecto neuroprotector al esquema de tratamiento con (-) nicotina seguido en el presente estudio. Este promueve cambios en el modelo de hemiparkinsonismo consistentes en estrategias de apoyo y locomoción similar a las de los animales sanos, en tanto el diámetro y la forma de la superficie de apoyo no constituyan un impedimento de orden crítico. En este modelo, las menores concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP pudieran contribuir a una mejor calidad en la transmisión de la señal motora a través de la vía reticuloespinal hasta la periferia con una mejor activación del patrón de movimiento muscular. El incremento en la cantidad de FNDC expresado en el St junto a una menor pérdida de cuerpos celulares dopaminérgicos pudiera participar de los mecanismos que sustentan este efecto neuroprotector atenuando el desbalance entre las vías “directa” e “indirecta” del circuito motor de los GB y contribuyendo a mantener cierto control dopaminérgico sobre la actividad estriatal.

IV. IMPACTO DE LA MANIPULACIÓN LOCAL DEL SISTEMA GLUTAMATÉRGICO EN LAS RATAS HEMIPARKINSONIZADAS

1. Efecto de la lesión del NST en la asimetría motora y las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP

La degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNc resulta indirectamente en una activación excesiva de las neuronas glutamatérgicas del NST que proyectan hacia los núcleos de salida de los GB, lo cual se ha señalado que contribuye de manera esencial a los trastornos motores que caracterizan a la EP (De Long, 1990; Groenewen, 2003; Trost y cols, 2006). La lesión excitotóxica del NST forma parte de los tratamientos quirúrgicos que han investigado el efecto de silenciar o disminuir la excesiva actividad glutamatérgica de origen subtalámico, sobre los trastornos motores y el desbalance neuroquímico asociados al parkinsonismo (Guridi y cols, 1996; Carvalho y Nikkhah, 2001; Jeon y cols, 2003; Chang y cols, 2003).

Los resultados de nuestro estudio indican que la lesión excitotóxica del NST disminuye la asimetría motora y las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP de las ratas con lesión unilateral completa de la SNc, aunque este último neurotransmisor no recupera sus valores normales.

Los resultados publicados con relación al impacto de la lesión del NST en el número de giros inducidos por D-anfetamina son contradictorios, y los mecanismos que intervienen en el comportamiento de esta variable no han sido aún esclarecidos. Ryan y Sanders en 1993, señalaron una disminución de las rotaciones después de la lesión del NST (Ryan y Sanders, 1993). Mientras, Carvalho y Nikkhah en el 2001, encontraron que este proceder quirúrgico no modificó la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina en un modelo de parkinsonismo parcial (Carvalho y Nikkhah, 2001).

Se sabe que aunque la asimetría motora es primariamente de origen dopaminérgico, otros neurotransmisores como Glu y GABA participan en el control de la liberación de DA estriatal (López y Tapia, 1995).

La denervación dopaminérgica unilateral origina cambios asimétricos en la sensibilidad de los receptores dopaminérgicos en sitios extranigrales como el NST (Shen y cols, 2003). En las ratas hemiparkinsonizadas, se presenta un incremento en la densidad de los receptores dopaminérgicos D₂ en el NST ipsilateral a la inyección de la 6-OHDA, en contraposición a la disminución en la densidad de esta población de receptores, observada en el NST contralateral (Shen y cols, 2003). Se ha señalado además que la denervación dopaminérgica unilateral conduce a un incremento compensatorio de la actividad dopaminérgica en la SNc contralateral (Zigmond y Stricker, 1984).

El NST recibe una proyección dopaminérgica a la vez que envía una proyección glutamatérgica a la SNc (Hassani y cols, 1997; Hamani y cols, 2003). Si tomamos en cuenta que trabajamos con ratas con

lesión unilateral completa de la SNc, es difícil considerar que el efecto de la lesión del NST disminuyendo la asimetría motora, esté mediado por un incremento de la liberación de DA en las terminales nigroestriatales. En nuestro criterio, este efecto pudiera estar sustentado por una menor actividad glutamatérgica sobre los núcleos de salida de los GB lo cual debe corregir en alguna medida el desbalance entre las dos vías del circuito motor y a su vez, la asimetría en la actividad glutamatérgica. La lesión del NST interrumpe las vías: corteza motora-ST-GP-NST-SNr y corteza motora-NST-SNr (Ryan y Sanders, 1994). En consecuencia, se intensifica la influencia de la “vía directa” del circuito motor de los GB: corteza motora-St-SNr, lo cual puede propiciar un cambio en el patrón de descarga de las neuronas nigrotalámicas, y participar en los mecanismos que explican la menor asimetría motora (Ryan y Sanders, 1994). Adicionalmente, se ha señalado la participación de la vía gabaérgica nigro-colicular en la expresión de la conducta rotacional (Henderson y cols, 1999). En la EP, esta vía está hiperactiva como consecuencia de la desinhibición de la “vía indirecta” del circuito motor de los GB (De Long, 1990). La lesión del NST debe ejercer un efecto compensatorio disminuyendo la actividad gabaérgica nigral sobre el *coliculus*, lo que resulta en un menor número de giros inducidos por la administración de D-anfetamina (Henderson y cols, 1999).

Por otra parte la lesión del NST, restauró las concentraciones extracelulares normales de Glu en el NPP de las ratas. Este hallazgo, es un elemento que habla a favor del origen subtalámico del incremento en los niveles de Glu en este núcleo detectado en las ratas hemiparkinsonizadas.

Se ha señalado que, la hiperactividad del NST en la EP puede no responder de forma absoluta a la hipoactividad del GPI. Puede ser también, resultado de la hiperactividad de los impulsos excitatorios procedentes del NPP, al estar ambos núcleos conectados en un lazo monosináptico (Breit y cols, 2001, 2006).

En este mismo sentido, otros autores han señalado un aumento en la tasa de descarga en las neuronas del NPP de las ratas hemiparkinsonizadas, lo cual se revirtió después de la lesión del NST (Breit y cols, 2001; Jeon y cols, 2003).

Rosales y cols en 1997 reportaron que la lesión excitotóxica del NST de ratas, redujo los niveles extracelulares de Glu en la SNr en un 80%, en contraste con la lesión de la proyección corticonigral que redujo la liberación de Glu nigral apenas en un 19.5% (Rosales y cols, 1997).

Así, la lesión del NST modula tanto la eferencia glutamatérgica subtalámica que alcanza el NPP, como la eferencia gabaérgica que procede de la SNr e igualmente alcanza el NPP (Obeso y cols, 2000b; Mena-Segovia y cols, 2004). Las evidencias apuntan a que ambas proyecciones están segregadas en el NPP: las proyecciones gabaérgicas nigrales alcanzan a las neuronas glutamatérgicas pontinas localizadas en la *pars dissipata* del NPP mientras que la proyección glutamatérgica subtalámica hace diana en el territorio colinérgico del núcleo, representado por la *pars compacta* (Semba y Fibiger, 1992; Lee y cols, 2000; Pahapill y Lozano, 2000; Hamani y cols, 2003;

Mena-Segovia y cols, 2004; Cébrian y cols, 2005). Tomando en consideración que el NPP es un grupo heterogéneo de neuronas, es posible que la disminución de la influencia glutamatérgica que sigue a la lesión del NST, no logre el mismo impacto sobre todos los tipos celulares presentes en esta estructura (Manaye y cols, 1999). Este efecto diferencial, pudiera explicar por qué, síntomas como la acinesia muestran mayor beneficio que los trastornos posturales y de la marcha después de las lesiones selectivas del NST en pacientes parkinsonianos (Obeso y cols, 2000a y b).

En lo que concierne al efecto de la lesión del NST sobre las concentraciones extracelulares de GABA en el NPP, resulta sorprendente el comportamiento intermedio de esta variable en el grupo de ratas con lesión de la SNc y el NST con respecto a las ratas con lesión unilateral completa sin lesión del NST y las ratas sanas.

La descarga gabaérgica de las células de la SNr está modulada por la actividad de otros sistemas de neurotransmisores entre los que se destacan los sistemas glutamatérgico y dopaminérgico (Steiniger y Kretschmer, 2003). Las dendritas de las células dopaminérgicas de la SNc arborizan en la SNr y liberan DA (Heeringa y Abercrombie, 1995; Timmerman y Abercrombie, 1996). Se ha descrito que la liberación dendrítica de DA tiene varios significados funcionales, entre ellos: el efecto autoinhibitorio que ejerce la DA en la descarga de las propias células dopaminérgicas y la facilitación de la liberación de GABA a partir de las terminales estriatonigrales, por efecto de la estimulación del receptor D₁, de localización presináptica en dichas terminales (Floran y cols, 1990; Tepper y cols, 1997).

En la condición parkinsoniana disminuye el efecto facilitatorio que ejerce la DA sobre la transmisión a través de la “vía directa” (striatonigral) del circuito motor, y a la vez decrece la liberación somatodendrítica de DA en la SNr (Cobb y Abercrombie, 2003; Correa y cols, 2003). Adicionalmente se exagera el efecto excitatorio de la “vía indirecta” sobre las estructuras de salida de los GB (GPm/SNr) (Wichmann y De Long, 2002). En estas condiciones es posible que la lesión del NST, última estructura de la “vía indirecta”, pueda modular solo parcialmente la descarga gabaérgica nigral. La propia denervación dopaminérgica se convertiría en un freno para normalizar esta actividad. En consecuencia, los niveles extracelulares de GABA en los núcleos diana de la SNr/GPm, como el NPP, disminuyen en comparación con las ratas hemiparkinsonizadas sin lesión del NST, pero no alcanzan los valores detectados en las ratas sanas.

2. Efecto de la infusión intracerebral de MK-801 sobre las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP

Los resultados del presente estudio muestran una disminución de las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP, tanto en el grupo de ratas sanas como en el grupo de ratas hemiparkinsonizadas, bajo el efecto de la infusión local de MK-801. Asimismo, nuestros resultados sugieren que esta variable permanece significativamente disminuída en las ratas

hemiparkinsonizadas, aún después de 2 h de finalizada la infusión del antagonista glutamatérgico. No se conocen trabajos previos que aborden el efecto del bloqueo local de la neurotransmisión glutamatérgica sobre las concentraciones de Glu y GABA en el NPP, por lo cual nuestros hallazgos constituyen un aporte al conocimiento de la neurotransmisión en esta estructura en el modelo de 6-OHDA.

La disminución encontrada en el presente estudio pudiera relacionarse con la presencia de receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR) del grupo III (subtipos: mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8), en las terminales presinápticas subtalámico pontinas y nigro pontinas (Kosinski y cols, 1999; Marino y cols, 2003). El bloqueo de los receptores glutamatérgicos NMDA postsinápticos, que se encuentran sobre las células pontinas, a través de la infusión de MK-801, dejaría mayores posibilidades de interacción entre el Glu y los restantes receptores glutamatérgicos (Marti y cols, 2000). Dentro de ellos se encuentran los mGluR localizados sobre las terminales glutamatérgicas y gabaérgicas, que hacen sinapsis en las células pontinas.

La literatura refiere, que este grupo de mGluR participa en los mecanismos de inhibición presináptica y bloquean la transmisión sináptica glutamatérgica excitatoria (Mitchell y Silver, 2000). Al mismo tiempo, se comportan como heterorreceptores bloqueando la transmisión gabaérgica inhibitoria en el Sistema Nervioso Central (Mitchell y Silver, 2000; Wittmann y cols, 2001; Marino y cols, 2003). Se ha señalado, que la activación de estos receptores interfiere con la maquinaria de liberación del neurotransmisor, ya que ellos inhiben a los canales de Ca^{++} dependientes de voltaje, cuya activación es indispensable para la exocitosis del neurotransmisor (Dingledine y Bain, 1999; Marino y cols, 2002, 2003, Valenti y cols, 2003a).

En nuestro trabajo, la interacción del Glu con sus receptores presinápticos nigro y subtalamo-pontinos resultaría en una activación de los mecanismos de inhibición presináptica mediados por los mGluR cuyo resultado final sería una menor liberación de Glu y GABA por parte de las terminales NST-NPP y SNr-NPP. En consecuencia, las concentraciones de los aminoácidos en el espacio extracelular resultarían disminuídas.

Alternativamente, en la disminución de las concentraciones extracelulares de Glu en el NPP, posterior a la infusión local de MK-801, pudiera participar el efecto de esta sustancia mejorando la recaptura del neurotransmisor por una regulación al alza del transportador de los aminoácidos excitatorios (Boeck y cols, 2005). Este efecto interferiría con la cantidad de Glu que escapa de la hendidura sináptica y alcanza el espacio extracelular donde está ubicada la cánula de microdiálisis cerebral.

En el caso de las ratas hemiparkinsonizadas que poseen un desbalance entre sus sistemas de neurotransmisores y cambios en la actividad de los receptores dopaminérgicos, el bloqueo de los receptores NMDA postsinápticos en el NPP, impone un nuevo ajuste a la neurotransmisión en los

GB. La actividad de la DA y sus receptores modula de forma muy fina la actividad de los mGluR, a partir de vías de señalización intracelular comunes a ambos neurotransmisores (Wittman y cols, 2002).

Los resultados publicados atribuyen cambios en la farmacología de los mGluR siguiendo la deficiencia de DA (Rouse y cols, 2000; Valenti y cols, 2003b). Para las ratas hemiparkinsonizadas, la actividad del Glu sobre sus receptores mGluR presinápticos localizados en la sinapsis NST-NPP, puede verse potenciada por la hipersensibilidad de los receptores dopaminérgicos D₂ localizados en esta misma terminal (Shen y cols, 2003). Este subtipo de receptor dopaminérgico produce una inhibición de la cascada dependiente del AMPc, lo que interfiere a su vez con la activación de determinadas proteínas quinasas encargadas de fosforilar las subunidades proteicas de los mGluR (Neve y cols, 2004). En estado desfosforilado se produce el acoplamiento del receptor mGluR con la proteína G correspondiente y la activación de sus sistemas efectores, entre ellos determinados sustratos proteicos que inactivan el proceso de exocitosis del neurotransmisor (Sánchez-Prieto y cols, 1996).

Por otra parte, se conoce la existencia de receptores dopaminérgicos D₂ sobre el soma y las dendritas de las neuronas gabaérgicas de la SNr (Bentivoglio y Morelli, 2005). La pérdida de la liberación somatodendrítica de DA sobre la SNr induce una regulación al alza de estos receptores que pudiera potenciar su interacción con los mGluR presentes en la SNr (Wittman y cols, 2002). El resultado final pudiera ser una disminución de la exocitosis de GABA en la terminal SNr-NPP.

Tomando en cuenta los hallazgos antes descritos, podemos hipotetizar que la disminución prolongada de las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP de las ratas hemiparkinsonizadas, inducido por la infusión local de MK-801, pudiera responder a la interacción del Glu sobre sus mGluR de localización presináptica. Los efectos de inhibición presináptica resultantes de esta interacción, pudieran potenciarse a partir de las modificaciones que se establecen en la interacción entre los propios mGluR y los receptores dopaminérgicos D₂, hipersensibles en condición parkinsoniana.

En general, la manipulación del sistema glutamatérgico por lesión excitotóxica del NST disminuye la asimetría motora y las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP. Estos efectos parecen estar mediados por una disminución de los impulsos excitatorios sobre el complejo GPM/SNr siguiendo la lesión del NST, que no es suficiente para normalizar las concentraciones extracelulares de GABA en el NPP, ya que este neurotransmisor parece estar sometido a otros sistemas de regulación DA-dependientes. El bloqueo de los receptores glutamatérgicos postsinápticos NMDA por infusión local de MK-801 induce una disminución en las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP, lo cual parece obedecer a una interacción facilitada entre el Glu y algún subtipo de mGluR presináptico involucrado en

mecanismos de inhibición presináptica.

V. CONSIDERACIONES FINALES

Aunque la muerte de las células de la SNc y la consiguiente deficiencia dopaminérgica constituyen de conjunto el rasgo neuropatológico distintivo de la EP, ya hoy es bien conocido, que el funcionamiento de otros neurotransmisores y la actividad de otros núcleos de los GB y fuera de estos, también resulta comprometida en la condición parkinsoniana. Actualmente la EP es concebida como un trastorno multisistémico que abarca estructuras dopaminérgicas y no dopaminérgicas que degeneran progresivamente (Muller y cols, 2006).

Los resultados del presente trabajo confirman el desarrollo de un grupo de cambios moleculares y celulares en el NPP de las ratas hemiparkinsonizadas, que refuerzan la participación de esta estructura en el proceso degenerativo asociado a la EP.

Por otra parte, si consideramos el concepto de neuroprotección como la posibilidad de revertir los daños o prevenir el desarrollo de futuros daños en el organismo en el orden molecular, celular o a cualquier otro nivel (Onteniente, 2000; Riederer y cols, 2000; Mandel y cols, 2003; Levi y Brimble, 2004), los resultados mostrados en el presente trabajo enfatizan en el efecto protector de los tratamientos farmacológicos estudiados. Nuestros hallazgos indican que la manipulación de los sistemas glutamatérgico y colinérgico atenúa la discapacidad y la asimetría motora de las ratas hemiparkinsonizadas.

Asimismo, el trabajo subraya el efecto de la lesión excitotóxica del NST sobre las concentraciones extracelulares de aminoácidos neurotransmisores en el NPP lo cual pudiera ser parte de los mecanismos que subyacen en el efecto beneficioso de este proceder como tratamiento quirúrgico para la EP.

En la fig. 34 hemos esbozado un esquema final que contempla los hallazgos más relevantes de la tesis, e hipotetiza de forma global sobre los mecanismos que se ponen en marcha para explicarlos.

En condiciones fisiológicas existe un balance en la transmisión entre las vías “directa” e “indirecta” del circuito motor de los GB, en consonancia con el modelo aceptado en la literatura. En correspondencia con este balance, también existe un equilibrio en la liberación de Glu y GABA en el NPP que se puede estudiar a través de la determinación de las concentraciones extracelulares de estos aminoácidos neurotransmisores en el propio NPP. El funcionamiento del NPP modula de forma muy fina la actividad dopaminérgica a través de sus proyecciones colinérgica y glutamatérgica que alcanzan a las células dopaminérgicas de la SNc (Fig. 34A).

En el modelo de hemiparkinsonismo por inyección de la neurotoxina 6-OHDA se produce una disminución sensible de la actividad dopaminérgica, tanto somatodendrítica sobre la SNr como en la vía nigroestriatal. En consecuencia, se genera un desequilibrio en la transmisión a través de las vías del circuito motor con predominio de la actividad glutamatérgica subtalámica y corticoestriatal.

Como resultado de este desbalance se modifican tanto las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP como la densidad de los receptores colinérgicos muscarínicos, μ opioides y gabaérgicos BDZ. Estos cambios pueden ser expresión de los mecanismos de plasticidad que a nivel molecular se ponen en marcha en la condición parkinsoniana. Asimismo, en el NPP se desarrolla un proceso de muerte celular que puede estar asociado a la pérdida de la innervación dopaminérgica nigro-pontina junto al incremento de la actividad glutamatérgica excitatoria (Fig. 34B).

En estas condiciones, tanto la manipulación del sistema glutamatérgico (a través de la administración de MK-801 o la lesión del NST) como la del sistema colinérgico (a través de la administración de (-) nicotina), de acuerdo a los tratamientos estudiados en esta tesis, confluyen en un efecto común: la disminución de las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP (Fig. 34C).

El bloqueo de los receptores glutamatérgicos NMDA tiene un efecto protector sobre las células dopaminérgicas del ATV y puede modular el incremento del tono glutamatérgico corticoestriatal, restaurando en alguna medida la plasticidad sináptica estriatal. Por su parte, la lesión excitotóxica del NST disminuye los impulsos glutamatérgicos excitatorios sobre los núcleos de salida de los GB, actuando en el último segmento del circuito motor.

La exposición de las ratas hemiparkinsonizadas a (-) nicotina, propicia una mayor expresión estriatal del FNDC, a la vez que protege a las células dopaminérgicas de la SNc. Las células sobrevivientes pueden aportar DA tanto en las terminales nigroestriatales como en su árbol dendrítico el que se imbrica en la SNr. El aporte dopaminérgico puede contribuir a restaurar la interacción entre la DA y los sistemas glutamatérgico y colinérgico a nivel del St y con el sistema gabaérgico en el complejo SNr / GPM (Fig. 34C).

De manera que todos estos tratamientos confluyen en un menor desbalance entre las vías del circuito motor. A pesar de que todos los tratamientos no modifican en igual medida, este efecto se pone de relieve en las menores concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP, núcleo donde convergen los impulsos glutamatérgicos excitatorios del NST y los impulsos gabaérgicos inhibitorios de la SNr/GPM.

Ambas estrategias de tratamiento farmacológico atenuaron los trastornos motores de las ratas hemiparkinsonizadas, las cuales mostraron menor asimetría y discapacidad motora que las ratas hemiparkinsonizadas que no recibieron ninguno de los tratamientos estudiados.

Tanto el tratamiento con MK-801 como con (-) nicotina parece preservar los mecanismos neurales que sustentan el procesamiento de la información motora burda en ratas hemiparkinsonizadas, lo cual a nuestro juicio es de gran valor adaptativo. No obstante, este efecto se pierde cuando la tarea a ejecutar demanda un procesamiento más fino de la información motora con ajustes de fuerza,

precisión y coordinación de muchos grupos musculares, para lo cual, la actividad dopaminérgica nigroestriatal y la neurotransmisión en núcleos como el NPP parecen jugar un papel determinante.

CONCLUSIONES

1. La pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SNc induce cambios plásticos en el NPP a nivel molecular que son responsables de la modificación en la densidad de diferentes poblaciones de receptores, entre ellos: colinérgicos muscarínicos, gabaérgicos BDZ y *mu* opioides.
2. La hiperactividad de los núcleos de salida de los GB, resultado del desbalance entre las vías “directa” e “indirecta” del circuito motor, produce cambios en las concentraciones de los aminoácidos neurotransmisores Glu y GABA en el NPP.
3. La pérdida de la inervación dopaminérgica junto al incremento del tono glutamatérgico en el NPP de las ratas, pone en marcha un proceso de muerte celular cuyo curso parece ser esencialmente necrótico.
4. Las menores concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP y la menor pérdida de cuerpos celulares dopaminérgicos en el ATV, pudieran ser parte del sustrato fisiológico del efecto neuroprotector obtenido con la administración sistémica del antagonista glutamatérgico MK-801.
5. La administración del agonista colinérgico (-) nicotina en el modelo de 6-OHDA tiene un efecto neuroprotector sobre las células dopaminérgicas de la SNc, que debe reducir el desbalance entre las vías “directa” e “indirecta” del circuito motor de los GB.
6. La manipulación local de la aferencia glutamatérgica al NPP, tanto por lesión de las neuronas subtalámicas como por inyección intracerebral de un antagonista glutamatérgico, mejora el balance entre las aferencias glutamatérgica excitatoria y gabaérgica inhibitoria que alcanzan este núcleo, lo cual modifica las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP y disminuye la asimetría motora.

RECOMENDACIONES

1. Evaluar el proceso de muerte celular en el NPP ipsilateral a la lesión de la SNc con marcadores selectivos que permitan definir el fenotipo celular involucrado en dicho proceso de muerte así como el curso más probable de dicho proceso de muerte celular, necrótico o apoptótico. Asimismo, estudiar el impacto del tratamiento con (-) nicotina y MK-801 sobre el proceso de muerte celular descrito para las células del NPP.
2. Realizar un estudio morfométrico que permita cuantificar el número de cuerpos celulares presentes en la SNc siguiendo la administración sistémica de (-) nicotina.
3. Evaluar cuantitativamente los diferentes tipos de errores que cometen las ratas durante la ejecución en la prueba de los puentes transversales que permita correlacionar los resultados de las latencias medidas con el tipo de error que está predominando en cada puente y el impacto de los tratamientos farmacológicos sobre cada uno de ellos por separado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Agnati LF., Ferré S., Lluís C., Franco R., Fuxe K. **2003** Molecular Mechanisms and Therapeutical Implications of Intramembrane Receptor/Receptor Interactions among heptahelical receptors with examples from Striatopallidal GABA neurons. *Pharmacol. Rev.*, 55: 509-550.
2. Akil H., Owens C., Gutsein H., Taylor L., Curran E., Watson S. **1998** Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug and Alcohol Dependences*, 51: 127-140.
3. Alberca R., Ochoa JJ. Síndrome Parkinsoniano: Causas y Diagnóstico diferencial. En: Tratado sobre la Enfermedad de Parkinson. 2^{da} edición. Eds.: Obeso JA, Tolosa ES, Grandas FJ. (Laboratorios DU PONT Pharma); Madrid, **1997** pp. 25-31.
4. Albin RL., Young AB., Penney JB. **1989** The functional anatomy of basal ganglia disorders. *TINS*, 12: 366-75.
5. Albin RL., Greenamyre JT. **1989** Alternative excitotoxic hypothesis. *Neurology*, 42: 733-738.
6. Albin RL. **1995** The Pathophysiology of Chorea/Ballism and Parkinsonism. *Parkinsonism & Rel. Disord.*, 1: 3-11.
7. Alcantara A., Mrzljak L., Jakab R., Levey A., Hersch S., Goldman-Rakic S. **2001** Muscarinic M₁ and M₂ Receptor Proteins in Local Circuit and Projection Neurons of the Primate Striatum: Anatomical Evidence for Cholinergic Modulation of Glutamatergic Prefronto-Striatal Pathways. *J. Comp. Neurol.*, 434: 445-460.
8. Alexander GE., De Long MR., Strick PL. **1985** Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Ann. Rev. Neurosci.*, 9: 357-381.
9. Alexander GE., Crutcher MD. **1990** Functional architecture of basal ganglia circuits: neuronal substrates of parallel processing. *TINS*, 13(7): 266-271.
10. Alheid GF., Heimart L., Switzer RC. Basal Ganglia. En: *The Human Nervous System*. Ed.: Paxinos G. (Academic Press); San Diego, **1990** pp. 483-582.
11. Allers KA., Bergstrom DA., Ghazi LJ., Kreiss DS., Walters JR. **2005** MK-801 and amantadine exert different effects on subthalamic neuronal activity in a rodent model of Parkinson's Disease. *Exp. Neurol.*, 191: 104-118.
12. Alonso-Solis R. Neurotransmisores y Neuromoduladores. En: *Fisiología Humana*. Ed.: Tresguerres JAF. (INTERAMERICANA McGraw-Hill); Madrid, **1992** pp. 63-73.
13. Alonso H., Jiménez FJ. Epidemiología, etiología y patogenia de la Enfermedad de Parkinson. En: Tratado sobre la Enfermedad de Parkinson. 3^{era} Edición. Eds.: Tolosa ES, Obeso JA, Grandas FJ. (Grupo Bristol-Myers Squibb); Madrid, **2004** pp. 51-83.
14. Alvarez L., Macías R., Guridi J., López G., Alvarez E., Maragoto C., Teijeiro J., Torres A., Pavón N., Rodríguez Oroz MC., Ochoa L., Hetherington H., Juncos J., De Long MR., Obeso JA. **2001** Dorsal subthalamotomy for Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, 16(1): 72-8.
15. Alvarez L., Macías R., López G., Alvarez E., Pavón N., Rodríguez Oroz MC., Juncos J., Maragoto C., Guridi J., Litvan I., Tolosa ES., Koller J., Vitek J., De Long MR., Obeso JA. **2005** Bilateral subthalamotomy in Parkinson's disease: initial and long term response. *Brain*, 128(3): 578-83.
16. Amalric M., Baunez C., Nieoullon A. **1995** Does the blockade of excitatory amino acid transmission in the basal ganglia simply reverse reaction time deficits induced by dopamine inactivation?. *Behav. Pharmacol.*, 6: 508-519.
17. Anglade P., Tsuji S., Javoy-Agid F., Agid Y., Hirsch EC. **1995** Plasticity of nerve efferents to nigrostriatal neurons in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 37: 265-272.
18. Aziz TZ, Davies L., Stein J., France S. **1998** The role of descending basal ganglia connections to the brain stem in parkinsonian akinesia. *J. Neurosurg.*, 12(3): 245-9.
19. Baccafusco JJ., Terry AV. **2003** The potential role of conitina in the cognitive and neuroprotective actions of nicotina. *Life Sci.*, 72: 2931-2942.
20. Bach-y-Rita P. **1993** Neurotransmission in the brain by diffusion through the extracellular fluid: a review. *Neuroreport*, 4: 343-350.
21. Bahr BA., Bendiske J., Brown QB., Munirathinam S., Caba E., Rudin M., Urwyler S., Sauter A., Rogers G. **2002** Survival signaling selective neuroprotection through glutamatergic transmission. *Exp. Neurol.*, 174(1): 37-47.
22. Barraquer L. Evolución histórica del conocimiento de la EP. En: Tratado sobre la Enfermedad de Parkinson. 3^{era} Edición. Eds.: Grandas FJ., Obeso JA, Tolosa ES. (Grupo Bristol-Myers Squibb); Madrid, **2004** pp. 19-26.
23. Behmand RA., Harik SI. **1992** Nicotine enhances MPTP neurotoxicity. *J. Neurochem.*, 58: 776-779.

24. Belluardo N., Mudó G., Blum M., Fuxe K. **2000** Central nicotinic receptors, neurotrophic factors and neuroprotection. *Behavioural Brain Res.*, 113: 21-34.
25. Benazzouz A., Hallet M. **2000** Mechanism of action of Deep Brain Stimulation. *Neurology*, 55(12): 13-16.
26. Bentivoglio M., Morelli M. The Organization and circuits of mesencephalic dopaminergic neurons and the distribution of dopamine receptors in the brain. En: *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Vol. 21: Dopamine. Eds.: Dunnett SB., Bentivoglio M., Björklund A., Hökfelt T. (Elsevier BV); Amsterdam, **2005** pp. 1-43.
27. Bergman H., Wichmann T., Karmon B., De Long MR. **1994** The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model. *J. Neurophys.*, 72: 507-20.
28. Bergman H., Feingold A., Nini A., Raz A., Slovín H., Abeles M., Vaadia E. **1998** Physiological aspects of information processing in the basal ganglia of normal and parkinsonian primates. *TINS*, 21: 32-38.
29. Bernhardt RV. **2004** Mecanismos de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas: ¿apoptosis o necrosis?. *Rev. Chilena de Neuropsiq.*, 42(4): 281-292.
30. Bevan MD., Bolam JP. **1995** Cholinergic, Gabaergic and Glutamate-Enriched Inputs from the Mesopontine Tegmentum to the Subthalamic Nucleus in the Rat. *J. Neurosci.*, 15(11): 7105-7120
31. Bevan MB., Magill PJ., Terman D., Bolam JP., Wilson Ch J. **2002** Move to the rhythm: oscillations in the Subthalamic nucleus-external globus pallidus network. *TINS*, 6: 1-7.
32. Bezard E., Boraud T., Bioulac B., Gross CE. **1997a** Compensatory effects of glutamatergic inputs to the substantia nigra pars compacta in experimental parkinsonism. *Neurosci.*, 81: 399-404.
33. Bezard E., Boraud T., Bioulac B., Gross CE. **1997b** Presymptomatic revelation of experimental parkinsonism. *Neuroreport*, 8: 435-438.
34. Bezard E., Gross Ch. **1998** Compensatory Mechanisms in experimental and human parkinsonism: towards a dynamic approach. *Prog. Neurobiol.*, 55: 93-116.
35. Bezard E., Boraud T., Bioulac B., Gross Ch. **1999** Involvement of the subthalamic nucleus in glutamatergic compensatory mechanisms. *Eur. J. Neurosci.*, 11: 2167-2170.
36. Bezard E., Crossman AR., Gross ChE., Brotchie J. **2001** Structure outside the basal ganglia may compensate for dopamine loss in the presymptomatic stages of Parkinson's disease. *The FASEB Journal* 10.1096/fj. 00-0637 fje. Published on line <http://FASEB.J.com.Medicine>
37. Bhidayasiri R., Gasser H., Cohen SN., Tourtellote WW. **2002** Midbrain Ataxia: Possible Role of the Pedunculopontine Nucleus in Human Locomotion. *Cerebrovasc. Dis.*, 234: 1-6.
38. Bianchi L., Galeffi F., Bolam J. Della-Corte L. **2003** The effect of 6-OHDA lesions on the release of amino acids in the direct and indirect pathways of the basal ganglia: a dual microdialysis probe analysis. *Eur. J. Neurosci.*, 18: 856-868.
39. Björklund A., Lindvall O. Dopamine-containing system in the CNS. En: *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Vol. 2: Classical Transmitter in the CNS. Eds.: Björklund A., Hökfelt T. (Elsevier); Amsterdam, **1984** pp. 55-122.
40. Blandini F., García-Osuna M., Greenamyre JT. **1997** Subthalamic ablation reverses changes in basal ganglia oxidative metabolism and motor response to apomorphine induced by nigrostriatal lesion in rats. *Eur. J. Neurosci.*, 9: 1407-1413.
41. Blandini F., Greenamyre JT., Fancellu R., Nappi G. **2001a** Blockade of subthalamic glutamatergic activity corrects changes in neuronal metabolism and motor behavior in rats with nigrostriatal lesions. *Neurol. Sci.*, 22: 49-50.
42. Blandini F., Nappi G., Greenamyre JT. **2001b** Subthalamic infusion of an NMDA antagonist prevents basal ganglia metabolic changes and nigral degeneration in a rodent model of Parkinson's Disease. *Ann. Neurol.*, 49: 525-529.
43. Blum D., Torch S., Lambeng N., Nissou NF., Benabid AL., Sadoul R., Verna JM. **2001** Molecular pathway involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contributions to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.*, 65: 135-172.
44. Boeck CR., Kroth EH., Bronzatto MJ., Jardin FM., Souza OD., Vendite D. **2005** Effects of glutamate and receptor ligands on neuronal glutamate uptake. *Neurosci. Res.*, 53: 77-83.
45. Bolam JP., Francis CM., Henderson Z. **1991** Cholinergic inputs to dopaminergic neurons in the substantia nigra. A double immunocytochemical study. *Neurosci.*, 41: 483-94.
46. Bossy-Wetzel E., Schwarzenbacher R., Lipton S. **2004** Molecular pathways to neurodegeneration. *Nature*

- medicine, Nature Publishing Group <http://www.nature.com/naturemedicine> 1 July 2004
47. Braak H., Ghebremedhin E., Rüb U., Bratzke H., Del Tredici K. **2004** Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.*, 318: 121-134.
 48. Braak H., Muller CM., Rüb U., Ackermann H., Bratzke H., De Vos RAI., Del Tredici K. **2006** Pathology associated with sporadic Parkinson's disease-where does it end?. *J. Neural Transm., (Suppl. 70) (V-VI)*: 89-97.
 49. Breit S., Bouali-Benazzouz R., Benabid AL., Benazzouz A. **2001** Unilateral lesion of the nigrostriatal pathway induces an increase of neuronal activity of the pedunculopontine nucleus, which is reversed by the lesion of the subthalamic nucleus in the rat. *Eur. J. Neurosci.*, 14: 1833-1842.
 50. Breit S., Lessmann L., Benazzouz A., Schulz JB. **2005** Unilateral lesion of the pedunculopontine nucleus induces hyperactivity in the subthalamic nucleus and substantia nigra in the rat. *Eur. J. Neurosci.*, 22: 2283-2294.
 51. Breit S., Lessmann L., Unterbrink D., Popa RC., Gasser T., Schulz JB. **2006** Lesions of the pedunculopontine nucleus reverses hyperactivity of the subthalamic nucleus and substantia nigra pars reticulata in a 6-hydroxidopamine rat model. *Eur. J. Neurosci.*, 24: 2275-2282.
 52. Brouillet E., Beal MF. **1993** NMDA antagonist partially protect against MPTP induced neurotoxicity in mice. *Neuroreport*, 4: 387-390.
 53. Brundin P., Strecker RE., Londos E., Björklund A. **1987** Dopamine neurons grafted unilaterally to the nucleus accumbens affect drug-induced circling and locomotion. *Exp. Brain Res.*, 69: 183-194.
 54. Brust JCM. Substances with Neurotoxic Potential: Nicotine. En: *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Eds.: Peter Spencer, Herbert Schaumburg, Albert Ludolph. (Oxford University Press); NY, Oxford, **2000** pp. 860-862.
 55. Burns LH., Sato K., Wullner U., Isacson O. **1993** Intra-nigral infusion of AMPA-attenuates dopamine-dependent rotation in the rat. *Neuroreport*, 4: 1075-1078.
 56. Bustos G., Abarca J., Campusano J., Bustos V., Noriega V., Aliaga E. **2004** Functional interactions between somatodendritic dopamine release, glutamate receptors and brain-derived neurotrophic factor expression in mesencephalic structures of the brain. *Brain Res. Rev.*, 47: 126-144.
 57. Calabresi P., Centonze D., Bernardi G. **2000** Electrophysiology of dopamine in normal and denervated striatal neurons. *TINS*, 23(10): S57-60.
 58. Calne DB., Zigmond MJ. **1991** Compensatory mechanisms in degenerative neurologic diseases. *Arch. Neurol.*, 48: 361-363.
 59. Calon F., Morissette M., Goulet M., Grondin R., Blanchet P., Bedard P., Di Paolo Th. **1999** Chronic D₁ and D₂ dopaminomimetic treatment of MPTP-denervated monkeys: effects on basal ganglia GABA_A/BDZ receptor complex and GABA content. *Neurochem. Int.*, 35: 81-91.
 60. Calon F., Di Paolo Th. **2002** Levodopa response motor complications-GABA receptors and preproenkephalin expression in human brain. *Parkinsonism & Rel. Disord.*, 8: 449-454.
 61. Calon F., Morissette M., Rajput AH., Hornykiewicz O., Bedard PJ., Di Paolo T. **2003** Changes of GABA receptors and dopamine turnover in the post mortem brain of parkinsonians with levodopa – induced motor complications. *Mov. Disord.*, 18(3): 241-53.
 62. Campbell BM., Kreipke CW., Walker PD. **2006** Failure of MK-801 to Suppress D₁ Receptor – Mediated Induction of locomotor activity and striatal preprotachylinin mRNA expression in the dopamine-depleted rat. *Neurosci.*, 137: 505-517.
 63. Campusano J., Tapia-Arancibia L., Bustos G. **2001** The expression of NMDA receptors subunit I and metabotropic glutamate receptors subtypes 1 and 3, is differentially modulated by BDNF and glutamate receptors agonist in mesencephalic cultures. *J. Neurochem.*, (Suppl. 1) 78: 18-33.
 64. Cannizaro C., Tel BC., Rose S., Zeng BY., Jenner P. **2003** Increased neuropeptide Y mRNA expression in striatum in Parkinson's Disease. *Mol. Brain Res.*, 110: 169-176.
 65. Carlsson A. **1959** The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the central nervous system. *Pharmacol. Rev.*, 11: 490-493.
 66. Carlsson JD., Pearlstein RD., Buchholz J., Iacono R., Maeda G. **1999** Regional metabolic changes in the pedunculopontine nucleus of unilateral 6-OHDA Parkinson's model rats. *Brain Res.*, 828: 12-19.
 67. Carman LS., Gage FH., Shults CW. **1991** Partial lesions of the substantia nigra: relation between extent of lesion and rotational behavior. *Brain Res.*, 553: 275-83.

68. Carvallho GA., Nikkhah G. **2001** Subthalamic Nucleus Lesions Are Neuroprotective against terminal 6-OHDA – Induced Striatal Lesions and Restore Postural Balancing Reactions. *Exp. Neurol.*, 171: 405-417.
69. Caufield MP., Birdsall NJ. **1998** International Union of Pharmacology XVII. Classification of Muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.*, 50: 279-90.
70. Cébrian C., Parent A., Prensa L. **2005** Patterns of axonal branching of neurons of the substantia nigra pars reticulata and pars lateralis in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 492: 349-369.
71. Chang JW., Yang JS., Jeon MF., Lee BH., Chung SS. **2003** Effect of subthalamic nucleus lesion with kainic acid on the neuronal activities of the basal ganglia of rat parkinsonian model with 6-hydroxidopamine. *Acta Neurochir.*, 87: 163-168.
72. Chase Th., Justin D. **2000** Striatal dopamine- and glutamate – mediated dysregulation in experimental parkinsonism. *TINS*, 23(10): 86-90.
73. Chase Th., Oh JD. **2000** Striatal mechanisms and pathogenesis of parkinsonian signs. *Ann. Neurology*, 47 (Suppl. 1): 122-130.
74. Chase Th. **2004** Striatal plasticity and extrapyramidal motor dysfunction. *Parkinsonism & Rel. Disord.*, 10: 305-313.
75. Cobb WS., Abercrombie ED. **2003** Relative involvement of GP and STN in the Regulation of Somatodendritic Dopamine Release in Substantia nigra is dopamine – dependent. *Neurosci.*, 111: 777-786.
76. Copeland RL., Leggett Y., Kanaan YM., Taylor RE., Tizabi Y. **2005** Neuroprotective Effects of Nicotine against salsolinol-induced cytotoxicity. Implications for Parkinson’s Disease. *Neurotoxicity Res.*, 8(4): 289-293.
77. Correa M., Mingote S., Betz A., Wisniecki A., Salame JD. **2003** *Substantia nigra pars reticulata* GABA is involved in the regulation of operant lever pressing: pharmacological and microdialysis studies. *Neurosci.*, 119: 759-766.
78. Corrigan WA., Coen KM., Zhang J., Adamson KL. **2001** GABA mechanisms in the pedunculopontine tegmental nucleus influence particular aspects of nicotine self-administration selectively in the rat. *Psychopharmacol.*, 158: 190-197.
79. Court JA., Martín-Ruiz C., Graham A., Perry E. **2000** Nicotinic receptors in human brain: topography and pathology. *J. Chem. Neuroanat.*, 20: 281-298.
80. Dani JA., Ji D., Zhou FM. **2001** Synaptic Plasticity and Nicotine Addiction. *Neuron*, 31: 349-352.
81. Dauer W., Przedborski S. **2003** Parkinson’s Disease: Mechanisms and models. *Neuron*, 39: 889-909.
82. De Long MR. **1990** Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *TINS*, 13: 281-5.
83. Deutch AY. **2006** Striatal plasticity in parkinsonism: dystrophic changes in medium spiny neurons and progression in Parkinson’s disease. *J. Neural Transm.*, (Suppl. 70) (V-VI): 67-70.
84. Dezawa M., Kanno H., Hohimo N., Cho H., Matsumoto M., Tajima N., Yamada H. **2004** Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J. Clin. Investigation*, 113(12): 1701-1710.
85. Dingledine R., Bain MC. *Glutamate and Aspartate En: Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical aspects.* Eds.: Siegel G, Agranoff B, Albers W, Fisher S, Uhler M. (Lippicott Williams & Williams); Philadelphia, Baltimore, NY, **1999** pp. 315-333.
86. Dowd E., Dunnett S. **2005** Comparison of 6-OHDA – induced medial forebrain bundle and nigrostriatal lesions in a lateralised nose – poking in rats. *Beh. Brain Res.*, 159: 153-161.
87. Dunha AW., Wang YH., Yasuda RP., Kameyama K., Haganir RL., Wolfe BB., Standaert DG. **2000** Alterations in subunit expression, composition and phosphorylation of striatal NMDA glutamate receptors in the rat 6-OHDA models of Parkinson’s disease. *Mol. Pharmacol.*, 57: 342-352.
88. Dunnett S., Björklund A. **1999** Prospect for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson’s Disease. *Nature*, 399(6738): 32-39.
89. Erro E., Giménez-Amaya JM. **1999** El núcleo tegmental pedunculopontino. Anatomía, consideraciones funcionales e implicaciones fisiopatológicas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 22(2): 189-201.
90. Erro E., Lanciego JL., Jiménez-Amaya JM. **1999** Relationship between thalamostriatal neurons and pedunculopontine projections to the thalamus: a neuroanatomical tract-tracing study in the rat. *Exp. Brain Res.*, 127: 162-170.

91. Eslamboli A., Georgievska B., Ridley R., Baker H., Muzyczka N., Burger C., Mandel R., Annett L., Kirik D. **2005** Continuous Low-Level Glial Cell Line – Derived Neurotrophic Factor delivery using recombinant Adeno-associated viral vectors provides neuroprotection and induces behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.*, 25(4): 769-777.
92. Fahn S., Cohen G. **1992** The oxidative stress hypothesis in Parkinson's disease: supporting it. *Ann. Neurol.*, 32: 804-812.
93. Felder ChC., Bymaster FP., Ward J., De Lapp N. **2000** Therapeutic Opportunities for Muscarinic Receptors in the Central Nervous System. *J. Med. Chem.*, 43(23): 4333-4353.
94. Fernández A., DE Ceballos ML., Jenner P., Marsden CD. **1994** Neurotensin, substance P, delta and mu opioid receptors are decreased in basal ganglia of Parkinson's disease patients. *Neurosci.*, 61(1): 73-79.
95. Fernández-Espejo E. **2004** Pathogenesis of Parkinson's disease: prospects of neuroprotective and restorative therapies. *Mol. Neurobiol.*, 29(1): 15-30.
96. Fillion M., Tremblay L. **1991** Abnormal spontaneous activity of globus pallidus neurons in monkeys with MPTP-induced parkinsonism. *Brain Res.*, 547: 142-151.
97. Floran B., Aceves J., Sierra A., Martínez-Fong D. **1990** Activation of D₁ receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat. *Neurosci. Lett.*, 116: 136-140.
98. Florio T., Scarnati E., Confalone G., Minchella D., Galati S., Stanzione P., Stefani A., Mazzone P. **2007** High-Frequency Stimulation of the subthalamic nucleus modulates the activity of PPN neurons through direct activation of excitatory fibres as well as through indirect activation of inhibitory pallidal fibers in the rat. *Eur. J. Neurosci.*, 25(4): 1174-86.
99. Ford B., Holmes CJ., Mainville L., Jones BE. **1995** GABAergic neurons in the rat pontomesencephalic tegmentum: codistribution with cholinergic and other tegmental neurons projecting to the posterior lateral hypothalamus. *J. Comp. Neurol.*, 363: 177-96.
100. Forster G., Blaha CD. **2004** Pedunculopontine tegmental stimulation evokes striatal dopamine efflux by activation of acetylcholine and glutamate receptors in the midbrain and pons of the rat. *Eur. J. Neurosci.*, 17: 651-62.
101. García-Rill E., Houser CR., Skinner RD., Smith W., Woodward DJ. **1987** Locomotion – Inducing sites in the vicinity of the pedunculopontine nucleus. *Brain Res. Bull.*, 18: 731-738.
102. García-Rill E. **1991** The Pedunculopontine Nucleus. *Prog. Neurobiol.*, 36: 363-389.
103. García-Rill E. **1996** The Basal Ganglia and the Locomotor Regions. *Brain Res.*, 11: 4763.
104. Gerfen Ch. **1992** The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization *TINS*, 13: 281-285.
105. Gerfen Ch., Keefe K., Gauda E. **1995** D₁ and D₂ dopamine Receptor function in the Striatum: Coactivation of D₁ and D₂ Dopamine Receptors on separate populations of Neurons Results in Potentiated Immediate Early Gene Response in D₁-Containing Neurons. *J. Neurosci.*, 15(12): 8167-8176.
106. Gerfen Ch. **2000** Molecular effects of dopamine on striatal – projection pathways. *TINS*, 23(10): 21-27.
107. Giladi N., Melamed E. **2000** The Role of Functional Neurosurgery in Parkinson's disease. *IMAJ*, 2: 455-461.
108. Gilman AG. **1987** G Proteins: transducers of receptors –generated signals. *Ann. Review of Biochem.*, 56: 615-649.
109. Giniatullin R., Nistri A., Yakel J. **2005** Desensitization of nicotinic Ach receptors: shaping cholinergic signaling. *TINS*, 28(7): 371-8.
110. Goldberg M., Fleming S., Palacino JJ., Cepeda C., Lam H., Bhatnagar A., Meloni E. **2003** Parkin-deficient Mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J. Biol. Chem.*, 278(44): 43628-43635.
111. González-Hernández T., Barroso-Chinea P., Rodríguez M. **2004** Response to the GABAergic and Dopaminergic Mesostriatal Projections to the Lesion of the contralateral dopaminergic mesostriatal pathway in the rat. *Mov. Disord.*, 19(9): 1029-1042.
112. Graybiel AM. **1990** Neurotransmitters and Neuromodulator in the Basal Ganglia. *TINS*, 13: 244-254.
113. Greenamyre JT., O'Brien CF. **1991** N-methyl-D-aspartate antagonists in the treatment of Parkinson's Disease. *Arch. Neurol.*, 48: 977-981.
114. Groenewen HJ. **2003** The basal ganglia and motor control. *Neural Plasticity*, 10(1-2): 107-120.
115. Grofova I., Zhiou M. **1998** Nigral innervation of cholinergic and glutamatergic cells in the rat mesopontine tegmentum: light and electron microscopic anterograde tracing and immunohistochemical studies. *J. Comp. Neurol.*, 395: 359-379.

116. Guía para el cuidado, uso y reproducción de los animales de laboratorio en el Centro Para la Producción de Animales de Laboratorio. Ed. 02-2000. 100pp.
117. Gurd JW. **1997** Protein Tyrosine Phosphorylation: Implications for synaptic functions. *Neurochem. Int.*, 31(5): 635-649.
118. Guridi J., Herrero MT., Luquin MR., Guillen J., Ruberg M., Laguna J.; Vila M., Javoy-Agid F., Agid Y., Obeso JA. **1996** Subthalamotomy in parkinsonian monkeys. *Behavioural and Biochemical Analysis. Brain*, 119: 1717-1722.
119. Gutstein H., Akil H. Fármacos con acción en el sistema nervioso central: Analgésicos Opioides. En: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 10^{ma} Edición. Eds.: Hardman JG., Limbird LE., Goodman A. (McGrawHill); Toronto, **2003** pp.577-623.
120. Hadj Tahar A., Gregoire L., Darre A., Belanger N., Meltzer L., Bedard PJ. **2004** Effect of a selective glutamate antagonist on L-DOPA-induced dyskinesia in drug-naive parkinsonian monkeys. *Neurobiol. Dis.*, 15: 171-176.
121. Hallet PJ., Standaert DG. **2004** Rationale for and use of NMDA receptor antagonists in Parkinson's disease. *Pharmacol. & Therapeut.*, 102: 155-174.
122. Hamani C., Lozano A. **2003** Physiology and Pathophysiology of Parkinson's Disease. *Ann. NY Academic Sci.*, 991: 15-21.
123. Hamani C., Saint-Cyr JA., Fraser J., Kaplit M., Lozano A. **2003** The subthalamic nucleus in the context of movement disorders. *Brain*, 7: 1-17.
124. Harburg GC., Fall FS., Harrist AV., Sora I., Uhl GR., Eisch AJ. **2007** Knockout of the mu opioid receptors enhances the survival of adult-generated hippocampal granule cell neurons. *Neurosci.*, 144: 77-87.
125. Hassani OK., Francois C., Yelnik J., Féger J. **1997** Evidence for a dopaminergic innervation of the subthalamic nucleus in the rat. *Brain Res.*, 749: 88-94.
126. Hathout GM., Bhidayasiri R. **2005** Midbrain Ataxia: An Introduction to the Mesencephalic Locomotor Region and the Pedunculopontine Nucleus. *Am. J. Roentgenology (AMJRoentgenol)*, 184: 953-956.
127. Heeringa MJ., Abercrombie ED. **1995** Biochemistry of somatodendritic dopamine release in substantia nigra: An in vivo comparison with striatal dopamine release. *J. Neurochem.*, 65: 192-200.
128. Heise CE., Teo ZCh., Wallace BA., Ashkan K., Benabid AL., Mitrofanis J. **2005** Cell survival patterns in the pedunculopontine tegmental nucleus of MPTP monkeys and 6-OHDA – lesioned rats: evidence for differences to idiopathic Parkinson's disease patients?. *Anat. Embryol.*, 210: 287-302.
129. Henderson JM., Annett LE., Ryan LJ., Chiang W., Hidaka S., Torres EM. **1999** Subthalamic nucleus lesions induce deficits as well as benefits in the hemiparkinsonian rats. *Eur. J. Neurosci.*, 11: 2749-57.
130. Herrera-Marschitz M., You ZB., Goigny M., Silveira R., Godukhin OV., Chen Y., Espinoza S., Petterson E., Loidil CF. **1996** On the Origin of Extracellular Glutamate Levels Monitored in the Basal Ganglia of the Rat by In Vivo Microdialysis. *J. Neurochem.*, 66: 1726-35.
131. Hirsch EC., Graybiel AM., Duyckaerts C., Javoy-Agid F. **1987** Neuronal loss in the pedunculopontine tegmental nucleus in Parkinson Disease and in Progressive Supranuclear Palsy. *Proceeding Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 5976-5980.
132. Hirsch EC., Faucheux B., Damier P., Mouatt-Prigent A., Agid Y. **1997** Neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *J. Neural Transm.*, (Suppl. 1) 50: 79-88.
133. Hirsch EC., Perier C., Orioux G., Francois C., Feger J., Yelnik J., Vila M., Levi R., Tolosa ES., Marin C., Herrero T., Obeso JA., Agid Y. **2000(a)** Metabolic effects of nigrostriatal denervation in basal ganglia. *TINS*, 23(10): 78-82.
134. Hirsch EC., Hunot S., Hartmann A. **2000(b)** Mechanism of cell death in experimental models of Parkinson's Disease. *Funct. Neurol.*, 15(4): 229-37.
135. Hirsch EC., Hoglinder G., Rousset E., Breidert T., Parain K., Feger J., Ruberg M., Prigent A., Cohen-Salmon C., Launay JM. **2003** Animal Model of Parkinson's Disease in rodents induced by toxins: an update. *J. Neural Transm.*, 20: 89-100.
136. Hirsch EC. **2006** How to judge animal models of Parkinson's disease in terms of neuroprotection. *J. Neural Transm.*, (Suppl. 70) (V-VI): 255-260.
137. Höglund AU., Hamilton Ch., Lindblom L. **2000** Effects of microdialyzed oxotremorine, carbachol, ebipatidine and scopolamine on intraspinal release of Ach in the rat. *J. Pharmacol. & Exp. Therapeut.*, 295(1): 100-104.

138. Hoh JS., Gwag BJ. **1997** Attenuation of oxidative neuronal necrosis by a dopamine D₁ agonist in mouse cortical cell cultures. *Exp. Neurol.*, 146(2): 604-8.
139. Homma Y., Skinner RD., García-Rill E. **2002** Effects of Pedunclopontine Stimulation on Caudal Pontine Reticular Formation Neurons In Vitro. *J. Neurophysiol.*, 87: 3033-3047.
140. Hornykiewicz O. **1982** Brain neurotransmitter changes in Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, 3: 41-58.
141. Hurley MJ., Jenner P. **2006** What has been learnt from study of dopamine receptors in Parkinson's disease?. *Pharmacol. & Therapeutics*, 111: 715-728.
142. Iglesias M., Segura MF., Comella IX., Olmos G. **2003** Mu-opioid receptor activation prevents apoptosis following serum withdrawal in differentiated SH-SY5Y cells and cortical neurons via phosphatidylinositol 3-kinase. *Neuropharmacol.*, 44: 482-492.
143. Ikeda H., Akiyama G., Matsuzaki S., Sato M., Kohhikawa N., Cools AR. **2004** GABA_A receptors in the pedunclopontine tegmental nucleus play a crucial role in rat shell-specific dopamine mediated, but not shell-specific acetylcholine mediated turning behaviour. *Neurosci.*, 125: 553-62.
144. Jankovic J., Marsden C. *Therapeutics Strategies in Parkinson's Disease*. En: *Parkinson's Disease and Movement Disorders*. Eds.: Jankovic J, Tolosa E. (Williams & Wilkins); Baltimore, **1998** pp. 192-220.
145. Jankovic J. **2000** Complications and limitations of drug therapy for Parkinson's Disease. *Neurology*, 55(12): 2-6.
146. Janson AM., Fuxe K., Agnati LF., Kitayama I., Harfstrand A., Andersson K., Goldstein M. **1988** Chronic nicotine treatment counteracts the disappearance of tyrosine hydroxylase immunoreactive nerve cell bodies, dendrites and terminals in the mesostriatal dopamine system of the male rats after partial hemitransection. *Brain Res.*, 455: 332-45.
147. Jenkinson N., Nandi D., Asis TZ., Stein JF. **2005** Pedunclopontine nucleus: a new target for Deep Brain Stimulation for akinesia. *Neuroreport*, 16(17): 1875-1876.
148. Jenner P. **1998** Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's Disease. *Mov. Disord.*, 13: 24-34.
149. Jenner P. **2003** The contribution of the MPTP-treated primate model to the development of new treatment strategies for Parkinson's disease. *Parkinsonism & Rel. Disord.*, 9: 131-137.
150. Jeon BS., Jackson-Lewis V., Burke R. **1995** 6-OHDA Lesion of the Rat Substantia Nigra: Time Course and Morphology of Cell Death. *Neurodegeneration*, 4: 131-137.
151. Jeon MF., Ha Y., Cho Y., Lee BH., Park YG., Woo-Chang J. **2003** Effect of ipsilateral subthalamic nucleus lesioning in a rat parkinsonian model: study of behavior correlated with neuronal activity in the pedunclopontine nucleus. *J. Neurosurg.*, 99: 762-767.
152. Jeyarasasingam G., Tompkin L., Quick M. **2002** Stimulation of non $\alpha 7$ nicotinic receptors partially protects dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced toxicity in culture. *Neurosci.*, 109: 275-285.
153. Johansson PA., Andersson M., Andersson KE., Cenci MA. **2001** Alterations in cortical and basal ganglia levels of opioid receptor binding in a rat model of L-DOPA-Induced Dyskinesia. *Neurobiol. Dis.*, 8: 220-239.
154. Johnston RE., Schallert T., Becker JB. **1999** Akinesia and postural abnormality after unilateral dopamine depletion. *Beh. Brain Res.*, 104: 189-196.
155. Jones NM., Lawrence AJ., Beart PM. **2001** *In vivo* microdialysis reveals facilitatory metabotropic glutamate receptors regulating excitatory aminoacid release in rat nucleus tractus solitarius. *Neurochem. Int.*, 32: 31-38.
156. Jordán J., Galindo MaF., Ceña V., González-García C. **2000** Cisteína proteasa y neurodegeneración. *Rev. Neurol.*, 31(4): 333-340.
157. Jordán J. **2003** Apoptosis: Muerte Celular Programada. *Ámbito Farmacéutico*, 22(6): 100-106.
158. Kasa P. **1986** The cholinergic system in brain and spinal cord. *Prog. Neurobiol.*, 26: 211-272.
159. Kelsey JE., Mague SD., Pijanowski RS., Harris RC., Kleckner NW., Matthews RT. **2004** NMDA receptor antagonists ameliorate the stepping deficits produced by unilateral medial forebrain bundle injections of 6-OHDA in rats. *Psychopharmacol.*, 175: 179-188.
160. Kelly RM., Strick PL. **2004** Macro-architecture of basal ganglia loops with the cerebral cortex: use of rabies virus to reveal multisynaptic circuits. *Prog. Brain Res.*, 143: 449-459.
161. Kirik D., Rosebland C., Björklund A. **1998** Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-OHDA in the rat. *Exp. Neurol.*, 152: 259-277.

162. Klitenick MA., Kalivas PW. **1994** Behavioral and neurochemical studies of opioids effects in the pedunculo-pontine nucleus and mediodorsal thalamus. *J. Pharmacol. & Exp. Ther.*, 269: 437-48.
163. Knott C., Stern G., Kingsbury A., Welcher AA., Wilkin GP. **2002** Elevated glial and brain-derived neurotrophic factor in Parkinson's diseased nigra. *Parkinsonism & Rel. Disord.*, 8: 329-341.
164. Kobayashi Y., Saito Y., Isa T. **2001** Facilitation of saccade initiation by brainstem cholinergic system. *Brain & Develop.*, 23: 24-27.
165. Kopin IJ., Schoenberg DG. **1988** MPTP in Animal Models of Parkinson's Disease. *The Mount Sinai J. Medicine*, 55(1): 43-49.
166. Kosinski CM., Bradley SR., Conn PJ., Levey AI., Landwehrmeyer GB., Penney JB., Young AB., Standaert DG. **1999** Localization of metabotropic glutamate receptor 7mRNA and mGluR7 a Protein in the Rat Basal Ganglia. *J. Comp. Neurol.*, 415: 266-284.
167. Landreth GE. Growth Factors. En: *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Eds.: Siegel G., Agranoff B., Albers W., Fisher S., Uhler M. (Lippicott Williams & Williams); Philadelphia, Baltimore, NY, **1999** pp. 383-397.
168. Langston JW., Ballard P., Tetrud JW., Irwin I. **1983** Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219: 979-980.
169. Lee MS., Rinne JO., Marsden D. **2000** The Pedunculo-pontine nucleus: its role in the genesis of movement disorders. *Yonsei Medical J.*, 41(2): 167-184.
170. Levac BA., O'Dowd BF., George SR. **2002** Oligomerization of opioid receptors: generation of novel signaling units. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2: 76-81.
171. Levi MS., Brimble MA. **2004** A review of neuroprotection agents. *Curr. Med. Chem.*, 11(18): 2383-97.
172. Levin E. Nicotinic Systems: An Integrated Approach. En: *Nicotinic Receptors in the Nervous System*. Ed. Levin ED. (Boca Raton); Londres, NY, Washington, **2002** pp. 281-282.
173. Li Y., King MA., Grimes J., Smith N., de Febre CM., Meyer EM. **1999** $\alpha 7$ Nicotinic receptor mediated protection against ethanol-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Brain Res.*, 816: 225-228.
174. Liu B., Hong JSh. **2003** Role of Microglia in Inflammation-Mediated Neurodegeneratives Diseases: Mechanisms and Strategies for Therapeutic Intervention. *J. Pharmacol. & Exp. Therapeutics*, 304(1): 1-7.
175. Loftis JM., Janowsky A. **2003** The *N*-Methyl-D-Aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation and clinical implications. *Pharmacol. & Therapeutics*, 97: 55-85.
176. López-Lozano JJ., Alvarez-Santullano M. Antiglutamatergicos, anticolinérgicos y terapias neuroprotectoras en la enfermedad de Parkinson. En: *Tratado sobre la Enfermedad de Parkinson. 3^{era} Edición*. Eds: Tolosa ES., Obeso JA., Grandas FJ. (Grupo Bristol-Myers Squibb); Madrid, **2004** pp. 385-412.
177. López J., Tapia JR. **1995** Neurotoxic effects of intranigral injection of MPP+ on GABA-Containing and its relation to circling behaviour. *J. Neurochem.*, 2: 794-801.
178. Lunte CE., Scott D. **1992** Sampling living systems using microdialysis Probes. *Analytical Chem.*, 63(15): 773-775.
179. Luquin MR. Terapia celular en el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson. En: *Tratado sobre la Enfermedad de Parkinson. 3^{era} Edición*. Eds: Tolosa ES., Obeso JA., Grandas FJ. (Grupo Bristol-Myers Squibb); Madrid, **2004** pp. 453-460.
180. Luquin MR., Saldise L., Guillén J., Belzunegui S., San Sebastián W., Izal A., Garrido P., Vázquez M. **2006** Does increased excitatory drive from the subthalamic nucleus contribute to dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease?. *Exp. Neurol.*, 201: 407-415.
181. Maggio R., Riva M., Vaglini F., Fornai F., Racagni G., Corsini GU. **1997** Striatal increase of neurotrophic factors as a mechanism of nicotine protection in experimental parkinsonism. *J. Neural Transm.*, 104: 1113-1123.
182. Maggio R., Riva M., Vaglini F., Fornai F., Molteni R., Armogida M., Racagni G., Corsini GU. **1998** Nicotine prevents experimental parkinsonism in rodents and induces striatal increase of neurotrophic factors. *J. Neurochem.*, 71: 2439-2446.
183. Mai H. **2003** A functional role for nicotine in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 278: 1886-1891.
184. Manaye KF., Zweig R., Hersh LB., DeLa Calle S., Saper CB., German DC. **1999** Quantification of cholinergic mesopontine neuronal populations in the human Brain. *Neurosci.*, 89(3): 759-769.

185. Mandel S., Grunblatt E., Riederer P., Gerlach M., Levites Y., Youdim MB. **2003** Neuroprotective strategies in Parkinson's disease: an update on progress. *CNS Drugs*, 17(10): 729-62.
186. Mansour A., Taylor LP., Fine JL. **1997** Key residues defining the mu opioid receptor binding pocket: a site – directed mutagenesis study. *J. Neurochem.*, 68: 344-353.
187. Marin C., Papa S., Engber TM., Bonastre M., Tolosa E., Chase TN. **1996** MK-801 prevents levodopa-induced motor response alterations in parkinsonian rats. *Brain Res.*, 736: 202-205.
188. Marin C., Tolosa E. Función glutamatérgica y excitotoxicidad: relevancia etiopatogenia y terapéutica. En: Muerte neuronal y enfermedad de Parkinson: origen y terapéutica. Eds.: Obeso JA., Olanow WC., Schapira AHV., Tolosa E. (Addis International); Madrid, **1999** pp. 123-38.
189. Marino MJ., Awad M., Poisik O., Wittmann M., Conn PJ. **2002** Localization and physiological roles of metabotropic glutamate receptors in the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Amino Acids*, 23: 185-191.
190. Marino MJ., Valenti O., Conn PJ. **2003** Glutamate receptors and Parkinson's disease: opportunities for intervention. *Drugs Aging*, 20: 377-397.
191. Marti M., Sbrenna S., Fuxe L., Bianchi C., Beani L., Morari M. **2000** Increased responsivity of glutamate release from the substantia nigra pars reticulata to striatal NMDA receptor blockade in a model of Parkinson's disease. A dual probe microdialysis study in hemiparkinsonian rats. *Eur. J. Neurosci.*, 12: 1848-1850.
192. Martín LJ. **2001** Neuronal cell death in nervous system development, disease and injury. *Int. J. Mol. Med.*, 7(5): 455- 78.
193. Martyn Ch., Gale Chh. **2003** Tobacco, coffee and Parkinson's disease. *BMJ*, 326: 561-563.
194. Matsumura M. **2005** The pedunculopontine tegmental nucleus and experimental parkinsonism. *J. Neurol.*, 252(4): 1-11.
195. Matsumura M., Nambu A., Yamaji Y., Watanabe K., Imai H., Takada M. **2000** Organization of somatic motor inputs from the frontal lobe to the pedunculopontine tegmental nucleus in the macaque monkeys. *Neurosci.*, 98: 97-110.
196. Maurice N., Thierry AM., Glowinski J., Deniau JM. **2003** Spontaneous and evoked Activity of Substantia nigra pars reticulata during High-Frecuency Stimulation of the STN. *J. Neurosci.*, 23: 9929-9936.
197. Mayeux R. **2003** Epidemiology of Neurodegeneration. *Ann Rev. Neurosci.*, 26: 81-104
198. McGeer E., McGeer PL. Neurotransmitter and Their Receptors in the Basal Ganglia. En: *Advances in Neurology*. Eds.: Narabayashi H., Nagatsu T., Yanagisawa N., Mizuno Y. (Raven Press Ltd); NY, **1993** pp. 93-101.
199. Mena-Segovia J., Bolam JP., Magill PJ. **2004** Pedunculopontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same family?. *TINS*, 27(10): 585-588.
200. Mesulam MM., Mufson EJ., Wainer BH., Levey AI. **1983** Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neurosci.*, 10: 1185-201.
201. Metz GA., Whishaw IQ. **2002** Drug-Induced Rotation intensity in unilateral dopamine-depleted rats is not correlated with end point or qualitative measures of forelimb or hindlimb motor performance. *Neurosci.*, 111(2): 325-336.
202. Meyer EM., Kuryatov A., Gerzanich V., Lindstrom J., Papke RL. **1998** Analysis of 3-(4-hydroxy, 2-methoxybenzylidene) anabaseine selectivity and activity at human and rat $\alpha 7$ nicotinic receptors. *J. Pharmacol. & Exp. Therap.*, 287: 918-925.
203. Miklyaeva EI., Martens DJ., Whishaw IQ. **1995** Impairments and compensatory adjustments in spontaneous movement after unilateral dopamine depletion in rats. *Brain Res.*, 681: 23-40.
204. Miksys S., Tyndale RF. **2006** Nicotine induces brain CPY enzymes: relevance to Parkinson's Disease. *J. Neural Transm.*, (Suppl. 70) (V-VI): 177-180.
205. Minana MD., Montoliu C., Llansola M., Grisolia S., Felipe V. **1998** Nicotine prevents glutamate-induced proteolysis of the microtubule associated protein MAP-2 and glutamate neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons. *Neuropharmacol.*, 37: 847-57.
206. Mitchell IJ., Jackson A., Sambrook MA., Crossman AR. **1985** Common neural mechanism in experimental chorea and hemiballismus in the monkey. Evidences from 2-deoxyglucose autorradiography. *Brain Res.*, 339: 346-350.

207. Mitchell IJ., Clarke CE., Boyce S., Robertson RG., Peggs D., Sambrook MA. **1989** Neural mechanisms underlying parkinsonian symptoms based upon regional uptake of 2-deoxyglucose in monkeys exposed to MPTP. *Neurosci.*, 32: 213-26.
208. Mitchell JS., Silver RA. **2000** Glutamate spillover suppress inhibition by activating presynaptic mGluRs. *Nature*, 404: 498-501.
209. Mizukawa K., McGeer EG., McGeer PL. **1993** Autoradiographic study on dopamine uptake sites and their correlation with dopamine levels and their striata from patients with PD, AD and neurologically normal controls. *Mol. Chemistry Neuropathol.*, 18: 133-144.
210. Morens DM., Grandinetti A., Reed D., White LR., Ross GW. **1995** Cigarette smoking and protection from Parkinson's disease: false association or etiologic clue?. *Neurology*, 45: 1041-1051.
211. Morgan M., Nomikos S., Huston JP. **1993** Behavioral analysis of asymmetries induced by unilateral 6-OHDA injections into the substantia nigra. *Behav. Neural. Biol.*, 60: 241-250.
212. Muller T., Funchs G., Hahne M., Klein W., Schawarz M. **2006** Diagnostic aspects of early Parkinson's disease. *J. Neurol.*, (Suppl. 4) 253: 29-31.
213. Nakao N., Nakai E., Nakai K., Itakura T. **1999** Ablation of the Subthalamic Nucleus Support the Survival of Nigral Dopaminergic Neurons after Nigrostriatal Lesions Induced by Mitochondrial Toxin 3-Nitropropionic Acid. *Ann. Neurol.*, 45: 640-651.
214. Nakatsu Y., Kotake Y., Komasa K., Hakozaiki H., Taguchi R., Kume T., Akaike A., Ohta S. **2006** Glutamate excitotoxicity is involved in cell death caused by tributyltin in cultured rat cortical neurons. *Toxicol Sci.*, 89(1): 235-242.
215. Nandi D., Aziz T., Giladi N., Winter J., Stein J. **2002** Reversal of akinesia in experimental Parkinsonism by GABA antagonist micro-injections in the pedunculopontine nucleus. *Brain*, 125: 2418-30.
216. Nash JE., Brotchie JM. **2002** Characterization of striatal NMDA receptors involved in the generation of parkinsonian symptoms: intrastriatal microinjection studies in the 6-OHDA-lesioned rats. *Mov. Disord.*, 17: 455-466.
217. Neve KA., Seamans J., Trantham-Davidson H. **2004** Dopamine Receptor Signaling. *J. Receptors & Signal Transduct.*, 24(3): 165-205.
218. Newman MB. **2002** Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS. *Life Sci.*, 71: 2807-2820.
219. Nissbrandt H., Carlsson A. **1996** Turnover of dopamine and dopamine metabolites in rat brain: comparison between striatum and substantia nigra. *J. Neurochem.*, 49(3): 959-967.
220. Nordberg A., Nyberg P., Windblad B. **1985** Topographic distribution of choline acetyltransferase activity and muscarinic and nicotinic receptors in Parkinson brains. *Neurochem. Pathol.*, 3: 223-236.
221. Nosrat I., Smith Ch., Mullally P., Olson L., Nosrat Ch. **2004** Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *Eur. J. Neurosci.*, 19: 2388-2398.
222. Obeso JA., Grandas FJ., Vaamonte J. **1989** Motor complications associated with chronic levodopa therapy in Parkinson's disease. *Neurology*, 39: 11-19.
223. Obeso JA., Rodríguez-Oroz MC., Rodríguez M., Lanciego JL., Artieda J., Gonzalo N., Olanow W. **2000a** Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's Disease. *TINS*, 23(10): 3-18.
224. Obeso JA., Rodríguez-Oroz MC., Rodríguez M., Macías R., Alvarez L., Guridi J., Vitek J., De Long MR. **2000b** Pathophysiologic basis of surgery for Parkinson's disease. *Neurology*, (Suppl. 6) 55(12): (s7-s12).
225. Obrenovitch T. Excitotoxicity in neurological disorders: An alternative Viewpoint. En: *Neuroprotection: Basic & Clinical Aspects*. Eds.: Eng H., Marwah J. (Prominent Press); NY, **2001** pp 160-172.
226. Oh J., Russell D., Vaughan ChL., Chase T. **1998** Enhanced tyrosine phosphorylation of striatal NMDA receptors subunits: effect of dopaminergic denervation and L-DOPA administration. *Brain Res.*, 813: 150-159.
227. Olanow CW., Tatton WG. **1999** Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann. Rev. Neurosci.*, 22: 123-144.
228. Olsen WR., De Lorey TM. GABA and Glycine. En: *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Eds.: Siegel GJ., Agranoff BW., Albers RW., Fisher SK., Uhler MD., (Lippicott Williams & Wilkins); Philadelphia, **1999** pp. 335-342.
229. Onn SP., West AR., Grace AA. **2000** Dopamine-mediated regulation of striatal neuronal and network interactions.

- TINS, 23: S48-S56.
230. Onteniente B. **2000** The concept of neuroprotection. *Revista Neurol.*, (Paris) 156(2): 192-198.
 231. Orioux G., Francois C., Fèger J., Yelnik J., Vila M., Ruberg M., Agid Y., Hirsch E. **2000** Metabolic activity of excitatory parafascicular and pedunculopontine inputs to the subthalamic nucleus in a rat model of Parkinson's Disease. *Neurosci.*, 97(1): 79-88.
 232. Pahapill P., Lozano A. **2000**. The Pedunculopontine Nucleus and Parkinson's disease. *Brain*, 123: 1767-1783.
 233. Parent A., Hazrati LN. **1995** Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res.*, 20: 91-127.
 234. Parent A., Côté PY., Lavoie B. **1995** Chemical anatomy of primate basal ganglia. *Prog. Neurobiol.*, 46: 131-197
 235. Parkinson J. **1817** An Essay on the Shaking Palsy. London: Sherwood, Neely and Jones.
 236. Parson LH., Justice JB. **1994** Quantitative Approaches to *In Vivo* Brain Microdialysis. *Critical Reviews in Neurobiol.*, 8(3): 189-220.
 237. Paul G., Meissner W., Rein S., Harnack D., Winter Ch., Hosmman K. **2004** Ablation of the STN protects dopaminergic phenotype but not cell survival in a rat model of PD. *Exp. Neurol.*, 185: 272-284.
 238. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, NY. **1998**
 239. Phillips JM., Lam HO., Ackerson LC., Maidment NT. **2006** Blockade of mGluR5 glutamate receptors in the subthalamic nucleus ameliorates motor asymmetry in an animal model of Parkinson's Disease. *Eur. J. Neurosci.*, 23: 151-160.
 240. Piallat B., Benazzouz A., Benabid AL. **1996** Subthalamic nucleus lesion in rats prevents dopaminergic nigral neuron degeneration after striatal 6-OHDA injection: behavioural and immunohistochemical studies. *Eur. J. Neurosci.*, 8: 1408-1414.
 241. Piallat B., Benazzouz A., Benabid AL. **1999** Neuroprotective effect of chronic inactivation of the STN in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neural Transm.*, 55: 71-77.
 242. Piggot MA., Owens J., O'Brien J., Colloby S., Fenwick J., Wyper D. **2003** Muscarinic receptors in basal ganglia in dementia with Lewy bodies, Parkinson's Disease and Alzheimer's Disease. *J. Chem. Neuroanat.*, 25: 161-173.
 243. Pimlott SL., Piggot M., Owens J., Greally E., Court JA., Jaros E., Perry RH., Perry EK., Wyper D. **2004** Nicotine Acetylcholine Receptor Distribution in Alzheimer's Disease, Dementia with Lewy Bodies, Parkinson's Disease and Vascular Dementia: *In Vitro* Binding Study using 5-[¹²⁵I]-A-85380. *Neuropsychopharmacol.*, 29: 108-116.
 244. Poewe WH., Wenning GK. **1996** The natural history of Parkinson's Disease. *Neurology*, (Suppl. 3) 47: 146-152.
 245. Porter CC., Totaro JA., Burcin A. **1965** The relationship between radioactivity and norepinephrine concentrations in the brain and hearts of mice following administration of labelled methyl dopa or 6-OHDA. *J. Pharmacol. & Exp. Ther.*, 150: 17-22.
 246. Quick M., Kulak JM. **2002** Nicotine and Nicotinic Receptors: Relevance to Parkinson's Disease. *Neurotoxicol.*, 23: 581-594.
 247. Quick M. **2004** Smoking, nicotine and Parkinson's Disease. *TINS*, 27: 561-568.
 248. Ravenscroft P., Brotchie J. **2000** NMDA Receptors in the Basal Ganglia. *J. Anat.*, 196: 577-585.
 249. Ravina Bm., Fagan SS., Hart C., Hovinga G., Murphy CA. **2003** Neuroprotective agents for clinical trials in Parkinson's disease: a systemic assessment. *Neurology*, 60: 1234-1240.
 250. Rawls SM., McGinty J. **1998** Muscarinic Receptors Regulate Extracellular Glutamate Levels in the Rats Striatum: An *In Vivo* microdialysis study. *J. Pharmacol. & Exp. Therap.*, 286: 91-98.
 251. Reggo CA., Oliveira CR. **2003** Mitochondrial Dysfunction and Reactive Oxygen Species in Excitotoxicity and Apoptosis: Implications for the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. *Neurochem. Res.*, 28 (10): 1563-1574.
 252. Riederer P., Sian J., Gerlach M. **2000** Is there neuroprotection in Parkinson syndrome?. *J. Neurol.*, (Suppl. 4) 247: IV/8-11.
 253. Robinson TE., Mocsary Z., Camp DM., Whishaw IQ. **1994** Time Course of Recovery of Extracellular Dopamine Following Partial Damage to the Nigrostriatal Dopamine System. *J. Neurosci.*, 14(5): 2687-2696.
 254. Robledo P., Feger J. **1990** Excitatory influence of rat subthalamic nucleus to substantia nigra pars reticulata and the pallidal complex: electrophysiological data. *Brain Res.*, 518: 47-54.

255. Roceri R., Molteni R., Fumagalli F., Racagni G., Gennarelli M., Corsini G., Maggio R., Riva M. **2001** Stimulatory role of dopamine on fibroblast growth factor – 2 expression in rat striatum. *J. Neurochem.*, 76: 990-7.
256. Rodríguez M., Abdala P., Obeso JA. **2000** Excitatory Responses in the “Direct” Striatonigral Pathway: Effect of Nigrostriatal Lesion. *Mov. Disord.*, 15(5): 795-803.
257. Rodríguez M. El sistema dopaminérgico nigro-estriatal. En: Tratado sobre la Enfermedad de Parkinson. 3^{era} Edición. Eds.: Grandas FJ., Obeso JA, Tolosa ES. (Grupo Bristol-Myers Squibb); Madrid, **2004** pp. 39-49.
258. Rodríguez-Oroz MC., Rodríguez M., Guridi J., Mewes K., Chockkman V., Vitek J., DeLong MR., Obeso JA. **2001** The subthalamic nucleus in PD: somatotopic organization and physiological characteristics. *Brain*, 124: 1777-1790.
259. Rodríguez-Oroz MC., Rodríguez M., Guridi J., Alvarez-Erviti L., Obeso JA. Características clínicas y fisiopatología de la enfermedad de Parkinson. Base anatomofuncional. En: Tratado sobre la Enfermedad de Parkinson. 3^{era} Edición. Eds.: Grandas FJ., Obeso JA., Tolosa ES. (Grupo Bristol-Myers Squibb), Madrid, **2004** pp. 27-38.
260. Rogers JD. Amantadine. En: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds.: Spencer P., Schaumburg HH. (Oxford University Press); Oxford, NY, **2000** pp. 153-9.
261. Rosales MG., Martínez-Fong D., Morales R., Núñez A., Flores G., Góngora-Alfaro JL., Floran B., Aceves JA. **1997** Reciprocal Interaction between glutamate and dopamine in the pars reticulata of the rat substantia nigra: a microdialysis study. *Neurosci.*, 80(3): 803-810.
262. Rouse ST., Marino MJ., Bradley SR., Awad H., Wittmann M., Conn PJ. **2000** Distribution and roles of metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit: implications for treatment of Parkinson’s Disease and Related Disorders. *Pharmacol. & Therap.*, 88: 427-435.
263. Rowell PJ. Effects of Nicotine on Dopaminergic Neurotransmission. En: Nicotinic Receptors in the Nervous System. Ed.: Levin ED. (Press Boca Raton); Londres, NY, Washington, **2002** pp. 51-80
264. Ryan LJ., Sanders DJ. **1993** Subthalamic nucleus lesion regularize firing pattern in GP and SNr in rats. *Brain Res.*, 626: 327-331.
265. Ryan LJ., Sanders DJ. **1994** Subthalamic nucleus and Globus Pallidum Lesions alter activity in nigrothalamic neurons in rats. *Brain Res.*, 34(1): 19-26.
266. Rye D., Lee H., Saper C., Wainer B. **1988** Medullary and spinal efferents of the PPN tegmental nucleus and adjacent mesopontine tegmentum in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 269: 315-341.
267. Saitoh K., Hattori S., Song WJ., Isa T., Takakusaki K. **2003** Nigral GABAergic inhibition upon cholinergic neurons in the rat pedunclopontine tegmental nucleus. *Eur. J. Neurosci.*, 18: 879-886.
268. Samadi P., Gregoire L., Bédard P. **2003** Opioid antagonists increase the dyskinetic response to dopaminergic agents in parkinsonian monkeys: interaction between dopamine and opioid system. *Neuropharmacol.*, 45: 954-963.
269. Sánchez-Prieto J., Budd DC., Herrero I., Vázquez E., Nicholls DG. **1996** Presynaptic receptors and the control of glutamate exocytosis. *TINS*, 19: 235-9.
270. Sarre S., Ebinger G., Michotte Y. **1996** Levodopa transformation in hemiparkinsonian rats: effects of dopamine receptor agonists and antagonists. *Eur. J. Pharmacol.*, 296: 247-260.
271. Sarre S., Vandeneede D., Ebinger G., Michotte Y. **1998** Biotransformation of L-DOPA to dopamine in the substantia nigra of freely moving rats: effects of dopamine receptors agonists and antagonists. *J. Neurochem.*, 70: 1730-1739.
272. Sauer H., Oertel WH. **1994** Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-OHDA: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neurosci.*, 59: 401-415.
273. Savitt JM., Dawson VL., Dawson TM. **2006** Diagnosis and Treatment of Parkinson’s Disease: molecules to medicine. *The J. Clin. Investigations*, 116(7): 1745-1753.
274. Scanziani M., Gahwiler BH., Thompson SM. **1995** Presynaptic inhibition of excitatory synaptic transmission by muscarinic and metabotropic glutamate receptor activation in the hippocampus: are calcium channels involved?. *Neuropharmacol.*, 11: 1549-1557.
275. Schallert T., Fleming SM., Leasure JL., Tillerson JL., Bland ST. **2000** CNS Plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacol.*, 39: 777-787.
276. Schapira AHV. **1994** Evidence for mitochondrial dysfunction in PD: a critical appraisal. *Mov. Disord.*, 9: 125-138.

277. Schapira AHV. **2002** Dopamine agonist and neuroprotection in Parkinson's disease. *Eur. J. Neurol.*, (Suppl. 3) 9: 7-14.
278. Schmechel DE. Assessment of ultrastructural changes associated with Apoptosis. En: *Apoptosis in Neurobiology: Concepts and Methods* Eds.: Yusef A., Hannun RM. (Press Boca Raton); Londres, NY, Washington, **1999** pp. 153-181
279. Schobert A. **2004** Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.*, 318: 215-224.
280. Schubert D., Piasecki D. **2001** Oxidative glutamate toxicity can be a component of the excitotoxicity cascade. *J. Neurosci.*, 21(9): 7455-7462.
281. Sebastián AR. Factores Tróficos en la EP. En: *Tratado sobre la Enfermedad de Parkinson*. 3^{era} Edición. Eds.: Tolosa ES., Obeso JA., Grandas FJ. (Grupo Bristol-Myers Squibb); Madrid, **2004** pp. 413-427.
282. Semba K., Fibiger H. **1992** Afferent Connections of the Laterodorsal and the Pedunculopontine Tegmental Nuclei in the Rat: A Retro and Antero Grade Transport and Immunohistochemical Study. *J. Comp. Neurol.*, 323: 387-410.
283. Senoh S., Witkop B. **1959** Formation and rearrangements of aminochromes from a new metabolite of dopamine and some of its derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, 81: 6231-6235.
284. Shen KZ., Zhu ZT., Munhall A., Johnson SW. **2003** Dopamine receptor supersensitivity in rat subthalamus after 6-OHDA. *Eur. J. Neurosci.*, 18: 2967-2974.
285. Sigel E., Buhr A. **1997** The benzodiazepine binding site of GABA_A receptors. *Trends in Pharmacol. Sci.*, 18: 425-429.
286. Skapper SD., Facci L., Strijbos PJ. **2001** Neuronal protein kinase signalling cascade and excitotoxic cell death. *Ann NY Acad. Sci.*, 939: 11-22.
287. Smith ID., Sutton MA., Beninger RJ. **1997** Rotational Bias in Intact Rats Following Intrastratial Injections of Dopaminergic Drugs. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 58(2): 431-41.
288. Smith Y., Bevan MD., Shink E., Bolam JP. **1998** Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neurosci.*, 86(2): 353-387.
289. Smith Y., Kieval JZ. **2000** Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *TINS*, 23: S28-S33
290. Smith Y., Charara A., Paquet M., Kieval J., Pare J., Hanson JE. **2001** Ionotropic and Metabotropic GABA and Glutamate receptors in primate basal ganglia. *J. Chem. Neuroanat.*, 22: 13-42.
291. Sonsalla PK., Albers DS., Zeevalk GD. **1998** Role of glutamate in neurodegeneration of dopamine neurons in several animal models of parkinsonism. *Amino Acids*, 14: 69-74.
292. Soto-Otero R., Méndez-Alvarez E., Hermida A., López AM., Labandeira JL. **2002** Effects of (-) nicotine and (-) -conitine on 6-OHDA-induced oxidative stress and neurotoxicity: relevance for Parkinson's disease. *Biochem. Pharmacol.*, 64: 125-35.
293. Stefani A., Lozano A., Pepe A., Stanzione P., Galati S., Tropepi D., Pierantozzi M., Brusa L., Scarnati E., Mazzone P. **2007** Bilateral Deep Brain Stimulation of the pedunculopontine and subthalamic nuclei in severe Parkinson's disease. *Brain*, 130(6): 1596-607.
294. Steiniger B., Kretschmer B. **2003** Glutamate and GABA modulate dopamine in the pedunculopontine tegmental nucleus. *Exp. Brain Res.*, 149: 422-430.
295. Sun M., Kong L., Wang X., Lu X., Gao Q., Geller A. **2005** Comparison of the capability of GDNF, BDNF or both, to protect nigrostriatal neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.*, 1052: 119-129.
296. Takada M., Matsumura M., Kojima J., Yamaji Y., Inase M., Tokuno H., Nambu A., Imai H. **2000** Protection against dopaminergic nigrostriatal cell death by excitatory input ablation. *Eur. J. Neurosci.*, 12(5): 1771-80.
297. Takakusaki K., Habaguchi T., Ohtinata-Sugimoto J., Sayito K., Sakamoto T. **2003** Basal Ganglia efferents to the brainstem centres controlling postural muscle tone and locomotion: a new concept for understanding motor disorders in basal ganglia dysfunction. *Neurosci.*, 119: 293-308.
298. Taylor S., Srinivasan B., Wordinger R., Roque RS. **2003** Glutamate stimulates neurotrophin expression in cultured Müller cells. *Mol. Brain Res.*, 111: 189-197.
299. Tepper JM., Sun BC., Martin LP., Creese I. **1997** Functional roles of dopamine D₂ and D₃ autoreceptors on nigrostriatal neurons analyzed by antisense knockdown *in vivo*. *Neurosci.*, 17: 2519-2530.

300. Thoenen H., Tranzer JP. **1968** Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxydopamine. *Exp. Ther.*, 261: 271-288.
301. Thullier F., Lalonde R., Mahler P., Joyal CC., Lestienne F. **1996** Dorsal Striatal Lesions in Rats. Effects on Exploration and Motor Coordination. *Arch. Physiol. & Biochem.*, 104(3): 300-306.
302. Timmerman W., Abercrombie E. **1996** Amphetamine-Induced Release of Dendritic Dopamine in Substantia pars reticulata. D₁ Mediated Behavioral and Electrophysiological Effects. *Synapse*, 23: 280-291.
303. Trost M., Su S., Su P., Yen RF., Tseng HM., Barnes A., Ma Y. **2006** Network modulation by the subthalamic nucleus in the treatment of Parkinson's disease. *NeuroImage*, 31: 301-307.
304. Turner T. **2004** Nicotine enhancement of dopamine release by a calcium – dependent increase in the size of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *J. Neurosci.*, 24(50): 11328-11336.
305. Turski L., Bressler K., Retting KJ., Lochsmann P., Watchel H. **1991** Protection of substantia nigra from MPP⁺ neurotoxicity by NMDA antagonist. *Nature*, 349: 414-418.
306. Ungerstedt U. **1968** 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central dopamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, 5: 107-110.
307. Ungerstedt U., Arbuthnott GW. **1970** Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-OHDA lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.*, 24: 485-493.
308. Ungerstedt U., Pycock C. **1974** Functional correlates of dopamine neurotransmission. *Akad. Med. Wiss.*, 1278: 1-13.
309. Ungerstedt U. **1976** 6-Hydroxydopamine induced degeneration of the nigrostriatal dopamine pathway: the turning syndrome. *Pharmacol. Ther.*, 2: 37-40.
310. Ungerstedt U. Measurement of neurotransmitter release by intracranial dialysis. En: *Measurement of Neurotransmitter Release In Vivo*. Ed.: Marsden CA. (John Wiley & Sons); NY, **1984** pp. 81-105.
311. Ungerstedt U. Introduction to Intracerebral Microdialysis. En: *Microdialysis in Neurosciences*. Eds.: Robinson TE., Justice JB. (Elsevier Sciences Publisher); Amsterdam, **1991** pp. 276-281.
312. Valenti O., Marino MJ., Conn PJ. **2003a** Modulation of Excitatory Transmission onto Midbrain Dopaminergic Neurons of the Rat by Activation of Group III Metabotropic Glutamate Receptors. *Ann. NY. Academic Sci.*, 1003: 479-480.
313. Valenti O., Marino MJ., Wittmann M., Lis E., DiLella AG., Kinney GG., Conn PJ. **2003b** Group III Metabotropic Glutamate Receptors–Mediated Modulation of the Striatopallidal synapse. *J. Neurosci.*, 23(18): 7218-7226.
314. Viallet F., Witjas T. **2003** Neuroplasticity in Parkinson's Disease. *Rev. Neurol.*, 158(1): 42-8.
315. Vicent SR., Satoh K., Armstrong DM., Panula P., Vale W., Fibiger HC. **1986** Neuropeptides and NADPH-diaphorase activity in the ascending cholinergic reticular system of the rat. *Neurosci.*, 17: 167-82.
316. Vicent SR., Kimura H. **1992** Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neurosci.*, 17: 167-82.
317. Vila M., Levy R., Herrero MT., Ruberg F., Faucheux B., Obeso JA. **1997** Consequences of nigrostriatal denervation on the functioning of the basal ganglia in human and non human primates: an *in situ* hybridization study of cytochrome oxidase subunit I mRNA. *J. Neurosci.*, 17: 765-73.
318. Vila M., Marín C., Ruberg M., Jiménez A., Raisman-Vozari R., Agid Y., Tolosa E., Hirsch E. **1999** Systemic administration of NMDA and AMPA receptor antagonist reverses the neurochemical changes induced by nigrostriatal denervation in basal ganglia. *J. Neurochem.*, 73: 344-352.
319. Vila M., Périer C., Féger J., Yelnik J., Faucheux B., Ruberg M., Raisman-Vozari R., Agid Y., Hirsch EC. **2000** Evolution of changes in neuronal activity in the subthalamic nucleus of rats with unilateral lesion of the substantia nigra assessed by metabolic and electrophysiological measurements. *Eur. J. Neurosci.*, 12: 337-344.
320. Vilaro MT., Palacios JM., Mengod J. **1994** Multiplicity of muscarinic autorreceptors subtypes. Comparison of the distribution of cholinergic cells and cells containing mRNA for five subtypes of muscarinic receptors in the rat brain. *Brain Res. Mol.*, 21: 30-46.
321. Waelbroeck M. **2003** Allosteric Drugs Acting at Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Neurochem. Res.*, 28(3-4): 419-422.
322. Walters JR., Ruskin DN., Allers KE., Bergstrom DA. **2000** Pre and postsynaptic aspects of dopamine mediated transmission. *TINS*, 23(10): 41-48.

323. Wichmann T., Bergman H., De Long MR. **1994** The primate subthalamic nucleus III. Changes in motor behavior and neuronal activity in the internal pallidum induced by subthalamic inactivation in the MPTP model of parkinsonism. *J. Neurophysiol.*, 72: 521-30.
324. Wichmann T., De Long MR. Physiology of Basal Ganglia and pathophysiology of Movement Disorders of Basal Ganglia. En: *Movement Disorders*. Eds.: Wats RL., Koller WC. (McGraw Hill); NY, **1997** pp. 87-98.
325. Wichmann T., De Long M. Neurocircuitry of Parkinson's Disease. En: *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. Eds.: Davis K., Charney D., Coyle J. (American College of Neuropsychopharmacology); Washington, **2002** pp. 35-45.
326. Whishaw IQ., Castaneda E., Gorny BP. **1992** Dopamine and skilled limb use in the rat: more severe bilateral impairments follow substantia nigra than sensorimotor cortex 6-OHDA injection. *Beh. Brain Res.*, 47: 89-92.
327. Whishaw IQ., Gorny BP., Tran-Nguyen LTH., Castañeda E. **1994** Making two movements at once: impairments of movement, posture and their integration underlie the adult skilled reaching deficit on neonatally-depleted rats. *Beh. Brain Res.*, 12: 65-77.
328. Whishaw IQ., Woodward NC., Miklyeva E., Pellis SM. **1997** Analysis of limb use by control rats and unilateral DA-depleted rats in the Montoya staircase test: movements, impairments and compensatory strategies. *Behav. Brain Res.*, 89: 167-177.
329. Wilson Ch., Dani J. **2003** Muscarinic and Nicotinic Cholinergic Mechanisms in the Mesostriatal Dopamine Systems. *Neuroscientist*, 9(1): 23-36.
330. Windels F., Bruet N., Poupard A., Feuerstein C., Bertrand A., Savasta M. **2003** Influence of the Frequency Parameter on extracellular glutamate and γ -Aminobutyric Acid in Substantia Nigra and Globus Pallidus during electrical stimulation of subthalamic nucleus in rats. *J. Neurosci. Res.*, 72: 259-267.
331. Winn P. **2006** How best to consider the structure and function of the pedunculopontine tegmental nucleus: evidence from animal studies. *J. Neurol. Sci.*, 248: 234-250.
332. Wittmann M., Marino MJ., Bradley SR., Conn J. **2001** Activation of Group III mGluRs inhibits GABAergic and Glutamatergic Transmission in the SNpr. *J. Neurophysiol.*, 85: 1960-1968.
333. Wittmann M., Marino MJ., Bradley SR., Conn J. **2002** Dopamine Modulates the function of Group II and Group III Metabotropic Glutamate receptors in the SNpr. *J. Pharmacol. & Exp. Ther.*, 302: 433-441.
334. Wonnacott S. **1997** Presynaptic nicotinic Ach receptors. *TINS*, 20(2): 92-97.
335. Wonnacott S., Mogg A., Bradley A., Jones IJ. Presynaptic Nicotinic Acetylcholine Receptors: Subtypes Mediating Neurotransmitter Release. En: *Nicotinic Receptors in the Nervous System*. Ed.: Levin ED. (Press Boca Raton); Londres, NY, Washington, **2002** pp. 29-50.
336. Wonnacott S., Sidhpura N., Balfour DJK. **2005** Nicotine: from molecular mechanisms to behavior. *Curr. Opinion in Pharmacol.*, 5: 53-59.
337. Wu SS., Frucht SJ. **2005** Treatment of Parkinson's disease: what on the horizon?. *CNS Drugs*, 19(9): 723-743.
338. Xie Yu-X., Bezdard E., Zhao BL. **2005** Investigating the Receptor-independent Neuroprotective Mechanisms of Nicotine in Mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 280 (37): 32405-32412.
339. Yamamoto BK., Davis S. **1992** Dopaminergic modulation of glutamate release in striatum as measured by microdialysis. *J. Neurochem.*, 58: 1736-42.
340. Yan Z., Flores-Hernández J., Surmeier DJ. **2001** Coordinated expression of muscarinic receptor messenger RNAs in striatal medium spiny neurons. *Neurosci.*, 103: 1017-1024.
341. Yeomans J., Forster G., Blaha Ch. **2001** M5 Muscarinic are needed for slow activation of dopamine neurons and for rewarding brain stimulation. *Life Sci.*, 68: 2449-2456.
342. Zeevalk GD., Manzano L., Sonsalla PK. **2000** NMDA receptors modulate dopamine loss due to energy impairment in the substantia nigra but not striatum. *Exp. Neurol.*, 161: 638-646.
343. Zhou FM., Liang Y., Dani JA **2001** Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum. *Nature Neurosci.*, 4(12): 1224-1229.
344. Zhou FM., Wilson CH., Dani J. **2002** Cholinergic interneurons characteristics and nicotinic properties in the striatum. *J. Neurobiol.*, 53: 590-605.
345. Zhou FM., Wilson CH., Dani JA. **2003** Muscarinic and nicotinic cholinergic mechanisms in the mesostriatal dopamine systems. *The Neuroscientist*, 9(1): 23-36.
346. Zigmond MJ., Stricker EM. **1984** Parkinson's disease: studies with an animal model. *Life Sci.*, 35: 5-18.

347. Zigmond MJ., Hastings TG., Pérez RG. **2002** Increased dopamine turnover after partial loss of dopaminergic neurons: compensation or toxicity?. *Parkinsonism & Rel. Disord.*, 8: 389-393.
348. Zuddas A., Oberto G., Vaglini F., Fascetti F., Formai F., Corsini G. **1992** MK-801 prevents MPTP-induced parkinsonism in primates. *J. Neurochem.*, 59: 733-739.
349. Zweig RM., Jankel WR., Hedreen JC. **1989** The Pedunculopontine Nucleus in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 26: 41-46.

AUTOBIBLIOGRAFIA

ARTÍCULOS DONDE SE HAN DIVULGADO LOS RESULTADOS DE LA TESIS

- **Blanco Lezcano L**, Pavón Fuentes N, Blanco Lezcano V. “Microdiálisis Cerebral. Principales Aplicaciones de la Técnica”. 2001 Revista de Neurología 33(5): 464-470.
- **Blanco Lezcano L**, Pavón Fuentes N, Serrano Sánchez T, Blanco Lezcano V, Coro Grave de Peralta Y, Joseph Bauza Y. “Núcleo Pedunculopontino: una estructura involucrada en el procesamiento motor y emocional”. 2003 Revista Neurología 36(12): 1181-1184.
- **Blanco Lezcano L**, Rocha Arrieta LL, Martínez Martí L, Alvarez Glez L, Pavón Fuentes N, Macías Glez R, Serrano Sánchez T, Rosillo Martí JC, Coro Grave de Peralta Y, Bauzá Claderín Y. “La lesión de la *substantia nigra pars compacta* y del núcleo subtalámico modifica la densidad de receptores muscarínicos en distintos núcleos de los ganglios basales”. 2004 Revista Neurología 38(2): 128-132.
- **Blanco Lezcano L**, Rocha Arrieta LL, Alvarez Glez L, Martínez Martí L, Pavón Fuentes N, Glez Fraguela MaE, Bauzá Calderín Y, Coro Grave de Peralta Y. “Efecto de la lesión de 6-OHDA y de NST sobre la liberación de aminoácidos neurotransmisores en el NPP”. 2005 Revista Neurología 40(1): 23-29.
- **Blanco Lezcano L**. “The *substantia nigra pars compacta* and subthalamic nucleus lesion modifies the muscarinic receptors density in several basal ganglia nucleus”. Parkinsonism & Related Disorders 12: 233. Abstract of the 16th International Congress on Parkinson’s Disease and Related Disorders, Berlin, June 5th-9th 2005.
- **Blanco Lezcano L**, Rocha Arrieta LL, Lorigados Pedre L, Pavón Fuentes N, Martínez Martí L, Blanco Lezcano V, Coro Grave de Peralta Y. “Cambios en la densidad de receptores a benzodiazepinas y mu opioides en la *substantia nigra pars compacta* y el núcleo pedunculopontino de ratas, por inyección local de 6-OHDA”. 2006 Revista Biotecnología Aplicada 23: 211-217.
- **Blanco Lezcano L**, Lorigados Pedre L, García Minuet R, Martínez Martí L, Glez Fraguela MaE. “Aumento de las concentraciones extracelulares de aminoácidos neurotransmisores y muerte celular en el núcleo pedunculopontino de ratas hemiparkinsonianas por inyección intracerebral de 6-OHDA”. 2007 Revista Biotecnología Aplicada 24: 33-40.

ARTÍCULOS RELACIONADOS CON EL TEMA DE LA TESIS

- **Blanco L**, Alvarez P, Macías R, Pavón N. “Estudio de algunas variables conductuales y sus modificaciones bajo el efecto de la apomorfina en monos hemiparkinsonianos *Macaca arctoides*”. 1997 Revista Neurológica Argentina 22: 108-115.
- **Blanco L**, Pavón N, Macías R, Martínez L, Alvarez P. “Trasplante de células dopaminérgicas fetales simultáneamente en *striatum* y *substantia nigra pars reticulata* en rats hemiparkinsonianas”. 1998 Revista Neurología 26 (151): 361-365.
- Pavón N, Vidal L, Macías R, **Blanco L**. Mecanismos de muerte neuronal y enfermedades neurodegenerativas. 1998 Revista CNIC C. Biológicas 29: 2 97-108.
- **Blanco L**, Pavón N, Macías R, Castellanos O. “Change in the Pattern of Spontaneous Motor Activity in Non-Human Primates under the influence of MPTP”. Brain Function, Behaviour, Drugs and Disease: Neurosciences in the Caribbean. Progress and Promise. (2000).

- **Blanco L**, Pavón N, Alvarez P, Macías R, Martínez L. “Microtrasplante simultáneo de células mesencefálicas fetales en *striatum* y *substantia nigra pars reticulata* de ratas hemiparkinsonianas. Estudio Conductual”. 2000 Revista Neurología 30(12): 1122-1127.
- Lorigados L, Pavón N, Alvarez L, Mac Rae A, Serrano T, **Blanco L**, Macías R. Nerve Growth Factor in Parkinson`s disease and experimental parkinsonian rats. 2002 Brain Research 952: 122-127.
- Alberti E, García R, Serrano T, **Blanco L**, Martínez L, Mendoza Y, Rosillo JC, Castillo L, De la Cuétara K. “Evaluación de la supervivencia de las células mononucleadas de la médula ósea trasplantadas en un modelo de ratas con lesión estriatal por ácido quinolínico”. 2005 Revista Neurología 40(9): 518-522.
- Serrano T, Alberti E, Glez MaE, **Blanco L**. Rotating and Neurochemical activity (in cerebral tissue) of lesioned rats with quinolinic acid and transplanted cells. 2006 Brain – on-line (382-384).

EVENTOS CIENTÍFICOS DONDE SE HAN PRESENTADO LOS RESULTADOS DEL TRABAJO.

- “Introducción del método de construcción de cánulas de microdiálisis cerebral”. Premio Relevante en el CIREN, municipio Playa y Ponencia Destacada en el XIV Fórum de Ciencia y Técnica. (2002)
- “Effects of 6-hydroxydopamine lesion on Glu and GABA release in the pedunculopontine nucleus”. Restauración Neurológica 2004. Habana, Cuba.
- “La lesión de la *substantia nigra pars compacta* y del núcleo subtalámico modifica la densidad de receptores muscarínicos en distintos núcleos de los ganglios basales”. Concurso Central Premio Anual de Salud (2004). (Categoría: Artículo Científico) Habana, Cuba
- “The *substantia nigra compacta* and subthalamic nucleus lesion modifies the muscarinic receptors density in several basal ganglia *nuclei*”. International Congress of Parkinson`s Disease and Related Disorders. Berlín, Alemania (2005).
- “Effect of 6-OHDA lesion on Glu and Gaba release in the pedunculopontine nucleus”. 16th International Congress of Parkinson`s Disease and Related Disorders. Berlín, Alemania (2005).
- “Efecto de la lesión de la *Substantia nigra pars compacta* y del Núcleo Subtalámico sobre la liberación de Glu y GABA y la densidad de receptores muscarínicos y opioides en el núcleo pedunculopontino de ratas hemiparkinsonianas”. Informe de Investigación Terminada. Jornada Interna CIREN (2005).
- “Efecto de la lesión de la *Substantia nigra pars compacta* y del Núcleo Subtalámico sobre la liberación de Glu y GABA y la densidad de receptores muscarínicos y opioides en el núcleo pedunculopontino de ratas hemiparkinsonianas”. Concurso Central Premio Anual de Salud (2005). (Categoría: Investigación Básica) Habana, Cuba.
- “Efecto de la lesión de la SNc y del NST así como de la administración de MK-801 sobre las concentraciones de aminoácidos neurotransmisores en el NPP de ratas hemiparkinsonianas”. V Conferencia Internacional de Neurología, Santiago de Cuba, Cuba (2006).
- “Impact of the cholinergic system manipulations through systemic (-) nicotine administration on the Glu and GABA extracellular concentration in PPN and motor execution of hemiparkinsonian rats”. III Neurotoxicity Society Meeting: “Neurochemical Mechanisms for Neurodegenerative Disorders”. Pucón, Chile (2007).
- “Efecto de la administración sistémica de (-) nicotina sobre los trastornos de coordinación, la asimetría motora y la liberación de Glu y GABA en el NPP de ratas hemiparkinsonianas”. Informe de Investigación Terminada. Jornada Interna CIREN (2007).