

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Papel del óxido nítrico en la evolución del parkinsonismo y en las discinesias causadas por L-dopa en ratas y en primates no humanos

D. José Enrique Yuste Jiménez

2013

Universidad de Murcia

Facultad de Medicina

Departamento de Anatomía Humana y Psicobiología

Papel del óxido nítrico en la evolución del parkinsonismo y en las discinesias causadas por L-DOPA en ratas y en primates no humanos

Tesis doctoral

José Enrique Yuste Jiménez

2013

Papel del óxido nítrico en la evolución del parkinsonismo y en las discinesias causadas por L-DOPA en ratas y en primates no humanos

Tesis doctoral presentada por: José Enrique Yuste Jiménez

Directores:

María Trinidad Herrero Ezquerro

Catedrática de Anatomía Humana

Francisco de Asis Ros Bernal

Doctor del área de Anatomía y Embriología Humana

Departamento de Anatomía Humana y Psicobiología Facultad de Medicina Universidad de Murcia

Murcia, 2013

A mis padres, a mi hermana,

A mi mujer y a mi hija

por todo el tiempo del que les he privado.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a la Universidad de Murcia la formación recibida durante todos estos años, y al Instituto de Envejecimiento por toda la ayuda recibida desde que comencé el Master con ellos, en especial interés a su director Vicente Vicente Ortega.

A la directora de mi tesis, la profesora María Trinidad Herrero Ezquerro, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis, por su dedicación, por sus enseñanzas y por su ayuda durante todos estos años.

Al codirector de mi tesis, el Dr. Francisco Ros Bernal por todo el trabajo y el tiempo que ha invertido en mí. Gracias por haber confiado siempre en mí y por tu constante preocupación dentro y fuera del laboratorio, para mi has sido como el hermano mayor que nunca tuve.

Muy especialmente quiero dar las gracias a la Dra. Marcela Bermúdez Echeverry por todo lo que me ha enseñado, por sus sabios consejos y por los buenos momentos que hemos pasado juntos. Por hacer de mí un buen investigador, estoy seguro de que no hubiera podido tener mejor maestra. Solo decirte gracias y mil veces gracias.

A la Dra. María Luisa Laorden del Departamento de Farmacología de la Universidad de Murcia por haberme brindado la oportunidad de trabajar con su grupo de investigación durante casi un año y a la que considero como una directora más de esta tesis. Ha sido más tiempo del esperado, pero sin duda, ha merecido la pena.

A todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio. A Ernesto, Cristina, Lola y Victor por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos en el labo y estar siempre dispuestos a echar una mano. A Aurora por toda la ayuda que me has ofrecido con el tejido de los monos en mi periodo experimental de la tesis, de verdad, mil gracias. Sin tí esto no hubiera sido posible. A Carmen por todo el tiempo que hemos compartido juntos y por haberme ayudado desde el primer día que llegue al laboratorio.

A todos los que han pasado por el laboratorio y que de alguna manera han colaborado a que esto fuera posible Carlos, Cristina, Valentina, M^a Angeles, Egle, Lisette y Paola.

A mis compañeros de otros laboratorios y amigos del grupo de investigación de Farmacología (Pilar, Cristina, Juanan, Dani, Javi, Juani y Lucía) por la colaboración con el trabajo de los Western Blots de los monos y por toda la ayuda y consejos que siempre necesité.

Al Dr. Zenewton Gama por todas esas tardes de Agosto tomándonos el granizado de limón en el labo y discutiendo de fútbol, además de ciencia...

A Nuria, la veterinaria y al personal del animalario, especialmente a Pepa y Marife por todo el esfuerzo y dedicación que han puesto para que el trabajo con los monos saliera adelante y aquí está el resultado.

Al Dr. Juan Francisco Madrid y al Dr. Manuel Avilés por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos en el quirófano experimental. Al Dr. Nicolás Cuenca y a Laura Campello de la Universidad de Alicante por el trabajo de obtención de muestras con los ojos de macacos.

Al Dr. Mario Valentino y a la gente de su grupo de investigación, por los meses que tuve la suerte de pasar en su laboratorio en Malta. Sin duda, fue una de las cosas más gratificantes de esta experiencia, gracias por su ayuda y por su confianza.

A la Dra. Maria Egle Stefano por su exhaustiva revisión de esta tesis y su análisis en la discusión del manuscrito.

A Conrado y a Ana por todo el tiempo que hemos compartido juntos y que nos queda por compartir... por su buen humor y por haberme ayudado en el final de esta tesis. Moltes gràcies.

Finalmente, quiero dar las gracias a las personas que siempre han estado allí. A mi mujer Carmen María, porque juntos formamos un equipo, y ahora ya una familia (junto a mi hija María). Gracias por haber sabido entender que esto era importante para mí, por tu paciencia, por tu desinteresada ayuda con esta tesis. Por todo lo que hemos compartido juntos, pero sobre todo, por querer compartir conmigo todo lo que venga a partir de ahora. A mi hija María por sacarme siempre una sonrisa y animarme en los malos momentos.

A mi hermana, por saber escucharme, por animarme y convertir en buenos los malos momentos. Por ultimo quiero dar las gracias a mis padres. Porque solo vosotros y yo sabemos lo que me ha costado llegar hasta aquí. Por ser como sois, por transmitirme vuestros valores y gracias a vosotros soy lo que soy.

ÍNDICE

ÍNDICE1				
AB	REVIATURAS	7		
IN	IRODUCCIÓN	11		
1		12		
1.	LA ENFERMEDAD DE PARKINSON (EP)	13		
	1.1. Primera resena misiorica	14		
	1.2. Epidemiologia	15		
	1.5. Caracteristicas neuropatologicas	10		
	1.4. Citoarquitectura de la Sustancia Negra	17		
	1.4.2 Citoarquitectura del neostriado	10		
	1.5. Clínica v diagnóstico de la FP	····· 10 20		
	1.6. Tratamiento de la EP	20 24		
2	MODELOS EXPERIMENTALES DE ENFERMEDAD DE PARKINSON	24		
2.	2.1 6-HIDROXIDOPAMINA	29		
	2.1.1. Parkinsonismo inducido por 6-OHDA			
	2.2. Parkinsonismo inducido por la toxina 1-metil-4-fenil-1.2.3.6-tetrahidropiridina (MPTP)	32		
	2.2.1. Mecanismo de acción del MPTP	33		
	2.2.2. Modelo MPTP en el primate no humano	34		
3.	LEVODOPA Y DISCINESIAS	35		
	3.1. Bioquímica de la levodopa	35		
	3.2. Terapia con levodopa en la EP	36		
	3.3. Efectos secundarios de la levodopa	38		
	3.3.1. Efectos secundarios a corto y a medio plazo	38		
	3.3.2. Efectos secundarios a largo plazo	39		
	3.3.3. Discinesias	42		
4.	TRASTORNOS NO MOTORES EN LA EP	45		
	4.1. Complicaciones psiquiátricas	46		
	4.2. Denervación simpática cardíaca en la EP	47		
5.	EL SISTEMA DEL ÓXIDO NÍTRICO	49		
	5.1. Biosíntesis del NO	49		
	5.2. La Óxido Nítrico Sintasa neuronal (NOSn)	51		
	5.3. NO y el Sistema Nervioso Central	53		
	5.3.1. El NO y la modulación de la actividad estriatal	53		
	5.3.2. El NO y su interacción con otros neurotransmisores en el control motor	57		
	5.4. El NO y su implicación en las enfermedades neurodegenerativas	58		
	5.5. Inhibidores de la síntesis del NO	62		
	5.6. Papel del NO en la regulación de las discinesias inducidas por levodopa	64		
PL	ANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	69		
MA	ATERIAL Y MÉTODOS	75		
1	EXPERIMENTO EN RATAS	77		
1.	1.1 Animales	י זי רד		
	1.2 Cirugía estereotáxica Microinvecciones con 6-OHDA	יי דד		
	1.3. Tratamiento farmacológico			
	1.4. Tests comportamentales	70		
	1.4.1. Evaluación del comportamiento rotatorio	79		
	1.4.2. Elevated Body Swing Test (EBST) o ensavo del cuerpo elevado v balanceado	79		
	1.5. Procesamiento histológico	80		
	1.5.1. Inmunohistoquímica e histoquímica	81		

	1.6. Análisis por Western-Blot	82
	1.7. Análisis y cuantificación	84
	1.7.1. Análisis estereológico	84
	1.7.2. Análisis por Western-Blot	85
	1.8. Análisis estadístico	85
2.	EXPERIMENTO EN PRIMATES NO HUMANOS	86
	2.1. Animales y grupos experimentales	86
	2.2. Métodos	87
	2.2.1. Intoxicación por MPTP	87
	2.3. Estudio clínico y comportamental	89
	2.3.1. Evaluación motora	89
	2.3.2. Evaluación de las discinesias	91
	2.3.3. Análisis estadístico	92
	2.4. Estudio anatomo-patológico	92
	2.4.1. Obtención y disección de áreas cerebrales	92
	2.4.2. Procesamiento histológico	93
	2.4.2.1. Corte de los bloques	93
	2.4.2.2. Inmunohistoquímica para Tirosina Hidroxilasa (TH) y el transportador de	•
	dopamina (DAT)	94
	2.4.2.3. Montaje, deshidratación y desengrasado de las secciones histológicas	95
	2.4.2.4. Análisis y cuantificación de los estudios	96
	A. Cuantificación de la densidad de terminales dopaminérgicos en el estriado	96
	B. Estimación del número de neuronas inmunoreactivas para TH de los grupos	3
	dopaminérgicos del mesencéfalo (SNpc y ATV)	97
	2.5. Estudio del metabolismo dopaminérgico	99
	2.5.1. Análisis de catecolaminas y sus metabolitos	99
	2.5.2. Micro-punch para analizar por HPLC	100
	2.5.3. Homogenización	100
3.	ESTUDIO DE LA DENERVACIÓN SIMPÁTICA DEL CORAZÓN DE LOS PRIMATES NO)
	HUMANOS	101
	3.1. Grupos experimentales y obtención de tejido cardíaco	101
	3.2. Análisis por Western-Blot	102
	3.3. Análisis por HPLC: Estimación de noradrenalina y su metabolito normetanefrina en el	l
	corazón de los monos parkinsonianos	104
	3.4. Estadística y análisis de datos	105
DE		107
KE	SULTADOS	107
1.	RESULTADOS EN LOS EXPERIMENTOS EN RATAS	109
	1.1. El 7-NI revierte el comportamiento parkinsoniano en ratas lesionadas con 6-OHDA	109
	1.2. El 7-NI protege la vía nigrostriatal en las ratas lesionadas con 6-OHDA	110
	1.3. El 7-NI reduce la expresión estriatal de nNOS en ratas lesionadas con 6-OHDA	113
	1.4. El 7-NI reduce la fosforilación de la DARPP-32 en las ratas lesionadas con 6-OHDA	114
	1.5. El 7-NI reduce los niveles de DARPP-32 fosforilada y aumenta los de DARPP-32 total er	1
	ratas lesionadas con 6-OHDA	118
2.	RESULTADOS EN LOS EXPERIMENTOS EN MONOS	120
	2.1. Actividad motora de los animales	120
	2.2. Resultados del estudio clínico de las discinesias con el inhibidor 7-NI	121
	2.3. Histoquímica	126
	2.3.1. Neuronas TH ⁺ del mesencéfalo: Grupos dopaminérgicos A9 y A10	126
	2.3.1.1. Grupo A9: Sustancia Negra pars compacta	126
	2.3.1.2. Grupo A10: Área Tegmental Ventral (VTA)	128

ÍNDICE

	2.3.2. Medida de la densidad óptica de TH y DAT en el estriado	129
	2.3.2.1. Medida de la densidad óptica en estriado anterior	129
	2.3.2.2. Medida de la densidad óptica en estriado porterior	133
	2.4. Correlaciones del estado motor-histología	136
3.	RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA DENERVACIÓN SIMPÁTICA DEL CORAZÓN I	DE
	LOS MONOS PARKINSONIANOS	142
	3.1 Efectos de los monos tratados con MPTP y levodopa sobre la expresión de HSP-27 tota	1 v
	fosforilada en el corazón de los monos	1/2
	2.2. Efectes cohre la correction de la TIL total y la TIL fectorilade en el correction de mai	142
	5.2. Electos sobre la expresión de la TH total y la TH losionada en el corazón de mor	142
	tratados con MPTP y levodopa	143
	3.3. Activación de la COMT después del tratamiento crónico con MPTP y levodopa en amb	DOS
	ventrículos cardíacos	145
	3.3.1. Análisis mediante HPLC del efecto de la administración de MPTP y MPTP junt	o a
	levodopa sobre el turnover del metabolismo noradrenérgico	146
DIS	SCUSION	149
1	DECLIMEN DE LOS DECLI TADOS OPTENIDOS	151
1.	RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	151
2.	DISCUSION DE LOS METODOS	154
	2.1. Validez del modelo de la 6-OHDA en las ratas	154
	2.2. Test comportamentales en las ratas: EBST	156
	2.3. Protocolo de intoxicación con MPTP y evaluación motora de los monos	156
	2.3.1. Protocolos y susceptibilidad individual	157
	2.3.2. Evaluación del parkinsonismo	159
	2.3.3. Distonías	159
	2.4. Protocolo de administración de la levodopa y evaluación de las discinesias	160
	2.4.1. Escalas de análisis de las discinesias	161
3.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	162
	3.1. Tests comportamentales en las ratas	162
	3.1.1. Evaluación del comportamiento rotatorio	162
	3.1.2. Elevated Body Swing Test	162
	3.2 Test comportamentales en los primates no humanos	163
	3.2.1 Datos de la escala de discanacidad motora	163
	3.2.2. Escala de las discinacias en los monos	105
	 3.2.2. Escala de las discinestas en los monos	105
	2.2.1.7 Nitraindaral came assurant star	100
		108
	3.4. Efectos de la administración de /-NI sobre las discinesias inducidas por levodopa	169
	3.4.1. Tipos de discinesias tras la administración con 7-NI	170
	3.4.2. Mecanismos de acción estriatal del 7-NI	170
	3.5. Estudio de la progresión del déficit motor	172
	3.5.1. Recuento celular en el mesencéfalo	172
	3.5.1.1. Ratas	172
	3.5.1.2. Primates no humanos	173
	3.5.2. Inervación dopaminérgica estriatal	176
	3.5.2.1. Ratas	176
	3.5.2.2. Primates no humanos	177
	3.6. Estudio de alteraciones cardíacas en los monos parkinsonianos y tratados con levodopa	179
	3.6.1. HSP-27	181
	3.6.2. TH total y TH fosforilada en SER-40	181
	3.6.3. La COMP	183
	3.6.4. NA. NMN v sus ratios por cromatografía líquida	183
4	RESUMEN Y PERSPECTIVAS	184
••		10 /

CONCLUSIONES	187
EUROPEAN MENTION	191
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	251

ABREVIATURAS

¹²³I-IMBG: ¹²³I-metaiodobenzilguanidina 3-OMD: 3-O-metildopa 5-HT: Serotonina 6-OHDA: 6-hidroxidopamina 7-NI: 7-Nitroindazol AChE: Acetilcolina AMPA: α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico AMPc: Adenosin monofosfato cíclico BCA: Acido bicinconínico **BDNF**: Factor neurotrófico derivado del cerebro **BSA**: Suero de albúmina bovino CaMK: Proteína quinasa dependiente de Ca²⁺/Calmodulina CL: Cuerpos de Lewy CO: Monóxido de carbono **COMT**: Catecol-O-metiltransferasa CPu: Caudado putamen **DA**: Dopamina DAB: 3,3'-diaminobenzidina DARPP-32: Fosfoproteína de 32 kDa regulada por dopamina y AMPc DAT: Trasportador de dopamina DCAA: Inhibidor de la decarboxilasa periférica **EBST**: Elevated body swing test EDTA: Ácido etilendiaminotetracético EP: Enfermedad de Parkinson **GABA**: Ácido γ-aminobutírico GAPDH: Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa **GB**: Ganglios basales GC: Guanilato Ciclasa GDNF: Factor neurotrófico derivado de la glía GMPc: Guanosin monofosfato cíclico GPe: Globo pálido externo GPi: Globo pálido interno **GSNO**: Nitrosoglutation HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia HVA: Acido Homovalínico L-ADMA: N@-N@-dimetil-L-arginina asimétrica L-DOPA: L-3,4 dihidroxifenilalanina L-NAME: N@-nitro-arginina metil ester L-NIO: N-iminoetil-L-ornitina L-NMMA: Nω-monometil-L-arginina L-NOARG: L-NG-nitro arginina LID: Discinesias inducidas por levodopa LTP: Potenciación a largo plazo MAO-B: Monoamino Oxidasa B MPDP: 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridina **MPP**⁺: ion 1-metil-4-fenil-piridina MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina MSNs: Neuronas espinosas de tamaño medio NA: Noradrenalina NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: Óxido Nítrico NOS: Óxido Nítrico sintasa NOSe: Óxido Nítrico sintasa endotelial NOSn: Óxido Nítrico sintasa neuronal NOSi: Óxido Nítrico sintasa inducible NPS: Nitroprusiato de sodio NPY: Neuropéptido Y NST: Núcleo Subtalámico O₂•-: Radical superóxido OH•: Radical hidroxilo **ONOO-**: Peroxinitrito P-DARPP-32: DARPP-32 fosforilada PARP: Poli-ADP-ribosa polimerasa PB: Tampón fosfato PBS: Tampón fosfato salino **PDE**: Fosfodiesterasa PFA: Paraformaldehido PKA: Proteína quinasa A PKC: Proteína quinasa C PKG: Proteína quinasa G PP-I: Proteína fosfatasa 1 **PVDF**: Fluoruro de polivinilideno SN: Sustancia Negra SNpc: Sustancia Negra pars compacta SNA: sistema nervioso autónomo **SNC:** Sistema Nervioso Central **SOM**: Somatostatina VMAT-2: Trasportador vesicular de monoaminas tipo 2 VTA: Área Tegmental Ventral

INTRODUCCIÓN

El aumento de la esperanza de la vida media experimentado en el mundo occidental desde la segunda mitad del siglo pasado ha puesto en evidencia la existencia de una serie de enfermedades "asociadas al envejecimiento" cuya incidencia es cada vez más frecuente. Son las llamadas enfermedades degenerativas, en las que un proceso patológico, de etiología diversa y combinada a veces poco conocida, provoca la pérdida progresiva de ciertas funciones vitales para el paciente haciendo disminuir drásticamente su calidad de vida. El tratamiento actual de estas patologías se limita a paliar los síntomas. Es, por tanto, de vital importancia dedicar esfuerzo y medios necesarios para investigar cuales son las causas primarias que originan estas alteraciones. Dentro de las enfermedades degenerativas están las neurodegenerativas que afectan al sistema nervioso central (SNC), siendo de las más frecuentes la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (EP).

1. LA ENFERMEDAD DE PARKINSON (EP)

Antes de presentar una revisión bibliográfica del papel del óxido nítrico en la evolución del parkinsonismo y en las discinesias inducidas por levodopa nos parece interesante detenernos en realizar una breve descripción histórica de la evolución de la EP. Así, haremos referencia a los primeros escritos sobre esta enfermedad y a los cambios hasta nuestros días. Nos parece también importante, conocer a James Parkinson, médico que escribió sobre la "parálisis agitante" y a Jean-Martín Charcot que dio el nombre a la enfermedad e hizo la descripción nosológica y abrió un camino para la investigación sobre esta enfermedad.

1.1. PRIMERA RESEÑA HISTÓRICA

Antes de que James Parkinson la definiera cómo tal, desde antiguo existían varias referencias relacionadas con síntomas referentes a la **parálisis agitante**. Así, se encuentra una de las primeras referencias en el antiguo sistema médico de la India llamado **Ayurveda**, dónde se describe un probable antecedente de la parálisis agitante. **Ayurveda** (Ayu = *vida*, veda = *ciencia*) es reconocido como el sistema médico más antiguo del mundo. El tratado más importante de esta escuela de medicina es el **Caraka Samhita** (1.000 años antes de Cristo) donde se indica que los signos y síntomas del **Kampavata** incluyen: falta de propensión al movimiento (probable acinesia), salivación, tendencia a la soledad (posiblemente debido a la depresión), somnolencia constante y mirada fija.

A pesar de las referencias previas, no es hasta el s. XIX cuando James Parkinson denomina la enfermedad "Parálisis Agitante" y utiliza el sinónimo en latín "*paralysis agitans*" que fue posteriormente adoptado por el Dr. Marshall Hall en 1841 en el lenguaje médico. James Parkinson cita a Galeno como la referencia más antigua (Tyler, 1992; Stern, 1989). Galeno había establecido la distinción de temblores: el τρεμο**ş** (*tremor*) o temblor paralítico y παλμο**ş** (*palpitación*) el temblor clónico-espasmódico y compulsivo (Swieten, complementaria, TII pag.167-Paris 1771, en Charcot, 1982).

Aunque James Parkinson menciona estas descripciones previas, es sólo a partir de su publicación cuando la enfermedad comienza a ser reconocida ampliamente por los médicos, no sólo en Inglaterra sino también en otros países. Según Charcot, la parálisis agitante descrita en 1817 por James Parkinson en su "Essay on the Shaking Palsy", fue citada en Inglaterra y Alemania, pero casi ignorada en Francia. La primera mención en Francia, la realizó M.G. Sèe en su memoria sobre la corea, dónde figura entre las enfermedades que se pueden confundir con el baile de San Vito (Charcot, 1882).

1.2. EPIDEMIOLOGÍA

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después de la Enfermedad de Alzheimer. En la actualidad, la incidencia se sitúa entre 16-19/100.000 habitantes por año. En la mayoría de los estudios, el pico de incidencia se establece entre los 70-79 años y la media de edad de inicio de los síntomas entre 60-65 años (Twelves y cols., 2003). La prevalencia ajustada por edad se incrementa sustancialmente con la misma, pasando de 60/100.000 habitantes en el rango de 65 a 69 años, a 350/100.000 habitantes entre los 85 y los 89 años (Muangpaisan y cols., 2011). Se estima que a partir de los 70 años, el riesgo de padecer la enfermedad es de aproximadamente 2% para los varones y 1,3% para las mujeres. El predominio de varones afectos ha sido reproducido en diferentes estudios, pero no se conoce la causa de este hecho (de Lau y cols., 2004; Benito-León y cols., 2004). Respecto a los factores involucrados en la variabilidad geográfica, son igualmente desconocidos, aunque la influencia ambiental es una explicación sugerida, siendo las cifras de prevalencia más bajas para China, Japón y África (Muangpaisan y cols., 2009; McInerney-Leo y cols., 2004) pero quizás es porque no se ha estudiado lo suficiente.

En Europa, la prevalencia es similar (von Campenhausen y cols., 2005). De igual manera, el sustrato genético podría intervenir de forma concomitante, tal y como se observa en estudios de prevalencia de la enfermedad en la población norteamericana según etnias, siendo superior en hispanos y afroamericanos que en norteamericanos (Van Den Eeden y cols., 2003).

1.3. CARACTERÍSTICAS NEUROPATOLÓGICAS

Los hallazgos neuropatológicos característicos de la EP son la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la *pars compacta* de la *substantia nigra* y la formación de inclusiones fibrilares citoplasmáticas llamadas cuerpos de Lewy (CL). Los CL también se encuentran en otras localizaciones tales como el *nucleus basalis* de Meynert, el núcleo dorsal motor del vago, en el hipotálamo y en el *locus coeruleus* (Alvord y cols., 1974; Duffy y Tennyson, 1965; Forno y Norville, 1981; Jellinger, 1987). Con técnicas de inmunohistoquímica empleando anticuerpos monoclonales contra α -sinucleína se ha podido demostrar la presencia de esta proteína en ellos (Spillantini y cols., 1997; Spillantini y cols., 1998; Wakabayashi y cols., 1997). Es llamativa la presencia de estos hallazgos descritos en autopsias realizadas a individuos ancianos no afectos de la EP: aproximadamente el 1% de los individuos de 60-70 años y entre el 6-10% de los mayores de 80 años los presentan. Su significado en la práctica clínica podría orientar a formas subclínicas de la enfermedad (Ferrer y cols., 2011; Jellinger, 2006) ya que para que aparezca sintomatología clínica es necesario que se pierda al menos un 80% de las neuronas dopaminérgicas (Bossers y cols., 2009).

Las formas idiopáticas de la EP constituyen aproximadamente el 85% del total de casos. Su curso es insidioso, generalmente unilateral y se inicia en la mayoría de los casos en la edad tardía de la vida. Su diagnóstico es clínico excluyendo otras entidades que pueden cursar clínicamente de forma muy similar (demencia por cuerpos de Lewy, parkinsonismo vascular, parkinsonismo inducido por drogas, parálisis supranuclear progresiva, atrofia multisistémica, degeneración córticobasal, etc.) (Lees y cols., 2009).

1.4. ORGANIZACIÓN ANATÓMICA DE LOS GANGLIOS BASALES

La sustancia negra (SN), el neoestriado (núcleos caudado, putamen y accumbens), globo pálido externo (GPe), globo pálido interno (GPi), asi como el núcleo subtálamico (STN), son núcleos grises profundos del encéfalo, cuyo conjunto recibe la denominación de ganglios basales (GB) (Fenelon y cols. 1990; Parent y cols., 2001) (Figura 1). El término no es exacto anatómicamente, pues otras estructuras subcorticales (por ejemplo, la amígdala) también son ganglios basales. Se trata actualmente de una definición operativa, que ha cambiado con el tiempo, y que en las últimas décadas se ha aplicado esencialmente a los núcleos y circuitos subcorticales implicados en el control motor (DeLong y Weichmann, 2010).



Figura 1. Corte coronal de cerebro humano que muestra los ganglios basales y algunas estructuras relacionadas como la capsula interna, núcleo rojo o el pedúnculo cerebral. Extraído del Atlas de neuroanatomía de Frank Netter.

1.4.1. Citoarquitectura de la Sustancia Negra.

La SN se divide en dos sectores: uno dorsal, la *pars compacta*, y el otro ventral, la *pars reticulata*. La zona compacta esta constituida por células poligonales de tamaño grande mediano. Las neuronas de la pars compacta utilizan dopamina (DA) como neurotransmisor y aportan la mayor parte de la DA a los ganglios basales. La pars reticulata está formada por neuronas grandes y medianas separadas por fibras que le dan el aspecto reticular. Estas neuronas se caracterizan por ser GABAérgicas.

1.4.2. Citoarquitectura del neostriado.

Las células del estriado pueden ser clasificadas en neuronas con espinas y neuronas sin espinas. Las neuronas con espinas son las más numerosas, y pueden ser de dos tipos: las espinosas tipo I o neuronas espinosas de tamaño medio (MSNs), GABAérgicas y de proyección, que suponen alrededor del 96% de la población total de neuronas del estriado (Kemp y Powell, 1971; Girault, 2012), y las espinosas tipo II, colinérgicas e intrínsecas, que representan solo al 1% (DiFiglia y cols., 1976; Dray, 1979). El 3% restante esta representado por las células sin espinas, interneuronas intrínsecas, que pueden ser de tres tipos I, II y III. Las aferencias del neoestriado proceden principalmente de 3 sectores del SNC: de la corteza cerebral a través de las fibras cortico-estriadas (glutamatérgicas), del tálamo a través de las fibras tálamo-estriadas (glutamatérgicas), y de la SN por las fibras nigro-estriadas (dopaminérgicas). Además, recibe fibras provenientes de otros sectores del tronco del encéfalo (Carpenter, 1976a; Carpenter, 1976b; Herrero y cols., 2002). La vía nigro-estriatal es la más afectada en la EP y por tanto va a ser objeto de una descripción mas exhaustiva. Los sectores caudales de la SNpc proyectan principalmente hacia el putamen: el sector

caudo-lateral lo hace hacia las regiones dorsales del putamen, y el sector caudo-medial hacia la zona ventral del putamen (Carpenter y Peter, 1972; Tepper y cols., 2007). Las regiones rostrales de la SNpc envían fibras a la cabeza del caudado. La mayoría de estas fibras culminan en las espinas dendríticas de las neuronas espinosas de neoestriado y emplean DA como neurotransmisor (Dray, 1979; Moore y Bloom, 1978; Ungerstedt, 1971; Bolam y cols., 2000). En el estriado y las aferencias glutamatérgicas contienen 2 territorios diferenciados en su actividad de acetilcolinesterasa (AChE): los estriosomas y la matriz (Graybiel y Ragsdale, 1978). Los estriosomas son pobres en AChE y reciben aferencias desde la corteza prefrontal y límbica, mientras que la matriz es rica en AChE y recibe aferencias sensorimotoras desde la corteza frontal, parietal y occipital. Estas estructuras son una pieza clave en el procesamiento de la información dentro de los ganglios basales tanto de tipo motor, asociativo y emocional (Parent y Hazrati, 1995). Además de la patología y la afectación de los sistemas dopaminérgico y noradrenérgico, existen evidencias de la alteración del sistema serotoninérgico en la EP (Di Matteo y cols., 2008), habiéndose descrito degeneración del núcleo dorsal del rafe (Halliday y cols., 1990) y disminución de los niveles corticales de serotonina (5-HT) (Scatton y cols., 1983). Mounayar y colegas han descrito en monos parkinsonizados un aumento de fibras dopaminérgicas y serotoninérgicas en las zonas motoras, sensitivas y asociativas del estriado y de las fibras dopaminérgicas en el GPi (Mounayar y cols., 2007). Aunque el número de neuronas serotoninérgicas en los monos parkinsonianos no varía, el número de fibras serotoninérgicas que inervan el estriado esta aumentado de forma proporcional al grado de depleción dopaminérgica (Gaspar y cols., 1993; Rozas y cols., 1997; Mounayar y cols., 2007) así como su concentración medida por microdiálisis (Boulet y cols., 2008). En el modelo de rata con 6-OHDA, sin embargo, existen resultados contradictorios respecto a la 5-HT, habiéndose descrito tanto un aumento como una disminución de la inervación serotoninérgica estriatal (Takeuchi y cols., 1991; Zhou y cols., 1991).

1.5. CLÍNICA Y DIAGNOSTICO DE LA EP

Actualmente, existen varios criterios clínicos para el diagnóstico de la EP idiopática, aunque el diagnóstico definitivo sólo podrá hacerse con la histopatología. Los criterios diagnósticos más difundidos y aceptados son los United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank (Lees y cols., 2009) y sin embargo, empleando estos criterios solo se alcanza una exactitud diagnóstica comparativamente con la autopsia en un 75% de los casos. Para el diagnóstico de la EP se requiere que presenten bradicinesia y al menos uno de los otros tres síntomas cardinales (rigidez, temblor en reposo, inestabilidad postural), ninguno de los 11 criterios de exclusión (como la ingesta de neurolépticos que podrían producir el síndrome parkinsoniano), y tres de las siete características de apoyo (como las relacionadas con el comienzo asimétrico y la respuesta a la levodopa).

Diagnóstico clínico de la Enfermedad de Parkinson (Hughes y cols., 1992) (Criterios diagnósticos del banco de cerebros de la sociedad de Parkinson en U.K)

1. Diagnóstico del signo Parkinsoniano

- a) Bradicinesia (lentitud para iniciar el movimiento voluntario, con reducción progresiva de velocidad y amplitud de actividades repetitivas)
- b) Al menos una de las siguientes manifestaciones:
 - i. Rigidez muscular
 - ii. Temblor de reposo
 - iii. Inestabilidad postural no causada por disfunción primaria visual, vestibular o cerebelosa.

2. Criterios de exclusión para la enfermedad de Parkinson

- Parkinsonismo debido a causas identificables, como: ACV, encefalitis, exposición a drogas, hidrocefalia o tumores
- ii. Crisis oculogiras
- iii. Remisiones sostenidas
- iv. Parálisis supranuclear de la mirada
- v. Signos cerebelosos
- vi. Insuficiencia autonómica grave
- vii. Demencia grave inicial

3. Criterios de apoyo para la enfermedad de Parkinson (Se requieren 3 o más criterios

para la EP definida)

- i. Inicio unilateral
- ii. Temblor de reposo
- iii. Signos y síntomas progresivos
- iv. Afección asimétrica persistente en el comienzo
- v. Reacción inicial excelente a la levodopa, por más de 5 años
- vi. Discinesia inducida por levodopa
- vii. Evolución clínica mayor de 10 años

Dentro de la clínica de la EP existen cuatro signos motores típicos:

1. Bradicinesia: Se define como la lentitud tanto en la iniciación como en la ejecución del movimiento, cuyo grado extremo es la acinesia. Se encuentra entre el 77 y el 98% de los pacientes (Martin y cols., 1973; Selby, 1984; Louis y cols., 1997). La bradicinesia es el síntoma más discapacitante. Clínicamente se manifiesta por una pobreza en todo tipo de movimientos, pérdida de movimientos automáticos, retraso en su inicio a la orden y reducción de la amplitud de los movimientos voluntarios.

Al principio se manifiesta como dificultad a la hora de realizar tareas motoras finas, como abrocharse los botones, escribir, etc. Puede explorarse pidiendo al paciente que realice actos como levantarse, sentarse, caminar, dar giros, observando el golpeteo con los dedos, la pronosupinación alternada del antebrazo, el taconeo del pie y el cierre y apertura del puño. Estas alteraciones pueden desaparecer bruscamente durante las cinesias paradójicas.

2. Rigidez: Consiste en un aumento del tono de las extremidades y axial de la columna vertebral, del cuello y de la región cervical. La hipertonía puede ser continua (en tubo de plomo) o interferida por el temblor (en rueda dentada). La frecuencia varía entre el 89 y 99% de los enfermos (Hohen y Yahar, 1967; Martin y cols., 1973; Selby, 1984).

3. Temblor: El temblor característico se observa en reposo y suele comenzar por una mano. La forma más característica es la que afecta al dedo pulgar "en cuenta de monedas" con una frecuencia de tres a seis por segundo. Sin embargo la relajación completa reduce el temblor y los movimientos voluntarios suelen detenerlo. La padecen entre un 79 y un 90% de los pacientes (Hohen y Yahar, 1967; Martin y cols., 1973; Selby, 1984).

4. Inestabilidad postural: Estos pacientes pierden a menudo el equilibrio, y al andar hacia delante o hacia atrás deben ajustar el centro de gravedad del cuerpo con objeto de evitar caerse (Temlett y Thompson, 2006; Wood y cols., 2002; Bloem y cols., 2001) esto es lo que se denomina la marcha festinante. Además, sus reacciones de pérdida de equilibrio y enderezamiento son deficientes. Aunque es uno de los signos cardinales, en la escala de Hoehn y Yahr no aparece hasta el estadio III (Hoehn y Yahr, 1967). Horak y colegas encontraron que los pacientes con EP presentan poco balanceo, tienen alteradas las respuestas posturales debido a un exceso de los músculos antagonistas y son poco flexibles en adaptarse a cambios de la base de sustentación (Horak y cols., 1992). En trabajos más recientes también se ha observado que tienen disminuida la tronco, así como del tobillo, y que las caídas se producen más rotación del frecuentemente hacia adelante (Carpenter y cols., 2004). Además, existe una importante reducción de fuerza muscular en la columna, cadera y tobillo, junto con una deficiente utilización de la información visual y propioceptiva, así como disminución de la base de sustentación, que contribuyen fundamentalmente en la inestabilidad postural (Nallegowda y cols., 2004). También existe una deficiente respuesta en la información vestibular (Bronte-Stewart y cols., 2002).

En la EP, los síntomas comienzan de forma unilateral en un 72 y 75% de los enfermos (Hohen y Yahr, 1967; Hughes y cols., 1993; Colosimo y cols., 1995). La respuesta clínica a la levodopa, que describiremos en el siguiente apartado, es muy constante y se observa entre un 94 y 100% de los pacientes (Selby, 1984; Hughes y cols., 1993; Colosimo y cols., 1995; Raiput y cols., 1990), de hecho una mala respuesta nos haría considerar un parkinsonismo atípico (Lees y cols., 2009). Existen también otros síntomas motores, como son la micrografía, el fenómeno de "congelación" al caminar y la pobreza gesticular. Otros síntomas clínicos no motores son la depresión

(Lemke, 2008; Bernal-Pacheco y cols., 2012), las alucinaciones asociadas a los pacientes que reciben agentes dopaminérgicos (Cummings, 1992; Kuzuhara, 2001; Poewe 2008), la disfunción autonómica (Micieli y cols., 2003; Dubow, 2007), la demencia (aunque las alteraciones cognitivas aparecen más tarde y son menos prominentes que los síntomas motores) (Robottom y Weiner, 2009; Docherty y Burn, 2010) y las alteraciones en los sistemas de sacadas y seguimiento oculomotor (Corin y cols., 1995; Vidailhet y cols., 1994).

1.6. TRATAMIENTO DE LA EP

El tratamiento de la EP se divide actualmente en médico y quirúrgico:

 A) Tratamiento Médico (Farmacológico). El tratamiento es sintomático, con objeto de mejorar la capacidad funcional (lentitud en tareas motoras, dificultad para la marcha...)
 del paciente con EP (Nutt y Wooten, 2005). Los principales fármacos son:

Levodopa: La 3-4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA) es un precursor de la dopamina, y está considerado el tratamiento para la EP. Se produce una mejoría entre el 40 y el 50% en las actividades motoras de la vida diaria (Rascol y cols., 2000; Holloway y cols., 2004). Se administra de manera combinada con un inhibidor periférico de la descarboxilación de la levodopa (DCAA) con el objeto de que llegue al cerebro en mayores concentraciones; un ejemplo es la carbidopa (Sage y Mark, 1994). Existen múltiples causas de fallo en la respuesta a la levodopa, como la interacción con otros fármacos o con la alimentación, dosis inadecuadas o duraciones incorrectas. La mala respuesta al tratamiento inicial con levodopa ocurre en menos del 10% de los pacientes con EP idiopática y debe dirigir el diagnóstico hacia otras patologías (Clarke y Davien, 2000).

- Inhibidores de la catecolamina-o-metiltransferasa (COMT): La combinación de levodopa y carbidopa anteriormente mencionada, puede también asociarse a un inhibidor de la COMT, como son la entacapona y la tolcapona. Éstos van a realizar una inhibición reversible de la COMT (la o-metilación de levodopa a 3-OMD) que va a aumentar la vida media de la levodopa. Cuando los inhibidores de la COMT se administran conjuntamente con levodopa y un inhibidor de la DCAA (carbidopa, benserazida), incrementan la vida media y biodisponibilidad de levodopa, sin afectar a sus concentraciones máximas. Ventajas de los inhibidores de la COMT: pueden aumentar el tiempo 'on' y reducir el tiempo 'off' en pacientes fluctuantes con una disminución de las dosis totales diarias y/o del número de tomas de levodopa, son de fácil titulación, y aumentan la biodisponibilidad de levodopa en el cerebro. Inconvenientes de los inhibidores de la COMT: por su potenciación de la levodopa producen efectos secundarios dopaminérgicos, en especial aumento de las discinesias. La tolcapona produce una diarrea intolerable en un 5-6 % de los pacientes, y se ha relacionado con la producción de hepatitis fulminante. No se han comunicado casos de toxicidad hepática por la entacapona en los estudios pre y postcomercialización.
- Agonistas dopaminérgicos: Aunque son ligeramente menos efectivos que la levodopa, tienen la ventaja de presentar en los primeros años de tratamiento un menor índice de discinesias y fluctuaciones motoras (Rascol y cols., 2000; Holloway y cols., 2004). Sin embargo, con el paso de los años, la levodopa se hace necesaria para el control de los síntomas. Estos fármacos se evitan en pacientes con demencia previa porque favorecen las alucinaciones (Nutt y Wooten, 2005). Otros efectos secundarios de alguno de estos fármacos, como

los derivados de la ergotamina, son el engrosamiento y fallo de las válvulas cardíacas (Van Camp y cols., 2004) por lo que se han eliminado del tratamiento a nivel mundial.

Neuroprotectores (Rasagilina-Selegilina): Existe algún ensayo que sugiere que los inhibidores de la Mono Amino Oxidasa B (MAO-B) enlentecen la progresión de la enfermedad (Heinonen y Myllylä, 1998). Continúa en duda su eficacia en monoterapia en los pacientes con síntomas mínimos que no requieran tratamiento con levodopa (Nutt y Wooten 2005). La rasagilina es un inhibidor selectivo de la enzima MAO-B, sin los metabolitos anfetamínicos de la selegilina. El mecanismo neuroprotector parece ser múltiple y no solo mediado por la inhibición de la MAO-B. Hay evidencia de un efecto anti-apoptótico (Maruyama y cols., 2002). Rasagilina ya ha sido usada con seguridad en pacientes con EP y con efectos sintomáticos similares a la selegilina (Abassi y cols., 2004). Con respecto a esta última, aún existen dudas acerca de su potencial real como neuroprotector y efector sintomático (Landau, 2010). Según los autores, la evidencia actual justifica un estudio mayor que aclare definitivamente el rol neuroprotector de estos fármacos. En el estudio DATATOP (Shoulson, 1998) se demostró que la selegilina en estadios iniciales retrasaba el inicio del tratamiento con levodopa, lo que se interpretó como un posible efecto neuroprotector (retraso de la progresión de la enfermedad). Sin embargo, se ha criticado este trabajo por el efecto sintomático de la selegilina, lo que pudiera explicar estos hallazgos. Aunque actualmente es el fármaco con mas respaldo preclínico como posible agente neuroprotector, no hay evidencias clínicas concluyentes de este efecto.

Otros agentes farmacológicos: En general, los anticolinérgicos ya no se emplean para el tratamiento de la EP debido a la gran cantidad de efectos adversos que presentan (Ehrt y cols., 2010). Sin embargo, son muy útiles cuando no se controla el temblor (Marjama-Lyons y Koller, 2000). Están contraindicados en pacientes mayores de 70 años (Nutt y Wooten 2005) por sus efectos confusionales y de alteración de memoria. La amantadina, antagonista del NMDA, ha sido empleada con resultados favorables en el tratamiento de las discinesias inducidas por levodopa sin empeorar o aun mejorando levemente los síntomas parkinsoniano (Bido y cols., 2011; Sawada y cols., 2010).

B) Tratamiento Quirúrgico. En los pacientes con mal control motor y con discinesias incapacitantes o EP tremórica pese a la optimización del tratamiento, existe la posibilidad de la cirugía. También podría estar indicada como tratamiento sintomático siempre en pacientes menores de 70 años (Nutt y Wooten, 2005). Las técnicas iniciales fueron la ablación, primero de los núcleos ventrales anterior o lateral del tálamo (talamotomía) para el temblor o del globo pálido interno (palidotomía) (Kleiner-Fisman y cols., 2010). En la actualidad, se aplica la estimulación cerebral profunda, que consiste en colocación de electrodos de estimulación continua en el núcleo subtalámico o en el globo pálido interno; esta estimulación va a disminuir la función de estas áreas hiperactivas en la EP (Kluger y cols., 2009; Timmermann y Volkmann, 2010). Los síntomas que menos mejoran con este tipo de cirugía son el desequilibrio postural, la inestabilidad, la acinesia paroxística, los trastornos vesicales e intestinales, la distonía, el freezing y las dificultades del habla (Baron y cols., 2000). Para finalizar, debemos destacar el desarrollo de nuevas líneas de investigación relacionadas con el trasplante de neuronas dopaminérgicas a partir de células madre de ratas, o terapia génica en monos o humanos que no han dado resultados esperanzadores pero que son potenciales

tratamientos para la EP (Taylor y Minger, 2005; Cai y cols., 2010; Wakeman y cols., 2011).

2. MODELOS EXPERIMENTALES DE ENFERMEDAD DE PARKINSON

Los estudios en modelos experimentales han representado, y siguen haciéndolo, una herramienta esencial en el estudio de la etiopatogenia y fisiopatología de la EP. Los modelos clásicos se basan en la administración de agentes neurotóxicos, que reproducen, en mayor o menor medida, las características clínicas y neuropatológicas de la EP con referencia al sistema dopaminérgico. Las neurotoxinas mas utilizadas son la 2,4,5 trihidroxi fenil etamina ó 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en la rata y el 1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) en el ratón y en el mono. En los últimos años, se han desarrollado varios modelos transgénicos en el ratón basados en la existencia de mutaciones asociadas con EP familiar (Parkina, DJ1, α -sinucleína) (Harvey y cols., 2008), por falta o reducción en la expresión de receptores D2 (Schmitz y cols., 2002; Tinsley y cols., 2009), o el causado déficit en la expresión de factores neurotróficos como el factor derivado de la línea celular de la glía (GDNF) (Pascual y cols., 2008).

En general, ninguno de los modelos de parkinsonismo experimental reproduce íntegramente la EP, ya que la muerte neuronal no es lentamente progresiva, no se desarrollan CL, aunque si algunos agregados proteicos (Meredith y cols., 2004; Tinsley y cols., 2009), y no se afectan otros sistemas neuronales alterados en la EP idiopática (Braak y cols., 2004). Pero los modelos han servido para un mejor análisis de las alteraciones bioquímicas y moleculares y para ayudar en la comprensión de la patogenia de la EP (Orth y cols., 2004).

2.1. 6-HIDROXIDOPAMINA

Es el modelo más convencional y consiste en la lesión unilateral de la vía nigroestriada con 6-OHDA, que si bien es de uso *cuasi* universal, adolece de varias carencias importantes: 1) la lesión ocurre en 2-3 días; 2) el animal (habitualmente el modelo animal empleado es la rata) expresa espontáneamente escasos signos parkinsonianos; 3) la conducta rotatoria, en respuesta a fármacos dopaminérgicos, es el principal parámetro analizado como actividad motora anormal.

También se han descrito modelos con lesión bilateral de la vía nigra-estriada (Paille y cols., 2007; Pioli y cols., 2008), o con inyección intraventricular de 6-OHDA, con el objetivo de producir un cuadro acineto-rígido bilateral de instauración sub-aguda (Rodriguez Díaz y cols., 2001; Rodríguez y cols., 2001). Este último modelo se asocia con muerte neuronal más selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la región ventro-lateral de la SNpc, imitando mejor la lesión de la EP, pero también correlaciona con una mortalidad relativamente alta (Rodriguez Díaz y cols., 2001).

2.1.1. Parkinsonismo inducido por 6-OHDA

Fue descubierta como neurotoxina en 1968 por Thoenen y Tranzer. Ese mismo año se comprobó que administrada en el parénquima cerebral destruye las terminales noradrenérgicas y dopaminérgicas (Ungersted, 1968). Presenta afinidad por los transportadores de noradrenalina (NA) y DA y es así como penetra en estas células. Este sistema de transporte es sensible a cocaína y desipramina y, cuando no están presentes estos transportadores, se pierde su selectividad y puede ser tóxico para un gran número de tipos celulares. Por ejemplo, el mazindol (bloqueante del transporte de la DA) inhibe
la toxicidad sobre células dopaminérgicas (Pifl y cols., 1993). Las neuronas noradrenérgicas tienen más sitios de unión de baja afinidad a la 6-OHDA por lo que la neurotoxicidad es mayor que sobre las células dopaminérgicas (Szot y cols., 2012). Una vez que se encuentra en el interior de la célula, puede permanecer en el citoplasma o entrar en las vesículas transportadoras desplazando a la noradrenalina, por lo que inicialmente muestra un efecto simpaticomimético indirecto. La 6-OHDA presenta una toxicidad a dos niveles: i) toxicidad extracelular: inespecífica mediada por su reactividad espontánea con el oxígeno (autooxidación), formando agua oxigenada, radicales libres tipo hidroxilo y semiquinonas, y ii) toxicidad intracelular: que, además de la producción de estos metabolitos tóxicos, incluye a) la modificación mediante unión covalente a proteínas como la albúmina, b) la inactivación de enzimas, como la COMT (Baumbarten y Zimmermann, 1992) y c) la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial (Glinka y Youdim, 1995). El factor determinante de la toxicidad de la 6-OHDA es la capacidad de la célula de neutralizar los radicales libres y peróxidos, de esta manera el ácido ascórbico aumenta la sensibilidad a la 6-OHDA, mientras que la catalasa, la vitamina E, la N-Acetil cisteína y la desferrioxamina protegen de sus efectos tóxicos (Cadet y cols., 1991).

En cuanto a la vía de administración, la 6-OHDA administrada por vía sistémica destruye las terminales simpáticas adrenérgicas y, a dosis altas, los cuerpos neuronales, pero carece de acción tóxica sobre el sistema nervioso central (Jonsson 1970,1976; Grahmam 1978). Inyectada en la vía nigroestriatal de ratas produce una pérdida de neuronas dopaminérgicas nigrales, de sus terminales estriatales y de los niveles de DA, serotonina, encefalina y sustancia P estriatales. La degeneración neuronal afecta por igual tanto a las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (A9) que proyectan al estriado como a las del área tegmental ventral (A10) que forman parte del sistema mesolímbico

(Ungerstedt 1968, 1971). Algunos autores, por ello prefieren inyectarla en la SNpc, evitando de esa manera la afectación de neuronas del área A10. Otra vía de administración empleada de la 6-OHDA es la intraestriatal, con el fin de producir una degeneración retrógrada menos severa y más lenta y progresiva que asemeje más a la que ocurre en la EP (Przedborski y cols., 1995). La 6-OHDA administrada de forma selectiva en distintas zonas del estriado produce lesiones parciales que originan, no sólo comportamiento rotatorio mediado por fármacos, sino cambios espontáneos en función motora y sensitivo-motora, similares a los que aparecen en la EP (Walker y cols., 2010). La degeneración parece ser debida no al transporte axonal retrógrado de la neurotoxina sino a una degeneración antidrómica secundaria a la lesión de los terminales (Bjorklund y Lindvall, 1984).

La lesión unilateral por 6-OHDA por vía intraestriatal induce cambios neuroquímicos y neurofisiológicos compensatorios del déficit dopaminérgico y que tardan un tiempo en establecerse. Por ejemplo, se ha descrito una inducción y activación de tirosina hidroxilasa (enzima limitante de la síntesis de catecolaminas) en las neuronas dopaminérgicas funcionantes (Acheson y cols., 1980), un aumento de la DA liberada en el estriado, y un incremento en el número de receptores dopaminérgicos estriatales postsinápticos (up-regulation) (Creese y cols., 1977). Este fenómeno de hipersensibilidad por denervación afecta sobre todo a los receptores estriatales D2 (Creese, 1982).

2.2. PARKINSONISMO INDUCIDO POR LA TOXINA 1-METIL-4-FENIL-1,2,3,6-TETRAHIDROPIRIDINA (MPTP)

El modelo de parkinsonismo por MPTP, particularmente en el mono, ha dado lugar a importantes avances fisiopatológicos y al desarrollo moderno del tratamiento quirúrgico para la EP. En la actualidad, persiste como uno de los modelos más validos para estudios con orientación clínico-terapéutica. El MPTP es una meperidina sintética, análoga a un narcótico. Aunque se habían descrito sus efectos parkinsonizantes (Davis y cols., 1979), su importancia se puso de manifiesto cuando fue utilizado de forma involuntaria por jóvenes drogadictos que se lo inyectaron como heroína sintética y desarrollaron los signos y síntomas clínicos parkinsonianos (Lagston y cols., 1983) así como las alteraciones bioquímicas y neuropatológicas, con la excepción de los CL (Forno y cols., 1986). No obstante, se han descrito agregados de α -sinucleína en primates expuestos a la neurotoxina (Kowall y cols., 2000). El MPTP no es un tóxico dopaminérgico, pero al ser una molécula lipofílica, después de ser inyectado sistémicamente atraviesa la barrera hematoencefálica y es captado por astrocitos, en los que es metabolizado a 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridina (MPDP) por la acción de la monoaminooxidasa B (MAO-B) (Singer y cols., 1987) (Figura 2). El MPDP se oxida espontáneamente al ión 1-metil-4-fenil-piridina (MPP⁺), que es liberado al espacio extracelular. El MPP⁺ al ser una molécula polarizada, debe utilizar un sistema de transporte para entrar en las células. En este sentido, su afinidad por el transportador de dopamina (DAT) es aproximadamente diez veces mayor que la del propio neurotransmisor, lo que explica su selectividad por las neuronas dopaminérgicas (Javith y Snyder, 1984).

2.2.1. Mecanismo de acción del MPTP

En el citoplasma de las neuronas dopaminérgicas, el MPP⁺ se liga al transportador vesicular de monoaminas del tipo 2 (VMAT-2) (Del Zompo y cols., 1993) o permanece en el citosol e interactúa con enzimas citoplasmáticas produciendo radicales libres (Adams y Klaidman, 1993; Ramsay y Singer, 1986). Puede incorporarse a la neuromelanina (Sulzer y cols., 2000) o acumularse en el interior de las mitocondrias (Nicklas y cols., 1985), donde inhibe el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Si el MPP⁺ es secuestrado por VMAT-2 dentro de las vesículas sinápticas, se protege a la neurona de su efecto deletéreo al prevenir su interacción con las mitocondrias (Liu y cols., 1992; Reinhard y cols., 1987).



Figura 2. Mecanismo de acción del 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). El MPTP atraviesa la barrera hematoencefálica y es captado por astrocitos y metabolizado por la monoaminooxidasa-B (MAO-B) al ión 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP⁺). Este penetra en la célula a través del trasportador de dopamina (DAT) y, una vez en el citoplasma, entra en las vesículas a través del trasportador vesicular de monoaminas tipo 2 (VMAT-2) o se incorpora a las mitocondrias inhibiendo el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. (Vila y Przedborsky, 2003).

La mayor concentración de VMAT-2 en las neuronas dopaminérgica del área tegmental ventral (VTA), comparadas con las de la SNpc, podría explicar, en parte la menor vulnerabilidad de las neuronas del VTA al efecto del tóxico (Nirenberg y cols., 1996).

2.2.2. Modelo MPTP en el primate no humano

Las rutas y pautas de administración en el mono han sido muy diversas y han dado lugar a mecanismos y grados de muerte neuronal diferentes (Schober, 2004). A pesar de que este modelo reproduce la mayoría de los aspectos morfológicos, bioquímicos y sintomáticos típicos de la EP, tiene una serie de limitaciones:

- i) La limitación es que la gravedad de los síntomas es muy variable en monos, incluso usando el mismo protocolo y dosis de MPTP (Elsworth y cols., 2000).
- ii) La dificultad que existe, hasta el momento, de medir la depleción dopaminérgica, a pesar de que las nuevas técnicas de estudio "in vivo" puedan solventarla. Existe una correlación de pérdida dopaminérgica y sintomatología, esto en el pasado fue una limitación pero actualmente existen distintas pautas de administración de varios protocolos, inyectando numerosas dosis pequeñas y repetidas durante un largo periodo de tiempo como se ha realizado en esta tesis (Halliday y cols., 2009; Ding y cols., 2008; Barcia y cols., 2004; Hantraye y cols., 1993; Schneider y Kovelowsky, 1990), o intentado replicar estadios iniciales de la EP (Ding y cols., 2008).

A pesar de que esta aproximación logra la aparición de los síntomas progresivamente, implica un periodo de tiempo extremadamente largo (21 meses). Otros autores han utilizado un protocolo diferente, mucho más corto, agudo, inyectando diariamente 0,2 mg/Kg durante 21 días, correlacionando la aparición de los síntomas con la perdida neuronal y la perdida de DAT (Bezard y cols., 2001a; Bezard y cols., 2000; Meissner y cols., 2003).

Otro de los principales problemas de todos estos modelos experimentales es la dificultad, hasta ahora, de medir el grado de lesión o depleción dopaminérgica que se está causando. En este sentido, la posibilidad reciente de estudiar animales "in vivo" con marcadores dopaminérgicos mediante neuroimagen abre una nueva vía experimental (Jang y cols., 2012; Hostetler y cols., 2011).

3. LEVODOPA Y DISCINESIAS

3.1. BIOQUÍMICA DE LA LEVODOPA

La (3,4-dihidroxifenilalanina) DOPA fue sintetizada por vez primera en 1911 y obtenida en el laboratorio como una mezcla racémica por Funk en 1911 (Hornykiewicz, 2002). Aislada como L-DOPA ó "levodopa" en 1913, se consideró como una molécula biológicamente inactiva. Sin embargo, estudios de farmacocinética realizados años más tarde mostraron que la levodopa causaba hiperglucemia y disminución de la presión sanguínea. Tales hallazgos marcaron el inicio formal del estudio de su actividad biológica y su papel en la síntesis de catecolaminas. Con el descubrimiento de Holtz en 1938 (Hornykiewicz, 2002), la levodopa fue considerada para el tratamiento en la EP, ya que mostró que en el tejido hepático la levodopa era convertida a DA, por acción de la enzima que se denominó descarboxilasa de la levodopa por Blaschko, en 1939 (Hornykiewicz, 2002). En 1961, la levodopa fue incorporada al tratamiento farmacológico de la EP y se observó un efecto benéfico en los síntomas de rigidez observados en esta enfermedad (Barbeu y cols., 1961). Desde su introducción a la

terapéutica, la levodopa, ha sido todo un reto para la farmacología moderna ya que su respuesta terapéutica es verdaderamente impactante. Una vez establecido el plan de tratamiento, la mejoría clínica es notoria, lo cual devuelve al paciente a unas condiciones semejantes de vida que previamente tenía una vez que la enfermedad comenzó a minar su salud. Incluso, algunos autores sugieren el uso de la levodopa con fines diagnósticos en diferentes formas de Parkinsonismo. Sin embargo, el efecto que con aparente magia produce, tarde o temprano comienza a desaparecer y progresivamente los síntomas de la enfermedad retornan e incluso empeoran junto con la aparición de los efectos colaterales (Bezard y cols., 2001b). Esta situación plantea nuevos retos en el tratamiento de la EP.

Al margen del desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas basadas en el entendimiento de la etiopatogenia y fisiopatología de la EP y de los ganglios basales (núcleos de afección por la enfermedad), la levodopa es, en sí misma, un paradigma para la investigación. Del adecuado entendimiento de los mecanismos que subyacen tanto a sus efectos terapéuticos, como a sus efectos colaterales y tóxicos, dependerá un mejor diseño de los nuevos fármacos para el tratamiento farmacológico de la EP.

3.2. TERAPIA CON LEVODOPA EN LA EP

La levodopa es el fármaco más eficaz para el control de la EP: mejora sobre todo la lentitud de los movimientos y la rigidez, pero en menor medida el temblor y las alteraciones posturales (Hornykiewicz, 2010). Con el paso de los años, la levodopa deja de ser eficaz y se produce lo que conocemos como con el nombre de "fluctuaciones", es decir, la respuesta al medicamento ya no es tan duradera produciéndose bloqueos, situación en la que el paciente apenas puede moverse. Con frecuencia añadido a este problema, se asocian movimientos involuntarios de los miembros, cabeza, cuello, y gestos indeseables en la cara, etc., que se les denomina discinesias (Castro, 1998). A los enfermos que se les diagnostica EP por primera vez y que no han sido tratados anteriormente, el tratamiento con levodopa únicamente o co-administrada con un inhibidor de la dopa descarboxilasa, se ha visto que mejora la calidad de vida de los pacientes (Onofrj y cols., 2004). El inicio del tratamiento con levodopa, va a estar condicionado a la limitación de la calidad de vida, por lo que debe retrasarse en la medida de lo posible. Si se decide retrasar la administración de levodopa, las alteraciones terapéuticas, se centran en el uso de agentes dopaminérgicos solos a asociados a levodopa. El tratamiento con levodopa no tiene por que iniciarse inmediatamente después del diagnóstico.

En general, la decisión sobre la elección del fármaco y el momento de instauración, dependen de las circunstancias sociales y ocupacionales del individuo, así como de sus síntomas particulares (Jahanshahi y Marsden, 1998). El tratamiento con levodopa es paliativo y sintomático y pretende conseguir el alivio de la sintomatología compensando la deficiencia de DA. El hecho de no administrar DA directamente, es porque esta ultima, no atraviesa la barrera hematoencefálica, por ello se utiliza levodopa que sí la atraviesa y se convierte en dopamina en el cerebro, gracias a la enzima, la Dopa-descarboxilasa. El mecanismo de conversión es lineal: cuanta mas levodopa se ingiera, más dopamina se producirá (Khlebtovsky y cols., 2012).

¿Por qué entonces no se toma más levodopa? La DA no solo se encuentra en el cerebro sino también en el intestino y en más órganos, pero la mayor parte de la levodopa se convierte en el intestino en DA por efecto de la dopa-descarboxilasa llegando al cerebro aproximadamente un 10%. Por ello, para evitar esta transformación de levodopa en DA en el intestino, se toma combinada con un inhibidor de la Dopa-

37

descarboxilasa, que no atraviesa la barrera hematoencefálica. De este modo, la cantidad que llega al cerebro, es 10 veces superior a la que llega sin el inhibidor. La dosis de levodopa administrada, también es inferior en la misma proporción. Cuando se introdujo la levodopa, se recetaba a la máxima dosis tolerada; hoy se receta a la mínima dosis capaz de controlar los síntomas. Esto es así, para evitar los efectos secundarios sistémicos (Poewe y cols., 1989).

3.3. EFECTOS SECUNDARIOS DE LA LEVODOPA

3.3.1. Efectos secundarios a corto y a medio plazo

<u>Náuseas y vómitos</u>. Estos se deben a la estimulación del centro del vómito en el tronco cerebral. Con tratamientos continuados, el centro del vómito se habitúa a la presencia de la DA y ya no responde a ella. Es recomendable tomar la levodopa 30-40 minutos antes de las comidas para que no interfiera con la digestión de las proteínas, o aumentar la dosis del inhibidor de la dopa-descarboxilasa (Baltag y cols., 2003).

- <u>Hipotensión postural</u>. La levodopa puede afectar al sistema nervioso simpático; ello puede provocar una caída de tensión en el momento de levantarse, que se traduce en mareos y desmayos. Este problema puede superarse, en parte, tomando pastillas de sal o levantándose lentamente de la silla o de la cama (Oka y cols., 2007).
- <u>Trastornos mentales</u>. Los más frecuentes son los síntomas psicóticos, que se presentan en forma de alucinaciones, confusiones o delirios. Afectan a un 20% de las personas que toman levodopa. Suele suceder en personas mayores asociado bien a un componente de envejecimiento o bien a un comienzo tardío de la enfermedad (Meincke y Kosinski, 2010).
- <u>Trastornos del sueño</u>. Es un efecto secundario bastante molesto. Estos trastornos suelen agravarse con el tiempo y se deben fundamentalmente al efecto alertizante de

la levodopa. Los trastornos de sueño pueden ser insomnio por lo cual se recomienda no tomar la levodopa después de la cena, o fragmentación del sueño en el que el paciente se despierta por la noche (Gómez-Esteban y cols., 2011).

<u>Cambios de color en la orina y el sudor</u>. Antes de eliminarse por el riñón, la levodopa se convierte en DA y en una serie de sustancias entre la que está la melanina. Cuando esta última llega a la orina y/o al sudor, les da un color rojizo (Devereaux y Mancall, 1974).

3.3.2. Efectos secundarios a largo plazo

- i) Reacciones adversas motoras y de comportamiento (Müller y Russ, 2006).
- ii) Pérdida de eficacia: tras tres o cinco años de tratamiento con levodopa, así como complicaciones de la propia medicación con una incidencia variable.
- iii) Complicaciones que afectan a un 90% de las personas tratadas con levodopa durante diez o más años, como discinesias y fluctuaciones.

Discinesias:

Son movimientos involuntarios que pueden darse tanto en el pico, como al final de la dosis y afectan a gran variedad de músculos, pueden ser corea, movimientos de contorsión y distonía, contracciones musculares y espasmos (Ellrichmann y cols., 2007).

Gran parte de pacientes con EP, presentan una mejoría de los síntomas de la enfermedad con la ingesta de levodopa. Con posterioridad, comienzan a aparecer oscilaciones de la movilidad, que pueden tener más o menos relación temporal con la ingesta de levodopa, así como con la propia progresión de la enfermedad. En estos pacientes los síntomas de la EP se alternan con periodos de movilidad prácticamente

normal o contaminadas con discinesias. Algo característicos en algunos pacientes, son los llamados fenómenos de "on-off" de la enfermedad. Son fluctuaciones del estado del paciente durante el día. Se considera que el paciente está en un período "on" cuando hay un control satisfactorio de los síntomas parkinsonianos y es posible una actividad motora normal. En cambio, las fases "off" se asocian con la reaparición de síntomas y con una función motora alterada. El objetivo del tratamiento actual es aumentar la fase "on" en el paciente.

Este fenómeno tiende a ocurrir tarde en el transcurso de la enfermedad tras varios años de tratamiento con levodopa. En muchas ocasiones, el enfermo pasa de manera brusca de una situación a otra. Se reconocen diferentes tipos de respuesta a la levodopa en los pacientes con EP, con fluctuaciones de la movilidad en función de la duración y su relación temporal con las dosis del fármaco (Obeso y cols., 1989; Marsden y cols., 1982).

Fluctuaciones

Pueden ser a) en la respuesta: pérdida de la eficacia al final de una dosis antes de tomar la siguiente y b) fluctuaciones en "on-off": episodios bruscos de pérdida de eficacia (Müller, 2011).

A) En la respuesta: de larga o de corta duración

A.1) Respuesta de larga duración: El beneficio clínico de una única dosis en algunos pacientes, puede mantenerse durante muchas horas, aún cuando los niveles plasmáticos del fármaco hayan desaparecido. Estas fluctuaciones casi no son evidentes y se ponen de manifiesto cuando se suprime temporalmente la levodopa, observándose que la mejoría clínica persiste de 3 a 10 días. Esto es debido al efecto superpuesto de varias

dosis diarias, los pacientes con esta respuesta parecen tener una función motora estable (Zappia y Nicoletti, 2010).

Por ello, los pacientes con este tipo de respuesta, pueden obtener una mejoría clínica con pequeñas dosis de levodopa administrada varias veces al día o con una dosis ligeramente superior, administrada una vez cada tres días (Quattrone y Zappia, 1993).

A.2) Respuesta de corta duración: Su primera manifestación clínica suele ser una acinesia por la mañana antes de la primera toma de levodopa. Este tipo de respuesta, suele aparecer después de varios años con el tratamiento de levodopa. Se reconocen dos tipos de respuesta de corta duración que correlacionan con las fluctuaciones on-off:

B.1.) <u>Fluctuaciones predecibles:</u> conocidas como deterioros de fin de dosis o "wearingoff". Son las más frecuentes y se manifiestan con oscilaciones de movilidad. Están relacionadas temporalmente con la dosis de levodopa, de tal manera que el paciente tiene tantos estadios de "on-off" como tabletas tomadas.

B.2) <u>Fluctuaciones impredecibles:</u> oscilaciones al azar, fenómenos "on-off". Son las más complejas e invalidantes. Estas oscilaciones ocurren muchas veces al día, y parece ser que no hay relación temporal con la administración de levodopa. Se caracterizan por rápidos e imprevisibles cambios en la movilidad, asociados a intensas discinesias (Stocchi y cols., 2010). Casi toda clasificación tiene carácter pedagógico. En cierto modo, esta clasificación es arbitraria y en ocasiones contradictoria, ya que el carácter predecible o no de las fluctuaciones depende en gran medida de cómo se administre la levodopa y cómo lo evalúe el paciente. Por ello, dicen que es posible observar pacientes con respuesta motora estable, que tienen fluctuaciones si se les monitoriza de cerca su situación motora a lo largo del día así como pacientes con fluctuaciones predecibles observándose ocasionalmente respuestas impredecibles en pacientes con oscilaciones al azar, que tienen muchos deterioros de fin de dosis (Nutt y Holdorf, 1996).

3.3.3. Discinesias

Debido a que es un aspecto clave en el estudio llevado a cabo en esta tesis, se ha decidido profundizar en él desarrollándolo en un subapartado propio. Las discinesias abarcan un amplio abanico de movimientos anormales incluyendo corea, balismo, distonía, mioclonías, movimientos rápidos similares a los tics o movimientos estereotipados más complejos (Marsden y cols., 1982; Luquin y cols., 1992). Las discinesias pueden afectar a diferentes regiones corporales, pero parece ser, que aparecen antes y son más intensas en la parte del cuerpo más afectada por la enfermedad y generalmente empeoran en situaciones de tensión emocional o durante actividades motoras voluntarias (Calabresi y cols., 2010). Existe una clasificación de discinesias muy difundida según el efecto antiparkinsoniano de la levodopa (Marsden y cols., 1982):

- <u>Discinesias coreicas o de "beneficio de dosis"</u>. Se les dio este nombre porque aparecen cuando la acción antiparkinsoniana de la levodopa es máxima, por lo que coincide con el mayor grado de mejoría clínica (situación "on") y habitualmente con las concentraciones plasmáticas más elevadas de levodopa (Tolosa y cols., 1975). Las discinesias de beneficio de dosis, afectan sobre todo a la región orofacial, cuello y extremidades, pero pueden dañar a cualquier grupo muscular. Con el transcurso del tiempo las discinesias se extienden durante todo el periodo de beneficio motor de cada dosis de levodopa sin cambios en su intensidad denominándose discinesias en "onda cuadrada" o en "meseta".
- <u>Discinesias bifásicas o distónicas</u>. Son bastante menos frecuentes y suelen afectar a enfermos jóvenes. Su característica principal es la aparición de movimientos involuntarios, prediciendo y siguiendo al efecto terapéutico de las dosis de

levodopa (Obeso y cols, 1989). La presentación bifásica no ocurre necesariamente en cada paciente, pudiendo aparecer tan solo al inicio o al final del beneficio motor. Este tipo de discinesias aparecen con mayor frecuencia en las extremidades inferiores, y en el lado más afectado por la enfermedad; suelen presentarse como movimientos alternantes rítmicos y distónicos de baja frecuencia, asemejando la acción de dar puntapiés (Marsden y cols., 1982; Luquin y cols., 1992).

Distonía en fase "off". Este tipo de discinesias, parece ser que afecta al 20-30% de los enfermos tratados con levodopa durante más de tres años (Carella y cols., 1993) y es más frecuente en la EP de inicio temprano (Quinn y cols., 1987; Poewe y cols., 1989). Las distonías en periodo "off" ocurren cuando el enfermo presenta signos claros de la enfermedad, y sobre todo al despertarse por la mañana, después de no haber recibido levodopa por la noche, por lo que reciben el nombre de distonía matutina o al despertar (Melamed, 1979). A pesar de ello, no hay que olvidar que pueden aparecer en cualquier momento del día en el estado "off" y suelen coincidir con bajas concentraciones en plasma de levodopa (Bravi y cols., 1993). Estas discinesias aparecen en los pies de forma uni o bilateral, siendo más acentuada en la parte más afectada por la EP (Poewe y cols., 1989). El pie adopta posturas equinovaro, con flexión de todos los dedos, a excepción de la articulación metacarpofalángica del primer metacarpiano que suele estar en extensión. Con facilidad se asocian a contracturas de los músculos de la pantorrilla y ocasionalmente a la distonía de toda la extremidad inferior. Estos espasmos distónicos, pueden durar de minutos a horas y suelen ser dolorosos, pueden precipitarse o aumentar en intensidad al caminar, realizar movimientos con las extremidades inferiores o con la ansiedad.

43

Debido al tratamiento crónico con levodopa que sufren los pacientes con EP se produce una potenciación de la transmisión dopaminérgica, y esto puede conseguirse por diferentes vías farmacológicas:

1. <u>Incremento de la síntesis de DA en el cerebro</u>: Se administra levodopa en combinación con un inhibidor periférico de la Dopa-descarboxilasa (carbidopa o beserazida) que impida la conversión de la levodopa en DA fuera del cerebro.

 <u>Estimulación de los receptores de DA:</u> con fármacos que estimulan los receptores de la DA, como la Bromocriptina, la Lisurida, el Ropirinol o el Pramipexol.

 <u>Inhibición de la destrucción de la Dopamina</u>: Los fármacos implicados son de dos tipos: los que inhiben las monoaminoxidasas como la Selegilina y los que inhiben la COMT como la Entacapona.

4. <u>Bloqueo de la recaptación de la DA en las terminales sinápticas:</u> como algunos medicamentos tricíclicos como la Benzotropina (no está disponible en el mercado español), que a veces se emplea en el tratamiento de la EP.

La afirmación de que "hay que tener en cuenta que no existe receta o formula específica para el Parkinson" sigue teniendo vigencia a día de hoy, ya que siempre será necesario elegir el momento de iniciar la medicación, ajustar su tipo y forma de administración a la sintomatología del paciente (Jahanshahi y Marsden, 1998). Actualmente los síntomas no motores, como alteraciones cognitivas y trastornos psicológicos y psiquiátricos de la EP, reciben mayor atención médica. Estos síntomas son cada vez mas frecuentes y producen mayores limitaciones que los síntomas motores (Cubo y cols., 2010) además de producir importantes alteraciones a nivel individual, familiar y social.

4. TRASTORNOS NO MOTORES EN LA EP

Por su propia definición negativa, los trastornos no motores comprenden todos aquellos trastornos que no son síntomas motores, es decir, que no son debidos a bradicinesia, rigidez, temblor, o alteración de la postura. Los trastornos no motores adquieren una gran relevancia clínica puesto que son frecuentes, condicionan la calidad de vida del paciente y pueden aparecer precozmente al inicio de la enfermedad (Linazasoro, 2004). Además, contribuyen a realizar un correcto diagnóstico diferencial con otros parkinsonismos y pueden ser, asimismo, de características fluctuantes, agravándose los cambios motores on-off (Witjas y cols., 2002). Se prefiere el término trastorno no motor al de complicación no motora, ya que éste parece sugerir que es debido a un curso evolutivo desfavorable o a una medida iatrogénica terapéutica utilizada. En realidad, dichos trastornos pueden observarse en etapas iniciales de una enfermedad aún no complicada y previamente al uso de cualquier terapia. También se prefiere dicho término al de síntomas no motores, puesto que se incluyen diversos síntomas y signos, incluso síndromes clínicos definidos (Lima y cols., 2012).

Para poder llegar a comprender la fisiopatología de todos los síntomas motores y no motores de la EP, tenemos que cambiar el concepto que simplifica la EP como una enfermedad neurodegenerativa que afecta exclusivamente a las neuronas dopaminérgicas. Según distintos autores, la afectación extrapiramidal es precoz y sigue un patrón de neurodegeneración característico y la afectación de ciertas áreas, como el sistema límbico (Braak y Braak, 2000; Braak y cols., 1996; Braak y cols., 1995; Jellinger, 1991). La muerte neuronal afecta además a otras poblaciones neuronales:

45

colinérgicas, triptaminérgicas, gabérgicas, adrenérgicas, noradrenérgicas y serotoninérgicas (Lee y cols., 2009).

Esta afectación parece ser la que explicaría la existencia de trastornos no motores, que pueden aparecer precozmente y que durante años pueden orientar al clínico hacia otros diagnósticos, antes de que sean evidentes los síntomas motores típicos de la enfermedad (Yañez-Baña, 2004).

El predominio de los síntomas motores de la EP, hace que se dé menos importancia a otras alteraciones que pueden ser tanto o más incapacitantes.

4.1. COMPLICACIONES PSIQUIÁTRICAS

Las complicaciones psiquiátricas se pueden deber a la propia enfermedad o a los tratamientos empleados (Cummings, 1988). En ocasiones estas complicaciones anteceden al diagnóstico, y suelen ser poco específicas como los trastornos afectivos y la ansiedad. Tras unos años de tratamiento dopaminérgico, las probabilidades de tener complicaciones psiquiátricas aumentan considerablemente debido a la acción del tratamiento (Lemke, 2008). Las manifestaciones psiquiátricas de la EP son: ansiedad, agitación, depresión, delirios, confusión, pesadillas, terrores nocturnos, ideas delirantes, alucinaciones y psicosis (Goetz y cols., 1982; Mercury y cols., 2007 y Lemke, 2008). La confusión, la agitación, las ideas delirantes y las alucinaciones parece ser que son más frecuentes (Weintraub y Stern, 2007; Schrag, 2004; Castro-García y cols., 2004) en personas mayores de sesenta años y generalmente se relacionan con el tratamiento.

4.2 DENERVACIÓN SIMPÁTICA CARDÍACA EN LA EP

Se ha propuesto el término "complejo Parkinson" para denominar a esta nueva visión de la EP como un proceso multisistémico, en el que la afectación motora característica no sería más que la "punta del iceberg" dentro del espectro de la enfermedad (Langston, 2006). Existe una creciente evidencia sobre la afectación precoz del Sistema Nervioso Autónomo (SNA) en la EP, y de forma más concreta, de las neuronas simpáticas postganglionares (Wakabayasi y cols., 1997; Iwanaga y cols., 1999; Braak y cols., 2006). Se ha descrito que el Fallo Autonómico Puro, denominado como una complicación tardía de la EP, puede evolucionar a EP (Kaufmann y cols., 2004), y un estudio epidemiológico prospectivo relacionó el estreñimiento con un mayor riesgo de desarrollar posteriormente EP (Abbot y cols., 2001). A lo largo de la evolución casi todos los pacientes presentan síntomas o signos de disfunción del SNA relacionados con la afectación de sus distintos componentes: entérico, parasimpático colinérgico, simpático colinérgico, simpático y noradrenérgico (Goldstein y cols., 2002; Martignoni y cols., 1995; Mathias, 1995). Sin embargo, es frecuente que las manifestaciones clínicas pasen desapercibidas en los estadíos iniciales de la enfermedad. Concebida la EP como una forma de disautonomía primaria, el interés se ha centrado en la disfunción simpática cardiaca como una de las alteraciones más precoces (Goldstein y cols., 1997; Mathias 1998; Goldstein y cols., 2000; Amino y cols., 2005).

Los estudios de imagen funcional cardiaca en la EP muestran de forma consistente una reducción en la captación miocárdica de radiotrazadores con afinidad por las terminaciones simpáticas noradrenérgicas (postganglionares), como son la 6-¹⁸F-

47

fluorodopamina y la ¹²³I-metaiodobenzilguanidina (¹²³I-IMBG) (Goldstein y cols., 1997; Orimo y cols., 1999) esto se correlaciona con el hallazgo anatomopatológico de una acusada reducción de la inmunoreactividad a tirosina hidroxilasa en los nervios epicárdicos y en el miocardio (Iwanaga y cols., 1999; Amino y cols., 2005; Taki y cols., 2000). Por el contrario, en la atrofia multisistémica la afección autonómica es básicamente preganglionar y la inervación noradrenérgica cardiaca se mantiene intacta, o ligeramente reducida, incluso en estadios avanzados de la enfermedad (Druschky y cols., 2000; Oka y cols., 2006; Orimo y cols., 2007). La denervación simpática cardíaca esta presente en estadíos muy iniciales de la EP (Campos y cols., 2004; Orimo y cols., 2007), e incluso podría ocurrir ya en fases presintomáticas (Goldstein y cols., 2007). La denervación aumenta con la progresión de la enfermedad (Li y cols., 2002; Burnett y cols., 2007), habiéndose sugerido un mecanismo centrípeto o *dying-back* (Orimo y cols., 2005; Orimo y cols., 2008).

Basándose en el estudio *post mortem* de casos con enfermedad incidental por CL y de pacientes con EP, se ha propuesto la secuencia patológica que podría seguir la degeneración simpática postganglionar (Orimo y cols., 2008): inicialmente los agregados de α -sinucleína se acumularían en los axones distales (fascículos epicárdicos) pero, al avanzar la degeneración axonal, se harían más abundantes en los somas neuronales (ganglios simpáticos paravertebrales) como estadio previo a la muerte neuronal (Figura 3). Esta secuencia patológica puede tener favorables consecuencias para la clínica y una gran importancia para el diagnóstico pre-motor y diferencial frente a otras patologías.



Figura 3: Esquema ilustrativo del proceso degenerativo del sistema nervioso simpático cardíaco. Las manchas negras representan agregados de a-sinucleína y las líneas de puntos degeneración de los axones simpáticos. ILBD(a): enfermedad por cuerpos incidental con preservación de de Lewy axones cardiacos TH+. ILBD(b): ídem con disminución de axones cardiacos TH⁺. PD: enfermedad de Parkinson. MSA: atrofia multisistémica. (De Orimo y cols., 2003).

5. EL SISTEMA DEL ÓXIDO NÍTRICO 5.1 BIOSÍNTESIS DEL NO

Hasta hace pocos años, parecía impensable que una sustancia gaseosa tan tóxica en condiciones ambientales, pequeña y de estructura elemental como el óxido nítrico (NO) fuera un elemento biológico de nuestro organismo. El descubrimiento de las funciones fisiológicas y reguladoras que posee el óxido nítrico en los mamíferos se debe a los hallazgos realizados, en las dos últimas décadas, estudiando los sistemas vascular e inmunitario (Coleman, 2001; Dias y cols., 2011). Así, se identificó que el NO ejercía potentes propiedades vasodilatadores y tenía actividad bactericida y antitumoral. La alteración de la producción del NO se ha relacionado con patologías como la arteriosclerosis, la hipertensión arterial esencial, la hipertensión asociada al embarazo y con procesos tumorales e infecciosos (Salonen y cols., 2012; Li y Förstermann, 2009; Hagan y Pepke-Zaba, 2011; Sheppard y Khalil, 2010; Kolb y cols., 2001). Posteriormente, se identificó que el NO también participaba en la relajación del músculo liso del aparato digestivo, respiratorio y urogenital, relacionándose con disfunciones eréctiles, patologías cardíacas y crisis asmáticas. Al estimular preparaciones celulares cerebrales con glutamato se liberaba NO, efecto que coincidía con la activación de los receptores N-metil-d-aspartato (NMDA) (Garthwaite y cols., 1989). Este trabajo inició la investigación encaminada a identificar las funciones neuronales del NO, habiéndose establecido que puede actuar como un mensajero intracelular y que participa en la plasticidad sináptica, la neuroprotección y la neurotoxicidad. El NO se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina a través de una reacción enzimática, catalizada por las oxido nítrico sintasas (NOS), que requiere oxígeno y NADPH y que produce L-citrulina (Figura 4).



Efectos intracelulares Efectos en células adyacentes Efectos en sitios lejanos

Figure 4: Biosíntesis del NO a partir de L-Arginina por acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) en las neuronas nitrérgicas.

Existen tres isoformas de NOS que se clasifican, actualmente, en: a) dos isoformas NOS constitutivas, dependientes del calcio ya que su actividad depende de su unión a la calmodulina: la neuronal (NOSn) y la endotelial (NOSe); y b) una isoforma inducible (NOSi), independiente del calcio. La biosíntesis del propio NO va a constituir el principal mecanismo de regular los niveles de NO. Las isoformas constitutivas son

las responsables de la producción fisiológica de NO, mientras que la isoforma inducible sólo se activa en determinadas situaciones patológicas bien por la presencia de agentes infecciosos o por la acción de diferentes sustancias, como las citoquinas, constituyendo un mecanismo de defensa primario en los macrófagos (Govers y Oess, 2004).

5.2. LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA NEURONAL (NOSn)

La NOSn, identificada inicialmente en neuronas cerebelares, es una proteína homodimérica de 1429 aminoácidos con un peso molecular de 160 kDa por monómero, siendo la primera isoforma en ser clonada (Bredt y cols., 1991; Nakane y cols., 1993). El gen que la codifica se localiza en el cromosoma 12q24.2 en el hombre y es uno de los más complejos que se conoce. La secuencia codificante está repartida en 29 exones y el gen puede ser transcrito a partir de cinco promotores alternativos, confiriéndole la posibilidad de ser activado ante diversos y muy diferentes estímulos, probablemente dependientes del tejido. A pesar de que se conoce una sola isoforma en el sistema nervioso central, se hallaron dos tipos de mRNA en la mayoría de las células nerviosas.

La NOS neuronal puede ser fosforilada por la proteinquinasa cAMP-dependiente (PKA), la proteinquinasa C (PKC) y la proteinquinasa Ca²⁺-calmodulina dependiente (CaMK). Una característica importante de esta isoenzima es su capacidad de producir tanto O_2 ⁻ como 'NO (Pou y cols., 1992). La NOS neuronal genera O_2 ⁻ en ausencia de L-arginina mientras que el agregado de L-arginina reduce la producción de O_2 ⁻ y aumenta la formación de 'NO. El óxido nítrico y el superóxido, formados por la misma enzima, pueden combinarse formando radicales más tóxicos, posibles mediadores de la citotoxicidad (Trujillo y cols., 2008). En el cerebro, la NOS neuronal está presente en pequeñas poblaciones neuronales. En algunas áreas, como en la corteza cerebral, el

hipocampo y el cuerpo estriado, existe en pequeñas interneuronas, comprendiendo sólo el 1-2% de la población neuronal total. Por otro lado, en el cerebelo, todas las células granulares y las células en canasta contienen NOS, mientras que está ausente en las células de Purkinje. Este patrón de localización es idéntico al de la NADPH diaforasa (Chung y cols., 2002). En el sistema nervioso central, la estimulación por glutamato (aminoácido excitatorio) de los receptores N-metil D-aspartato (NMDA), abre los canales de calcio que forman parte del receptor, produciendo el flujo de calcio y la activación de la NOS (Kowara y cols., 2006). De esta manera el NO actúa como segundo mensajero del glutamato aunque, gracias a su capacidad de difundir al espacio extracelular, también actúa sobre la neurona presináptica y las neuronas vecinas, contribuyendo al proceso conocido como "potenciación a largo plazo" (LTP) relacionado con la memoria y el aprendizaje (Huang, 1997).

Las neuronas NADPH diaforasa positivas son resistentes a distintos tipos de neurotoxicidad, así en la enfermedad de Huntington hasta un 95% de las células neuronales del núcleo caudado pueden degenerar, mientras que las NADPH diaforasa positivas permanecen sin cambios (Deckel, 2001). Por otra parte, otros tejidos también contienen cantidades variables de NOSn, mientras el músculo esquelético es un tejido rico en NOS, aunque se desconoce su significado fisiológico, los neutrófilos expresan cantidades pequeñas de esta enzima cuya función está relacionada con la defensa oxidativa inespecífica y la apoptosis de este grupo de granulocitos (Stamler y Meissner, 2001; Saini y cols., 2006).

5.3. NO Y EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Una de las funciones del NO que ha sorprendido y ha sido motivo de controversia dentro de propia comunidad científica es que en el SNC se comporte como un neurotransmisor. Esto se debe a las características físico-químicas del NO que difieren considerablemente de las sustancias neurotransmisoras establecidas (Schulman, 1997). Se trata de una molécula gaseosa, de tamaño muy pequeño, capaz de atravesar libremente las membranas biológicas debido a su gran liposolubilidad (Möller y cols., 2007). Ejerce sus efectos biológicos sin la necesidad de unirse a un receptor de membrana y no se almacena en vesículas sinápticas. Además, debido a la presencia de un electrón extra en su molécula tiene una alta reactividad química (radical libre), presentando una elevada toxicidad y una vida media extremadamente corta en tejidos vivos (5-15 seg) (Cavas y Navarro, 2002).

Existe todavía controversia acerca de si al NO se le puede considerar como un neurotransmisor. Algunos científicos consideran más apropiado denominarlo *mensajero intercelular* (Kandel y cols., 2001), mientras que otros afirman que es el primero de una serie de neurotransmisores distintos de los que hasta ahora conocíamos (Boehning y Snyder, 2003).

5.3.1 El NO y la modulación de la actividad estriatal

Algunas evidencias han demostrado dos poblaciones de neuronas distintas en el estriado: las interneuronas y las neuronas de proyección. Esta clasificación, basada obviamente en las características anatómicas, fue apoyada por las observaciones electrofisiológicas que demostraban que las neuronas del estriado respondían de forma

diferente a la estimulación cortical (Nisenbaum y cols., 1988) y anti-drómica (Ryan y cols., 1989; Kimura y cols., 1990). Hasta el momento, por registros intracelulares junto con la tinción intracelular, se ha demostrado claramente que las neuronas de proyección, anatómicamente definidas como neuronas espinosas de tamaño medio, se disparan a frecuencias bajas (Wilson y cols., 1990), mientras que las interneuronas grandes sin espinas (alrededor de 2-5% de las neuronas del estriado), tienen una actividad sostenida e irregular (Wilson y Groves, 1981; Kitai y Surmeier, 1993). Basándose en esta experiencia, el análisis que dispara la señal extracelular permite la definición de las dos clases de neuronas del cuerpo estriado, tanto en vigilia como en ratas anestesiadas (Galati y cols., 2008; Kish y cols., 1999; Chen y cols., 2001). En los primates, las neuronas fásicas del estriado presentan claros aumentos en la frecuencia de descarga que se producen en varias formas distintivas en las fases específicas de una tarea (DeLong, 1973; Crutcher y DeLong, 1984; Alexander y DeLong, 1985). Por el contrario, las interneuronas muestran una disminución duradera a corto plazo en respuesta a estímulos condicionados (Kimura y cols., 1984). Una clasificación más detallada identifica entre las interneuronas (Mallet y cols., 2006) parvalbúminapositivas GABAérgicas (alrededor de <1%), debido a su corto pico de duración (Kawaguchi, 1993; Kawaguchi y cols., 1997) separados por interneuronas GABA, que expresan neuropéptidos tales como somatostatina (SOM), o neuropéptido Y (NPY) o NOS (SOM / NPY / NOS + alrededor del 0,6%) y las grandes células colinérgicas sin espinas (alrededor del 3%). Las interneuronas nitrérgicas ejercen efectos neuromoduladores más lentos en sus dianas postsinápticas en lugar de rápidos efectos sinápticos (Gittis y cols., 2010). La falta de respuestas sinápticas en las MSNs podría ser debido a una liberación preferencial de NO en lugar de GABA. Los agonistas de los receptores de clase D₁ a través de los DA provocan la despolarización y el disparo de potencial de acción *in vitro* en las interneuronas nitrérgicas (Centonze y cols., 2002). Además, los efectos colinérgicos indirectos a través de los receptores muscarínicos de la acetilcolina también han sido descritos (Bernard y cols., 1998). Por otra parte, algunas regiones del cerebro anterior expresan altos niveles de GMPc estimulada por la fosfodiesterasa (PDE) (Repaske y cols., 1993; Van Staveren y cols., 2003). En particular, se ha encontrado que las MSNs estriato-nigrales expresan esta enzima que parece proporcionar un mecanismo por el cual el NO desde interneuronas sin espinas, actúan a través de GMPc pudiendo regular la producción de DA estimulada por el AMPc (Lin, 2009).

El NO ha sido relacionado con un gran número de procesos fisiológicos a nivel neuronal, incluyendo la liberación y recaptación de neurotransmisores, en particular de la dopamina (West y cols., 2002). También está implicado en varias patologías de la conducta en las que existe un desequilibrio dopaminérgico, tales como la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia y la adicción a las drogas (Guix y cols., 2005; Bernstein y cols., 2005; Itzhak y Ali, 2006). La evidencia disponible indica que el óxido nítrico puede incrementar la liberación de dopamina: i) mediante procesos dependientes del calcio a partir de las vesículas sinápticas, y ii) mediante procesos independientes de calcio, mecanismos de nitrosilación que facilitan el anclaje y la fusión de la vesícula sináptica con la membrana (Meffert y cols., 1994; Meffert y cols., 1996). Además, el óxido nítrico incrementa los valores dopaminérgicos mediante la inhibición de la recaptación de dopamina (Kiss y cols., 1999; Kiss y cols., 2004). El donador del NO, el nitroprusido de sodio (SNP) disminuye los niveles de recaptación de dopamina tritiada $([^{3}H]-DA)$ como se demuestra en preparaciones de sinaptosomas de estriado de rata (Lonart y Johnson, 1994; Pogun y cols., 1994). El NO también ha sido relacionado en la fisiopatología de la neurotoxicidad dopaminérgica. Esto ha sido sugerido por el hecho

de que donadores del NO puedan facilitar la oxidación de la DA (Wink y cols., 1996) y también por el efecto del tratamiento con inhibidores de la NOS. Todo esto podría producir una completa protección contra la depleción de la DA (Itzhak y Ali, 1996; Ali y Itzhak, 1998). Asimismo, la activación de la enzima guanilato-ciclasa y la consecuente producción de GMPc constituyen el mecanismo de acción mejor caracterizado del óxido nítrico. A través de él, el gas activa numerosas proteinquinasas, altera la actividad fosfodiesterasa y el metabolismo de los nucleótidos cíclicos y modula canales iónicos. Estos mecanismos dependientes de GMPc median una gran cantidad de funciones neuronales y es posible que, mediante la activación de la enzima guanilato-ciclasa, el óxido nítrico facilite la liberación de dopamina. La administración de un inhibidor de la enzima guanilato-ciclasa provoca un marcado incremento de las concentraciones de dopamina (West y Galloway, 1996) y, al administrarlo junto con una sustancia donadora de óxido nítrico, provoca la potenciación de los efectos.

Otro de los mecanismos mediante el cual el óxido nítrico puede interactuar con la transmisión dopaminérgica implica a los aminoácidos excitatorios. El óxido nítrico incrementa la liberación de glutamato y aspartato en numerosas regiones tales como la corteza, el hipocampo, estriado y cerebelo (West y Galloway, 1997; Guevara-Guzman y cols., 1994; Lawrence y Jarrot, 1993). El incremento en la liberación de glutamato parece efectuarse a través de varios mecanismos: la inhibición del transportador de glutamato (Lonart y cols., 1993; Pogun y cols., 1994), la activación del receptor NMDA (Montague y cols., 1994) y por un mecanismo directo sobre las vesículas en el terminal DA (Meffert y cols., 1994). La evidencia experimental señala la implicación de los receptores NMDA y AMPA en la facilitación de la liberación de dopamina mediada por el óxido nítrico, puesto que antagonistas de estos receptores bloquean esta liberación (West y Galloway, 1998).

5.3.2 El NO y su interacción con otros neurotransmisores en el control motor

En el estriado (caudado y putamen), de forma similar a la corteza cerebral, el 1-2% de las interneuronas tienen actividad NOS (Kubota y cols., 1993). El papel del NO se ha relacionado con una función de integración, ya que estas neuronas reciben aferencias glutamatérgicas excitatorias de la corteza cerebral y dopaminérgicas de la SN. La administración de inhibidores de la NOSn en los ganglios basales: i) disminuye la actividad locomotora, aunque se desarrolla rápidamente tolerancia a este efecto (Pedraza y cols., 2002); ii) disminuye la actividad eléctrica en los ganglios basales y en la corteza prefrontal (West y Galloway, 2002) lo que indica el papel facilitador del NO en las conexiones fronto-estriatales que regulan la actividad motora. Todo esto se mide mediante técnicas neuroquímicas y de electrofisiología (Sammut y cols., 2007).

El estudio del NO en el sistema nigro-estriatal, y concretamente su toxicidad para las neuronas dopaminérgicas (DA), adquiere gran interés con los numerosos trabajos que indican la participación de este radical libre en la EP. Los estudios bioquímicos e histológicos en los cerebros *post-mortem* de estos pacientes han revelado un incremento en la concentración de nitritos en el líquido cefalorraquídeo (Qureshi y cols., 1995) y la presencia de radicales NO en la SN (Shergill y cols., 1996). Los CL, característica histopatológica de la enfermedad, se tiñen positivamente con anticuerpos anti 3-nitrotirosina (Good y cols., 1998) y recientemente se ha descrito que uno de los componentes mayoritarios de estas inclusiones, la proteína α-sinucleína, se encuentra nitrosilada en la EP (Giasson y cols., 2000). Finalmente, se ha demostrado un marcado incremento en el número de células gliales que expresan un enzima de síntesis del NO, la NOSi, en la SN de los enfermos de EP (Hunot y cols., 2001). Todos estos datos indican una sobreproducción de NO, cuya fuente parece ser las células gliales. Por otra

parte, la información que se obtiene en modelos animales de la EP refuerza la participación del NO en el proceso degenerativo. En ratones tratados con MPTP se detecta un incremento en 3-nitrotirosina (Schulz y cols., 1995; Pennathur y cols., 1999) y un aumento en la expresión de NOSi en la microglía (Liberatore y cols., 1999; Dehmer y cols., 2000). Además, tanto la delección del gen de la NOSi como la inhibición farmacológica de este enzima, protege a las neuronas DA de la toxicidad del MPTP (Liberatore y cols., 1999; Dehmer y cols., 2000). Un exceso de producción de NO puede producirse por un incremento en la síntesis del enzima NOSi, o por un aumento de calcio intracelular que activa los enzimas constitutivos NOSn o NOSe. La concentración local de NO es una función de la relación entre su producción y su desaparición, bien por reacción o por difusión (Murphy, 1999).

5.4 EL NO Y SU IMPLICACIÓN EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Cuando la concentración de NO se eleva puede causar daño celular por diversos mecanismos (Figura 5): i) formando S-nitrosotioles, ii) reaccionando con el radical superóxido (O2·⁻) para formar peroxinitrito (ONOO⁻), una molécula mucho más reactiva y citotóxica que su precursora, iii) desregulando enzimas con grupo hemo, y iv) liberando hierro de la proteína intracelular ferritina. Una de las dianas principales donde el NO (y el ONOO⁻) ejercen sus efectos deletéreos es la mitocondria. El NO puede inhibir reversible o irreversiblemente la respiración mitocondrial, inhibir la creatina kinasa e inducir la permeabilidad mitocondrial transitoria (PT), con la liberación de pequeñas proteínas de la matriz (Murphy, 1999). El NO puede afectar tanto la cantidad como el reclutamiento en la membrana mitocondrial externa, de proteínas pro-

apoptóticas (Bax, Bcl-X, Bak) y anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-X_L) (Levine, 1997; Hsu y cols., 1997). Por otro lado, la S-nitrosilación del enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) produce su inactivación y ADP ribosilación no enzimática inhibiendo la glicólisis (Molina y Vedia y cols., 1992). Otro aspecto importante de la toxicidad del NO es la inducción de daño sobre el ADN y la consiguiente activación de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) para asistir su reparación. Este enzima transfiere más de 100 grupos ADP-ribosa del NAD a proteínas nucleares (Szabo y cols., 1996). La síntesis de novo de NAD⁺ que sigue a este ciclo, consume gran cantidad de ATP, a la vez que la menor disponibilidad de NAD⁺ compromete la síntesis de ATP. Por tanto, la activación de PARP produce la depleción de ATP y una muerte celular que se previene con inhibidores de este enzima (Eliasson y cols., 1997). Todos estos resultados indican que la causa principal de la toxicidad del NO es la inducción de un déficit energético, bien sea inhibiendo la GAPDH, alterando la mitocondria o activando la PARP. Pero además, la acumulación de hierro libre intracelular inducida por el NO, participa en la reacción de Fenton produciendo radicales hidroxilo (OH·), con gran capacidad oxidativa y citotóxica.



Figura 5: Algunas de las dianas celulares del NO, donde ejerce sus efectos citotóxicos y citoprotectores.

Una observación interesante en los cerebros de pacientes con EP, con enfermedad de Alzheimer y tras una isquemia cerebral (ictus) es que las neuronas que expresan NOSn aparecen relativamente preservadas del daño (Bockelmann y cols., 1994; Mufson y Brandabur, 1994). Una posible explicación a este hecho es que las neuronas que expresan NOSn tienen defensas antioxidantes más efectivas que otras neuronas (Bolaños y cols., 1997). Pero además, en modelos *in vivo* de EP se ha demostrado que el NO y el nitrosoglutation (GSNO), producto de la reacción entre el NO y el glutation (GSH), protegen a las neuronas DA del daño oxidativo causado por radicales OH⁻. (Rauhala y cols., 1996; Mohanakumar y cols., 1998; Rauhala y cols., 1998). Los mecanismos por los que el NO y el GSNO pueden actuar como citoprotectores incluyen (Figura 5):

- i) Inhibición de la producción de OH estimulada por hierro en la reacción de Fenton
- ii) Finalización de la reacción en cadena de peroxidación lipídica
- iii) Aumento de la potencia antioxidante del GSH (el GSNO es 100 veces más potente que el GSH atrapando OH· y peróxidos lipídicos)
- iv) Inhibición por S-nitrosilación de cisteinil proteasas como la caspasa-3 y la proteasa
 HIV-1 (Chiueh y Rauhala, 1999).

Incluso se ha descrito que el efecto neuroprotector del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es mediado por NO, a través de la producción de GMPc (Thippeswamy y Morris, 1997; Estévez y cols., 1998). Todos estos resultados experimentales ponen de manifiesto el dilema, intensamente discutido, del NO como molécula neuroprotectora y neurotrófica, o como molécula inductora de la muerte neuronal (Brown, 2010). Como se verá más adelante, la conclusión más importante de este debate ha sido que el entorno celular en cada momento puede condicionar la acción final de este radical libre. En lo que se refiere a la EP, la coexistencia en el sistema nigro-estriatal de otras alteraciones relacionadas con el estrés oxidativo, podría condicionar el efecto final del NO en la EP. Por ejemplo, se ha descrito una severa disminución en los niveles de GSH en la SN de pacientes con EP (Perry y cols., 1982; Riederer y cols., 1989; Sian y cols., 1994), así como una acumulación de hierro intracelular (Riederer y cols., 1989; Dexter y cols., 1989; Sofic y cols., 1991). La depleción de GSH es la primera alteración bioquímica encontrada en cerebros con EP y aparece antes de la degeneración neuronal en la demencia por CL por lo que se puede descartar que sea una consecuencia del proceso degenerativo (Power y Blumbergs, 2009).

Esto sugiere una posible relación entre ambos hechos, aunque debe ser establecido si la depleción de GSH contribuye a la degeneración.

5.5 INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DEL NO

Como inhibidores de la actividad de la NOS, hemos de señalar a dos compuestos: i) la N^{ω}-monometil-L-arginina (L-NMMA) y ii) la N^{ω}-N^{ω}-dimetil-Larginina asimétrica (L-ADMA) (Vallance y cols., 1992), que pueden producirse a partir de residuos de arginina tras metilación durante la renovación proteica. Estos compuestos en condiciones fisiológicas se encuentran en concentraciones bajas, pero en situaciones patológicas, como es el caso de las afecciones renales, pueden llegar a tener concentraciones bastantes elevadas que pueden disminuir la síntesis de NO (Vallance y cols., 1992). Otros inhibidores como la N^{\u03c6}-nitro-L-arginina (L-NNA), su ester la N^{\u03c6}nitro-arginina metil ester (L-NAME) y la N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO) pueden inhibir de manera preferente a las isoformas constitutivas de la NOS (Gross y cols., 1991; Handy y Moore, 1998), mientras que la N^{ω} -amino-L-arginina y la aminoguanidina inhiben la NOSi de los macrófagos de una manera selectiva (Stuehr y Griffith 1992; Vallance y cols., 1992; Knowles y cols., 1989). El inhibidor L-NAME parece inhibir in vitro la síntesis de NO por la isoforma NOSe (Pollock y cols., 1991; Moore y cols., 1989; Feldman y cols., 1993) y la isoforma NOSn, incrementando la presión sanguínea in vivo de forma patente. Todos estos compuestos (Tabla 1) suelen inhibir la actividad de las enzimas NOS de manera competitiva y la exposición de estas enzimas al inhibidor L-NMMA durante un tiempo prolongado provoca una desactivación irreversible de la enzima por alquilación (Feldman y cols., 1993).

También, el inhibidor N-[3-(aminometil)-benzil]-acetamida es un inhibidor de la isoforma NOSi altamente selectivo, tanto *in vitro* como *in vivo* (Garvey y cols., 1994).

NOMBRE	ABREVIACIÓN	SELECTIVIDAD
N-monetil-L-arginina	L-NMMA	nNOS = eNOS > iNOS
N-nitro-L-arginina	L-NA	nNOS = eNOS >> iNOS
N-amino-L-arginina	L-NAA	nNOS =iNOS>eNOS
7-Nitroindazol	7-NI	nNOS = eNOS = iNOS
N-iminoetil-L-omitina	L-NIO	iNOS > eNOS = nNOS

Tabla 1: Diferentes inhibidores de las isoformas de la NOS

Otro tipo de inhibidor es el difeniliodonio (Stuehr y cols., 1991), que no tiene similitudes estructurales con la L-arginina y no actúa de manera competitiva con este substrato sino como un inhibidor irreversible y progresivo, dependiendo su intensidad de acción, de su concentración, tiempo de exposición y temperatura. Los inhibidores de la calmodulina, tal como la trifluoroperazina, la clorpromazina y el calmidazolium, pueden inhibir las tres isoformas de la enzima NOS de manera no selectiva. También las isoformas enzimáticas de la NOS pueden ser inhibidas directamente por el propio NO (Griscavage y cols., 1993). Esta inhibición tendría como consecuencia una cierta limitación de los efectos citotóxicos del NO. El monóxido de carbono (CO) inhibe también las isoformas de la NOS purificadas. Los análogos de la L-arginina (L-hemoarginina, L-arginil-L-aspartato, L-arginina metil ester) o análogos de la citrulina (S-metil, S-etil-L-citrulina) y otros compuestos aminoacídicos de bajo peso molecular pueden también inhibir la síntesis de NO. Entre otros inhibidores de la NOS que se están usando en la actualidad, está el que nosotros hemos utilizado en la presente tesis,

el 7-Nitroindazol (7-NI) que reduce la concentración de NO en el hipocampo tras la isquemia transitoria llevada a cabo en el cerebro anterior (Handy y Moore, 1998; Jiang y cols., 1999; Chalimoniuk y Strosznajder, 1998; Lei y cols., 1999). La N-acetil-3-O-metildopamina también tiene efectos inhibidores por su efecto de bloquear la síntesis de H_4B , un cofactor para la NOS. El uso de este inhibidor alivia el daño neuronal en el hipocampo de rata tras la isquemia (Cho y cols., 1999). También deben considerarse con efecto protector de la acción del NO aquellos productos que actúan inhibiendo el incremento de la guanilato ciclasa soluble, como es el preparado ILY83,583 (Chalimoniuk y Strosznajder, 1998) o las tetraciclinas, la doxiciclina y la miociclina que bloquean la actividad de la microglía y con ello la producción de NOSi (Yrjanheikki y cols., 1998).

5.6. PAPEL DEL NO EN LA REGULACIÓN DE LAS DISCINESIAS INDUCIDAS POR LEVODOPA

Los movimientos anormales involuntarios o discinesias generadas por una administración prolongada de levodopa representan uno de los principales retos de cara a las actuales terapias contra la EP (Cenci y Lindgren, 2007; Stefani y cols., 2010). Estos trastornos motores debilitantes son los mas problemáticos, porque la levodopa, a pesar de su introducción en clínica hace varias décadas (Cotzias y cols., 1969), sigue siendo el tratamiento de elección para el tratamiento de la EP (Marsden, 1990). El descubrimiento de las terapias farmacológicas fue capaz de contrarrestar las discinesias inducidas por levodopa (LIDs), por tanto, representan un importante avance en el tratamiento de la EP. El diseño de nuevos agentes para la prevención y el tratamiento de las LIDs requiere el esclarecimiento de los cambios adaptativos que se producen en el

cerebro parkinsoniano por la administración repetida de la levodopa y la evaluación de su papel en el desarrollo y la expresión de esta condición (Cenci y cols., 2009). La translación de los agentes antidiscinéticos en la clínica fue exitosa pero dichas drogas han producido resultados todavía algo limitados. Las implicaciones del NO en la respuesta a la terapia anti-discinética es actualmente poco conocida, pero diferentes evidencias han demostrado el papel del NO en la degeneración de neuronas dopaminérgicas en la vía nigroestriatal (Duncan y Heales, 2005). Hay varios posibles mecanismos a través de los cuales los inhibidores de la NOS pueden influir sobre las LID. El NO modula la liberación de la levodopa en el estriado (Sánchez y cols., 2002; Abreu-González y cols., 2006). Además, el NO aumenta los niveles de DA y serotonina de manera dependiente de GMPc en el estriado y en el área preóptica de la rata (Trabace y cols., 2004). El desarrollo de discinesias ha sido asociado con cambios en la expresión de genes y proteínas en las neuronas estriatales dopaminérgicas denervadas (Lundblad y cols., 2009; Anderson y cols., 1999; Pavon y cols., 2006). En pacientes con EP, los niveles en suero de GMPc están elevados con terapia que incluya levodopa (Chalimoniuk y Stepien, 2004). Sin embargo, estudios en ratas dopaminérgicamente denervadas han demostrado que la las discinesias secundarias al tratamiento con levodopa están asociadas con una disminución de los niveles de nucleótidos cíclicos en el estriado (Giorgi y cols., 2008; Picconi y cols., 2011). Las discinesias inducidas por levodopa han sido relacionadas con la plasticidad sináptica cortico-estriatal, la cual es mediada por grandes cambios moleculares.

En la EP hay un aumento de la NADPH-diaforasa en las células de la glía en la SN sugiriendo una sobreexpresión de la NOSi (Hunot y cols., 1996), pero también hay una elevada expresión del ARNm de la NOSn en otras áreas de los ganglios basales (Eve y cols., 1998) y un aumento de los niveles de nitritos en el liquido cefalorraquídeo

65
(Qureshi y cols., 1995). Todo esto sugiere un aumento de la producción del NO: es posible que el aumento de expresión de la NOSn esté asociado con la reorganización neurodegenerativa de los neurocircuitos, preservando las funciones que no están afectadas (West y Tseng, 2011).

La nueva estrategia para el descubrimiento de fármacos antidiscinéticos se basa en la co-administración no dopaminérgica junto con la levodopa, como hemos realizado nosotros en esta tesis doctoral. Con este tratamiento, hipotéticamente, deberíamos ser capaces de tratar los síntomas de las LID y la EP, regulando la actividad aberrante de los ganglios basales mientras se está manteniendo al mismo tiempo la eficacia de levodopa en la función motora como hemos puesto de manifiesto con el 7-NI en el estudio clínico de las discinesias en primates no humanos.

Recientemente, se ha demostrado, mediante el uso de los modelos de parkinsonismo experimental en roedores, una actividad excesiva del sistema del NO la cual podría contribuir a la patogénesis de las LIDs (Pavon y cols., 2006; Novaretti y cols., 2010; Padovan-Neto y cols., 2009; Picconi y cols., 2011). Por ejemplo, el tratamiento crónico con levodopa induce la expresión de FosB en el estriado, en las MSNs y en las interneuronas NOS-positivas en modelos de parkinsonismo experimental en roedores (Pavon y cols., 2006; Padovan-Neto y cols., 2011). La levodopa aumenta los niveles de ARNm de NOSn en el lado contralateral e ipsilateral a la lesión de DA del haz prosencefálico medial (Padovan-Neto y cols., 2011), pero no produce ningún nuevo incremento de proteínas NOSn en el estriado en comparación con el aumento inducido por 6-OHDA (Padovan-Neto y cols., 2011).

El tratamiento con 7-NI y L-NOARG previenen las discinesias inducidas por levodopa (Novaretti y cols., 2010; Padovan-Neto y cols., 2009; Padovan-Neto y cols., 2011). Por su parte, el tratamiento con 7-NI se ha visto que mejora el rendimiento motor en ratas tratadas con levodopa y previamente lesionadas con 6-OHDA (Novaretti y cols., 2010; Padovan-Neto y cols., 2009). Especialmente importante es también la evidencia de que la administración subcrónica del 7-NI disminuye el efecto antidiscinético (Novaretti y cols., 2010) a diferencia de su acción cataléptica (Del Bel y cols., 2002). La hipótesis que esta ahora en alza es la vía de señalización del NO/guanilato ciclasa (GC) /GMPc en las MSNs y las interneuronas nitrérgicas, esta teoría se sustenta no solo en modelos animales sino también en algunas pruebas en los pacientes con EP. De hecho, se ha detectado un aumento de los niveles de NO y del GMPc en el suero (Chalimoniuk y cols., 2004) y en el líquido cefalorraquídeo (Qureshi y cols., 1995) de pacientes con EP al recibir terapia con levodopa. Además el tratamiento con levodopa no afecta a la vía de señalización NO/GCs/GMPc en el modelo experimental de MPTP en ratón. Este modelo es capaz de desregular la expresión y la actividad de la NOSn y la GC en animales normales a niveles observados en los ratones tratados con MPTP (Chalimoniuk y cols., 2007). Estos niveles de NO se elevan en condiciones de parkinsonismo, activan al GMPc y este a su vez a la PKG que actúa sobre la proteína DARPP-32 y su variante fosforilada en la Thr-34 que son muy relevantes en la EP. Esta DARPP-32 fosforilada inhibe a su vez a la proteína fosfatasa 1 (PP-1) que está implicada en las discinesias de una manera directa. Si administramos un inhibidor de la NOS, como el 7-NI, se revierten todos los efectos anteriores disminuyendo los niveles de NO (Figura 6).



Figura 6: Diagrama esquemático mostrando el mecanismo del NO en las MSNs del estriado y en las interneuronas nitrérgicas en respuesta a la transmisión dopaminérgica en condiciones normales y con la EP.

El futuro puede revelar importantes nuevas vías para el tratamiento de las LIDs. El NO y su cascada de nucleótidos son dianas prometedoras que podrían actuar sobre las diferentes alteraciones inducidas por las discinesias como las que implican una variación en la plasticidad sináptica en el cuerpo del estriado y otras alteraciones no dopaminérgicas. El papel del GMPc regulado por las PDEs juega un papel en la mediación de otras acciones del NO que merecen un mayor estudio. Hasta ahora, esta atractiva hipótesis no había podido ser validada en modelos experimentales próximos filogenéticamente al ser humano, tales como los estudios en primates no humanos, o directamente en el ser humano, pero en esta tesis doctoral se abre una nueva vía para poder abordar dicho problema empleando un inhibidor de la vía de señalización NO/GCs/GMPc/PKG.

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

La aparición de síntomas parkinsonianos, aunque sean muy leves, indica que existe una disfunción a nivel de ganglios basales porque se han superado los mecanismos de compensación. Como ocurre en cualquier estructura del SNC, la denervación de la vía nigroestriada se sigue de unos cambios compensatorios cuyo objetivo es mantener el equilibrio de todo el sistema y que no aparezcan los síntomas y signos parkinsonianos (Bezard y cols., 2003; Hirsch, 2000). Estos mecanismos no son del todo conocidos, pero numerosos datos experimentales indican que pueden operar a diferentes niveles del sistema motor:

- Mecanismos de compensación existentes en la vía nigroestriada (Bezard y cols., 2001; Zigmond y cols., 1990). Entre ellos cabría destacar el aumento del recambio de dopamina por un incremento de la actividad de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y la hiperactividad de los receptores dopaminérgicos estriatales.
- ii) Mecanismos de compensación a otros niveles de los ganglios basales. Se ha demostrado que las neuronas del globo pálido medial y del núcleo subtalámico incrementan su actividad desde fases muy precoces del proceso degenerativo, previas a la aparición de síntomas motores (Bezard y cols., 1999). La hiperactividad subtalámica es importante porque puede provocar un incremento de la actividad (sobre todo actividad en salvas) de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Bezard y cols., 2003; Bezard y cols., 1999). Esto se debe a que las neuronas subtalámicas proyectan a la SNpc y utilizan glutamato como neurotransmisor excitatorio.
- iii) Mecanismos de compensación en áreas motoras y premotoras corticales (Bezard y cols., 2003). Estos cambios ocurren en fases más tardías cuando ya existen leves síntomas parkinsonianos y son un último intento por minimizar su impacto funcional.

71

La secuencia de acontecimientos podría ser así: inicialmente, la pérdida neuronal y, por tanto, la deficiencia en la síntesis de dopamina se compensa con la hiperactividad de las neuronas indemnes y por cambios en la liberación vesicular y en la recaptación de dopamina desde el espacio sináptico. También existe una proliferación de nuevos terminales nigroestriados (*sprouting*).

Tanto en el modelo de la rata con lesión por 6-OHDA como en el mono por MPTP, la lesión dopaminérgica realizada en la mayor parte de estudios puede calificarse de aguda o sub-aguda (15-21 días), por lo que los efectos de la lesión y los posibles mecanismos compensatorios se solapan. Los estudios de cambios dopaminérgicos en monos intoxicados con MPTP son muy valiosos, pero en ninguno de ellos están bien definidas las diferentes etapas de la EP (Bezard y cols., 2003). Son necesarios, por tanto, estudios en modelos crónicos de instauración del estado parkinsoniano como los que hemos realizado en esta tesis doctoral, en la que los primates no humanos (macacos) fueron tratados crónicamente con MPTP durante casi 1 año para inducir una degeneración dopaminérgica progresiva, semejante a la que acontece en el enfermo de Parkinson, así como los mecanismos subyacentes a la misma.

En cuanto a los objetivos de este trabajo de investigación, este se encuadra en un proyecto amplio dirigido a:

i) Investigar los cambios que ocurren en el tejido cerebral *post mortem* procedente de modelos de parkinsonismo inducidos en ratas y primates no humanos mediante la intoxicación con 6-OHDA y MPTP respectivamente. En ambos casos se indujo una degeneración lentamente progresiva la cual fue tratada posteriormente con levodopa hasta que se desarrollaron discinesias estables en el tiempo.

- ii) Evaluar como un inhibidor del NO, el 7-NI, puede interactuar en las discinesias disminuyendo su intensidad y duración en los 2 modelos de parkinsonismo experimental expuestos en el apartado i).
- iii) Analizar los cambios funcionales proteicos en el tejido cardiaco de animales (primates no humanos) intoxicados con MPTP y ulteriormente tratados con levodopa hasta la inducción de discinesias.

La hipótesis principal del proyecto es investigar la interacción entre el sistema nitrérgico y dopaminérgico en modelos experimentales de EP inducidos en ratas (Sprague-Dawley) y en monos (*Macaca fascicularis*). Nuestros resultados confirman esta interacción en ratas y en monos, pero resta saber si esta interacción cambia después del tratamiento crónico con levodopa, tanto en ratas como en monos. De acuerdo con esta hipótesis general, en esta Tesis Doctoral se han planteado los siguientes objetivos:

- Observar si el tratamiento subcrónico (en los cinco primeros días después de la lesión) con un inhibidor no específico de la enzima de síntesis del NOS afecta a la lesión de la vía nigroestriatal causada por la microinyección de la toxina 6-OHDA en el haz prosencefálico medial o en el CPu dorsal en ratas. Este efecto será evaluado por medio del test de comportamiento rotatorio inducido por apomorfina y por las inmunocitoquímicas para oxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), DARPP-32 total (DARPP-32 Total) y DARPP-32 fosforilada en Thr-34 (P-DARPP-32) y la Tiroxina Hidroxilasa (TH).
- Evaluar si en ratas previamente lesionadas con 6-OHDA en el haz prosencencefálico medial existe un efecto de la inhibición de la NOS sobre las discinesias inducidas por la administración de la levodopa en el transcurso del tratamiento.

- 3. Verificar si existe algún efecto de la inhibición específica de la nNOS en un grupo de monos (*Macaca fascicularis*) que fueron parkinsonizados mediante la intoxicación crónica con MPTP hasta que desarrollaron un parkinsonismo estable y que posteriormente fueron tratados con levodopa hasta que desarrollaron discinesias mantenidas en el tiempo.
- 4. Estudiar diferentes marcadores estriatales en los cerebros post-mortem de los macacos para evaluar el grado de lesión de la vía nigroestriatal causada por la administración crónica del MPTP. Además también se estudiara los efectos del tratamiento farmacológico con la levodopa y con el inhibidor del NO.
- Analizar los cambios a nivel bioquímico que ocurren en el tejido cardiaco de los monos parkinsonizados con MPTP y tratados crónicamente con levodopa.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. EXPERIMENTO EN RATAS

1.1 ANIMALES

Se utilizaron 64 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley con un peso entre 250-300 gramos. Se estabularon en grupos de 4 animales por caja a una temperatura controlada de $(21 \pm 1 \,^{\circ}C)$, humedad relativa (55%) y un ciclo circadiano de 12 horas de luz. Los roedores tenían libre acceso a comida y agua. Las ratas fueron siempre manipuladas de acuerdo a las reglas vigentes europeas y españolas para la manipulación de animales de experimentación (2010/63/EEC y 2003/65/EC). Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia y el Comité de Ética de la investigación de la Universidad de Murcia.

1.2 CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA. MICROINYECCIONES CON 6-OHDA

Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina/xilazina (50 mg/Kg; 10 mg/Kg, i.p) y colocadas en un aparato estereotáxico (Kopf Texas Instruments). Las lesiones fueron realizadas con microinyecciones de 6-OHDA con 0.02% de ácido ascórbico (4 μ g/ μ l, RBI-Sigma) disuelto en 0.9 % salino dentro del estriado derecho (2 microinyecciones de 2 μ l cada una) con una aguja Hamilton de 10 μ l a un flujo de 1 μ l/min. La concentración de la toxina parkinsonizante fue seleccionada con la idea de obtener ratas con una lesión restringida al área dorsolateral del neoestriado del área motora y que por tanto, pueden responder al test de control motor con rotaciones contralaterales al lado de la lesión al ser tratados con apomorfina (Schwarting y Huston, 1996).

Las coordenadas estereotáxicas de las 2 inyecciones se realizaron según el Atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson (1998) (Figura 7). La distancia de la barra de los dientes fue de -2.4 mm. Las coordenadas fueron: 1ª inyección) AP: 1.20 mm; L: 2.5 mm; V: 4.5 mm; y la 2ª inyección) AP: 0.48 mm; L: 3.4 mm; V: -5.0 mm a partir del bregma. Los animales controles fueron inyectados con salino (vehículo) en vez de la neurotoxina siguiendo el mismo procedimiento. Después de la inyección la aguja se dejo en el interior del estriado durante 2 minutos adicionales antes de retirarla, la retirada fue lenta para evitar el reflujo de la neurotoxina a otras áreas.



Figura 7: Coordenadas estereotáxicas en el neoestriado según el Atlas de cerebro de rata de Patxinos y Watson (1998).

1.3 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

La administraciones de 7-Nitroindazol (7-NI) comenzaron 30 minutos antes de la cirugía estereotáxica. El inhibidor fue disuelto en aceite de cacahuete y administrado durante 5 días (una administración por día) a dosis terapéuticas. La dosis adecuada fue probada en experimentos previos, para evitar el comportamiento cataléptico en los animales (15 mg/kg, i.p. x5) (Guevara y cols., 2002; Padovan-Neto y cols., 2009). Para prevenir el componente noradrenérgico, 15 minutos antes de las microinyecciones con 6-OHDA, los animales fueron tratados con desmetilimipramina (un inhibidor de alta afinidad del transportador de noradrenalina, 25 mg/kg i.p Sigma) y paragilina (un inhibidor de la enzima monoaminooxidasa, 40mg/kg i.p. Sigma). Cada grupo control o lesionado fue dividido en 2 subgrupos tratados con vehículo (aceite de cacahuete) o con 7-NI: i) Sham + Vehicle (n=9), ii) Sham + 7-NI (n=9), iii) 6-OHDA + Vehicle (n=11), iv) 6-OHDA + 7-NI (n=11). Después de cada intervención, y antes de colocarlas en sus jaulas se les colocó durante 24 h en jaulas limpias sobre un lecho de algodón a 22° C para recuperarse de la operación.

1.4 TESTS COMPORTAMENTALES

1.4.1 Evaluación del comportamiento

Quince días después de la lesión con la 6-OHDA se determinó el éxito de la denervación unilateral estriatal mediante la inyección de apomorfina clorhidrato (0.5 mg/kg s.c., RBI-Sigma) a las ratas. El numero total de rotaciones contralaterales (lado opuesto a la lesión) fueron grabadas cada 5 min durante 45 minutos (Padovan-Neto y cols., 2009). Las rotaciones fueron contadas y monitorizadas con un rotámetro [desarrollado por el CAID (Centro de Apoyo a la investigación y al Desarrollo de nuestra Universidad)]. Los animales lesionados que realizaron más de 15 vueltas hacia el lado contralateral de la lesión en un total de 45 min fueron incluidos en este estudio.

1.4.2 Elevated Body Swing Test (EBST) o ensayo del cuerpo elevado y balanceado

Una evaluación adicional con el EBST fue realizada para verificar la lesión parcial en el estriado y evitar los efectos de sensibilización debido a repetidas inyecciones de apomorfina. El EBST fue diseñado para evaluar los animales tratados con 6-OHDA 35 días después de la lesión (Borlongan y Sanberg, 1995).

Los animales se colocan en una caja de cristal para su habituación durante 2 min. A continuación, cada rata fue cogida a 3 cm desde la base de su cola y suspendida a una altura de 3 cm sobre su caja. En esta posición los animales comienzan a balancearse a la derecha y a la izquierda. Se cuenta cada balanceo como medida de análisis. El animal debe volver al sitio de partida para contar de nuevo otro balanceo. Al comienzo del experimento un pequeño pellizco sobre la cola estimula el comportamiento de balanceo. Se contabilizó el número de balanceos a la derecha (R) y a la izquierda (L) en un periodo de 1 min.

1.5 PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO

40 días después del ultimo test comportamental, 40 de los 64 animales (18 controles y 22 tratados con 6-OHDA) fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina (50 mg/kg; 10 mg/kg i.p.) y perfundidos con tampón fosfato salino (PBS) 0.01 M (300 mL; pH=7.4) seguido de una fijación con paraformaldehido (PFA) al 4% en 0.1 M de tampón fosfato (250 mL; pH=7.4). Los encéfalos fueron rápidamente retirados y post-fijados en la misma solución de fijación durante 24-48h a 4° C. Posteriormente se crioprotegieron en tampón fosfato con sacarosa al 30% durante 24-48 horas hasta que se observó que dichos cerebros estaban completamente libres de agua y por tanto su ultracongelación era posible. A continuación se congelaron rápidamente con isopentano a -40° C (Sigma) y se almacenaron a -80° C hasta que se llevaron a cabo las inmunohistoquímicas.

1.5.1 Inmunohistoquímica e histoquímica

De cada uno de los cerebros se realizaron secciones coronales seriadas, de 30 µm de grosor empleando un criostato (Leica), que fueron mantenidas en flotación a 4°C sumergidas en PBS 0.25 M con azida sódica 0.1%. Se emplearon secciones adyacentes que contenían el núcleo Caudado-Putamen (CPu) o la Sustancia Negra *pars compacta* (SNpc) las cuales fueron inmunoteñidas para TH, DARPP-32, DARPP-32 fosforilada en la Thr-34 y nNOS.

Brevemente, se tomó el tejido conservado a 4º C en PBS 0.25 M con azida sódica 0.1%. Se procedió a realizar dos lavados consecutivos de 10 minutos de duración en TBS 0.25 M en agitación a 100 Hz. Para eliminar la peroxidasa endógena de los tejidos se procedió a incubar 5 minutos en H₂O₂ al 30% (Sigma®, H1009) disuelta en TBS 0.25 M al 3%, con metanol al 20%, en agitación a 100 Hz. Se sometió al tejido a dos lavados consecutivos en TBS 0.25 M durante 10 minutos cada uno en agitación a 100 Hz y posteriormente a un baño con en Triton X-100 (Sigma®, T9284) en una solución de TBS 0.25 M con una concentración del 10%, durante 5 minutos en agitación a 100 Hz. Después de dos lavados más en TBS 0.25 M de 10 minutos en agitación se incubaron los tejidos en suero normal de caballo durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación de 100 Hz con el fin de bloquear los posibles marcajes inespecíficos y mejorar la especificidad del anticuerpo. Transcurridos los 30 minutos de incubación se lavaron de nuevo los tejidos dos veces en TBS 0.25 M durante 10 minutos en agitación 100 Hz. Seguidamente se procedió a la incubación durante 18-24 horas a 4° C en agitación de 50 Hz con el correspondiente anticuerpo específico primario (TH, 1:1000, Calbiochem; nNOS, 1:1000, Santa Cruz; total DARPP-32 y DARPP-32 fosforilada Thr-34, 1:400, Abcam ab51139 y ab51076, respectivamente). Las secciones fueron procesadas por el método de inmunoperoxidasa mediante avidinabiotina (Vectastain ABC kit, Vector Lab) y las células inmunopostivas fueron visualizadas por la reacción con el cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma, 1 mg/ml) y de peróxido de hidrógeno (0.2%). Para ambas DARPP-32 (total y fosforilada) una solución de níquel al 1% fue también añadida para visualizar las células con un mayor contraste.

Las secciones fueron montadas sobre portas gelatinizados, se delipidaron en xilol y se cubrieron con un cubreobjetos y un medio de montaje (Eukitt®, O. Kindler GmbH & CO) para las observaciones microscópicas. Las células positivas para DARPP-32 pudieron ser visualizadas como azul o azul oscuro en el producto de la reacción respectivamente y la nNOS y la TH como un precipitado marrón. En todos los experimentos, los tejidos de los animales controles y los de todos los grupos lesionados fueron procesados siempre en el mismo ensayo.

1.6 ANÁLISIS POR WESTERN BLOT

Diez ratas control (Sham + Vehiculo, n=5; Sham + 7-NI, n=5) y catorce del grupo lesionadas con 6-OHDA (6-OHDA + Vehículo, n=7; 6-OHDA + 7-NI, n=7) fueron sacrificadas por decapitación 30 min después de la ultima inyección con 7-NI. Los cerebros fueron retirados y diseccionados sobre una superficie de hielo seco. Las estructuras (CPu y SNpc) fueron inmediatamente inmersas en nitrógeno líquido. Las muestras de estriado y SNpc se diluyeron en un tampón de homogenización (tampón fosfato salino, 2% SDS mas un coktail inhibidor de proteasas (Roche, Alemania) y un kit inhibidor de fosfatasas (Calbiochem, Alemania). Se homogenizaron durante 50 s y se centrifugaron a 6000 g durante 20 min a 4º C. La concentración total de proteínas fue determinada de forma espectrofotométrica usando el método del ácido bicinconínico (BCA) descrito por Wiechelman (Wiechelman y cols., 1988). El volumen máximo de muestra que se cargó en cada calle fue de 25µl. Las muestras diluidas empleadas en este trabajo, tuvieron una concentración de proteínas de 50 µg por calle. En cada uno de los geles se introdujeron dos controles de proteínas estándar BenchMarkTM Prestained (Invitrogen, España) y Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad, USA), con pesos moleculares conocidos, para tener una referencia correcta a la hora de identificar las proteínas problema. Se realizaron controles de carga, con el fin de comprobar que en todas las calles la concentración de proteína era la misma. Igual cantidad de proteína (50 µg/calle) de cada muestra fueron cargados sobre un gel de poliacrilamida al 10%. Se realizaron las electroforesis y se transfirieron a las membranas de polivinilideno fluoruro (PVDF) usando un mini Trans-Blot Electrophoresis Transfer Cell (Bio-Rad Lab., California, USA). Para bloquear las uniones no específicas de los anticuerpos se procedió a la incubación de las membranas con suero de albúmina bovino (BSA) al 1% en tampón tris salino Tween (TBST: 10 mM Tris-HCl, pH=7.6, 150 mM NaCl, y 0.05% Tween 20). Posteriormente, las membranas fueron incubadas toda la noche usando anticuerpos selectivos contra DARPP-32 total (1:1000; Cell Signaling Technology) y DARPP-32 fosforilada en la Thr-34 (1:1000; Cell Signaling Technology). Después de varios lavados con TBST, las membranas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa (anti-rabbit sc-2004 for DARPP-32 fosforilada en la Thr-34 y Total DARPP-32, a 1:2000). Después de los lavados, la inmunoreactividad fue detectada con un kit de detección quimioluminiscente/quimioflorescente para Western Blot (ECL Plus, GE Hearthcare, UK) y se visualizó en un dispositivo tipo Typhoon 9410 (GE Healthcare). El stripping o desnudamiento de la membrana de los anticuerpos de los blots se llevó a cabo por incubación en un tampón de *stripping* (glicina 25mM y SDS 1%, pH=2) durante 1 hora a 37° C. Como gen constitutivo (o *housekeeping*) para normalizar los datos de las proteínas analizadas utilizamos anti-β-actina (Cell Signaling, 45 kDa).

1.7 ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN

1.7.1 Análisis estereológico

Todas las cuantificaciones histológicas fueron realizadas de manera completamente ciega. Las áreas neuroanatómicas (CPu y SNpc) fueron identificadas usando el atlas del cerebro de rata de Paxinos y Watson (1998). Las neuronas teñidas fueron contadas usando un sistema de análisis de imagen computarizado. Las imágenes fueron capturadas a partir de secciones usando el programa informático ImageJ 1.43 con una cámara digital (Cool Snap) conectada a un microscopio Zeiss a través de un zoom del microscopio que va desde 10x hasta 100x. Las fotos fueron tomadas a un aumento de 40x. La perdida de fibras dopaminérgicas en el CPu fue analizada midiendo la densidad óptica de las fibras TH-ir con un analizador computarizado (ImageJ Systems). El valor medio para la intensidad de la tinción fue calculado y expresado en unidades de una escala arbitraria de grises (densidad óptica relativa) (Echeverry y cols., 2004). Las células de la SNpc fueron contadas con un objetivo de 40X en aceite de inmersión usando un microscopio Zeiss. Se analizaron 6 secciones seriadas por animal para un análisis sistemático sobre un disector (tamaño 190 x 130 µm). Las neuronas nNOS⁺ fueron cuantificadas en la región del CPu. Para la cuantificación de las núcleos de las neuronas DARPP-32⁺ se realizó una media de un área fijada de la parte dorso-lateral del CPu. Para cada tratamiento farmacológico se evaluaron 6 secciones de cada animal. A continuación, se analizaron los valores medios del número de células de las 6 secciones de cada animal.

1.7.2 Análisis por Western-Blot

Las cuantificaciones de los immunoblot correspondientes a la DARPP-32 total (32 kDA) y a la DARPP-32 fosforilada en la Thr-34 (32 kDa) se llevaron a cabo por densitometría (Alphamanager, Nucliber, Madrid). Medimos la intensidad óptica de la densidad de las bandas. El software genera datos cuantitativos de la intensidad de las bandas. Los valores se expresaron en niveles de pixeles grises que eran proporcionales a la intensidad de luz. La densidad óptica fue normalizada a los valores de fondo (o *background*). Las variaciones relativas entre las bandas de muestras experimentales y las muestras de controles fueron calculadas en la misma imagen de la membrana.

1.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis fueron realizados con el programa GraphPad Prism 5.0 (California Inc, USA). Las diferencias entra las medidas fueron analizadas usando ANOVA de 2 vías. El test de Duncan fue usado para procedimientos de comparación múltiple. También fue usado el coeficiente de correlación de Pearson para correlacionar la pérdida dopaminérgica existente con el comportamiento rotatorio de las ratas y analizar las posibles interrelaciones de proteínas tales como DARPP-32, la nNOS y la TH. Para el análisis por Western-Blot usamos ANOVA de una vía seguido de un análisis *post-hoc* empleando el test de Newmam-Keuls. En todos los casos se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando el nivel de significación era de * P<0.05 aplicándose el concepto de muy significativa para un nivel de significación de ** P<0.01. En todas las figuras de gráficos de barras los datos representan la media, y las barras de error corresponden al Error Estándar de la Media.

2. EXPERIMENTO EN PRIMATES NO HUMANOS.

2.1 ANIMALES Y GRUPOS EXPERIMENTALES

Se utilizaron 12 monos macacos adultos (*Macaca fascicularis*) de sexo masculino con una edad que variaba de 4-6 años y el peso entre 3,5 y 5 Kg adquiridos a R.C. Hartelust BV (Holanda). Los animales permanecieron, durante todo el tiempo del estudio, alojados por parejas en jaulas especialmente diseñadas para tal efecto, ubicadas en habitaciones bajo condiciones habituales y reguladas de temperatura ($21 \pm 2^{\circ}$ C), humedad relativa ($55\% \pm 5$), intercambio de aire (16 veces por hora) y un ciclo circadiano de 12 horas de luz/oscuridad. Diariamente dispusieron de una alimentación planificada y controlada por veterinarios, consistente en: fruta fresca, verdura y pienso especifico para macacos (Masuri Primate diet; Scientific Dietary Services, UK), con ingesta libre de agua. Las condiciones de experimentación y estabulación de los animales fueron supervisados por veterinarios y técnicos especialistas en la salud, cuidado y mantenimiento de primates no humanos. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a las reglas vigentes europeas para la manipulación de animales de experimentación (2010/63/ECC y 2006/65/EC *European Coucil Directives*).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Intoxicación por MPTP

De los 12 animales para nuestro estudio, 3 fueron incluidos en el grupo control y los restantes 9 fueron tratados con MPTP (0.3-0.4 mg/kg). El MPTP hydrochloride (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) fue disuelto en suero salino estéril al 9% para obtener una concentración de 4 mg/mL y administrado por vía intravenosa (i.v.) a través de la vena safena. Previamente a la administración de MPTP, los animales fueron tranquilizados con ketamina (Imalgene®) (10 mg/mL) (i.m.).

En todos los animales la dosis inicial de MPTP se repitió cada 15 días aproximadamente, de acuerdo con la respuesta de cada mono como previamente fue descrito (Barcia y cols., 2004). De los 9 animales tratados con MPTP, 6 de ellos desarrollaron un parkinsonismo estable y fueron tratados diariamente con Madopar® (Ouattara y cols., 2010) (Roche, 100 mg/kg levodopa y 25 mg/kg benserazida; vía oral; ratio 4:1) durante 5 meses hasta que desarrollaron discinesias estables, moderadas y severas. De estos 6 animales discinéticos, a 3 de ellos se les administró posteriormente un inhibidor de la NOS, el 7-NI (Sigma-Aldrich) a una dosis de 25 mg/kg disuelto en aceite de cacahuete de forma subcutánea cada día 45 minutos antes de administrar la levodopa, dejando un tiempo de 2 semanas aproximadamente entre las dosis del inhibidor para que el animal tuviera un periodo de eliminación de fármaco hasta la siguiente dosis. De esta manera, al final obtuvimos los siguientes grupos experimentales:

- Grupo Control (n=3): animales sin tratamiento con MPTP.
- Grupo MPTP puro (n=3): animales tratados con MPTP que desarrollaron signos estables de parkinsonismo. Escala de incapacidad motora < 15.

- Grupo de MPTP + Levodopa (n=3): animales tratados con MPTP que desarrollaron signos estables de parkinsonismo. Además fueron tratados con levodopa hasta que desarrollaron discinesias estables.
- Grupo de MPTP + Levodopa + Inhibidor de la NOS (7-NI) (n=3): animales tratados con MPTP que desarrollaron signos estables de parkinsonismo. Además, fueron tratados con levodopa hasta que desarrollaron discinesias estables y con 7-NI para evaluar su efecto antidiscinético.

MONOS	SEXO	EDAD (años)	PESO SACRIFICIO (Kg)	GRUPO	N° DOSIS	Dosis total MPTP (mg)
C1	Macho	3,6	3,53	CONTROL	0	0
C2	Macho	4,2	3,89	CONTROL	0	0
C3	Macho	2,9	3,22	CONTROL	0	0
M1	Macho	5,2	4,75	MPTP	9	16,15
M2	Macho	4,1	3,47	MPTP	9	18,74
M3	Macho	3,9	4,09	MPTP	15	23,72
M4	Macho	3,1	3,98	MPTP + Levodopa	15	20,29
M5	Macho	4,6	4,91	MPTP + Levodopa	15	26,02
M6	Macho	4,4	4,84	MPTP + Levodopa	15	28,55
M7	Macho	2,9	4,25	MPTP + Levodopa + 7-NI	15	23,37
M8	Macho	3,9	4,35	MPTP + Levodopa + 7-NI	15	24,36
М9	Macho	4,5	3,87	MPTP + Levodopa + 7-NI	3	3,87

Tabla 2: Tabla mostrando los distintos grupos experimentales de los monos, la edad, el peso, elnúmero de dosis de MPTP y la dosis total de MPTP expresada en miligramos.

Esta dosis fue escogida después de una búsqueda bibliográfica en la cual se ha comprobado que el tratamiento a babuinos con este inhibidor no producía daño alguno (Hantraye y cols., 1996).

2.3. ESTUDIO CLÍNICO Y COMPORTAMENTAL

2.3.1. Evaluación motora

Las evaluaciones fueron semanalmente realizadas por los miembros de nuestro grupo de investigación, comenzando las mismas una semana antes del inicio de la intoxicación con MPTP y finalizando al sacrificar a los animales. También se contó sistemáticamente con el criterio de otros investigadores del grupo de trabajo que no conocían la situación particular de cada mono (evaluadores ciegos). El nivel de parkinsonismo fue analizado con una escala motora para primates parkinsonizados con MPTP (Herrero y cols., 1993; Barcia y cols., 2004). Esta escala evalúa 8 parámetros con distinto rango de puntación:

ITEMS A EVALUAR	PUNTUACIÓN
Bradicinesia	Varía de 0 a 3
Freezing o congelamiento	Varía de 0 a 3
Temblor de acción	Varía de 0 a 3
Temblor de reposo	Varía de 0 a 3
Equilibro	Varía de 0 a 3
Alimentación	Varía de 0 a 3
Inestabilidad postural	Varía de 0 a 3
Actividad espontanea	Varía de 0 a 4

Tabla 3: Escala de discapacidad motora para primates no humanos tratados con MPTP (Herreroy cols., 1993; Barcia y cols., 2004).

La puntuación total de esta escala varía entre 0 (normalidad) y 25 (incapacidad máxima). La discapacidad parkinsoniana fue analizada al final de cada sesión para que no interfiriera con los niveles de actividad general.

Video-grabación: todos los animales fueron grabados durante una hora en su estado basal y, posteriormente, en los diferentes estadios de parkinsonismo (siempre, una vez que se estabilizara el síndrome).

No se realizó un análisis cuantitativo de la actividad motora, sino que la grabación sirvió para analizar aspectos generales del estado parkinsoniano de los monos, de sus características cualitativas y de las variaciones o alteraciones posturales. Uno de los macacos tratados con MPTP (M9) experimentó un deterioro motor grave, con alteración del estado general inmediatamente después de la tercera dosis, por lo que consideró a efectos de la inducción del parkinsonismo como MPTP severo ya que disminuyó en el tiempo (Figura 8). Es el único animal en esta situación en todo el estudio. El resto de animales que fueron tratados con MPTP alcanzaron un nivel de deterioro moderado-severo.



Figura 8: Puntuación en la Escala de discapacidad motora (Herrero y cols., 1993) de los 9 monos parkinsonizados con MPTP utilizada en el estudio anatomo-patológico y clínico de los macacos.

90

2.3.2. Evaluación de las discinesias

Una vez que el grado de parkinsonismo fue considerado estable, 6 de los animales fueron tratados con Madopar® hasta que desarrollaron discinesias moderadasseveras en el tiempo. La intensidad de las discinesias fue evaluada, cada 30 minutos de un total de 180 minutos, para cada segmento del cuerpo (cara, cuello, tronco, brazos y piernas) usando una Escala de discapacidad de las discinesias (Hadj Tahar y cols., 2004). Esta escala evalúa las discinesias en 7 áreas anatómicas con distinto rango de puntuación y se resume en la siguiente tabla:

ÁREAS ANATÓMICAS	PUNTUACIÓN
Gestos de la cara	De 0 a 3
Cuello	De 0 a 3
Tronco	De 0 a 3
Extremidad superior derecha	De 0 a 3
Extremidad inferior derecha	De 0 a 3
Extremidad superior izquierda	De 0 a 3
Extremidad inferior izquierda	De 0 a 3

Tabla 4: Escala de discapacidad de las discinesias (Hadj Tahar y cols., 2004) donde se evalúa las siete áreas anatómicas de todos los segmentos del cuerpo evaluadas en los macacos discinéticos.

La puntuación máxima fue de 21 puntos que eran obtenidos por la suma de las puntuaciones de todos los segmentos del cuerpo (derecho e izquierdo). Cada mono fue evaluado varias veces con la escala de discapacidad de las discinesias después de cada administración de levodopa. Se evaluó la media de la intensidad de las discinesias (puntuación), la duración (min) y el área bajo la curva de las mismas (valor relativo). Las discinesias fueron principalmente coreicas pero también fueron observados movimientos distónicos. Las estereotipias no fueron consideradas como discinesias y por tanto no fueron evaluadas. Los monos fueron colocados en una caja de observación especialmente diseñada a tal efecto, con puertas totalmente transparentes, para su grabación y posterior evaluación discinética. En los animales discinéticos y posteriormente en los tratados con el inhibidor 7-NI, las evaluaciones se realizaron antes y después de la administración del mismo. Todas las evaluaciones discinéticas fueron llevadas a cabo por evaluadores *ciegos* que desconocían el grupo experimental en el que se incluían cada uno de los animales y el inicio del tratamiento con levodopa o con el 7-NI, con lo que nos aseguramos de la objetividad en la evaluación.

2.3.3. Análisis estadístico

Las comparaciones fueron realizadas usando una ANOVA de un factor de medidas repetidas seguido del test de Friedman como análisis post. En aquellos parámetros evaluados en relación con el tiempo se procedió al análisis del área bajo la curva aplicando el t-test no pareado. Todos los datos fueron expresados como valor medio del grupo más el error estándar de la media. Un nivel de probabilidad del 5% (P<0.05) o del 1% (P<0.01) fue considerado significativo o muy significativo respectivamente.

2.4. ESTUDIO ANATOMO-PATOLÓGICO.

2.4.1. Obtención y disección de áreas cerebrales

Los animales (n=12) fueron sacrificados con una dosis letal de pentobarbital sódico (100 mg/kg/i.v.) después de la última dosis de levodopa y 7-NI. Previamente se les tranquilizó con una dosis intramuscular de 10 mg/kg de ketamina. La bóveda craneal se extirpó con una gubia y los encéfalos fueron extraídos rápidamente (en menos de 5 minutos), y cortados por la línea media dividiendo en los dos hemisferios. El hemisferio

derecho se bloqueó en el plano coronal mediante cuatro divisiones separadas entre sí 15 mm aproximadamente, quedando el hemicerebelo derecho y la mitad derecha del tronco del encéfalo. Este procedimiento hacía que las secciones obtenidas fueran paralelas al mismo plano, por lo que facilitó el ulterior reconocimiento de las estructuras y la comparación entre monos. A continuación se post-fijaron los distintos bloques (E1: Corteza frontal, E2: Estriado anterior, núcleo accumbens y amígdala, E3: Estriado posterior, tálamo e hipocampo anterior, E4: Tálamo e hipocampo posterior y E5: Corteza Occipital) con PFA al 4% durante 1 semana. Los bloques de cerebro que contenían estriado (E2 y E3) y SN se conservaron en sacarosa al 30% en buffer fosfato salino (PBS) y el resto de bloques se almacenaron en PBS + azida sódica para la conservación del tejido. A continuación, fueron almacenados a -80° C hasta ser cortados. El hemisferio izquierdo se diseccionó también en los mismos 5 bloques que en el hemisferio derecho y se congelaron de manera inmediata. Para ello, se colocaron sobre una superficie metálica plana recubierta de papel de aluminio, que se trasladaba, una vez bien orientado el cerebro, sobre nieve carbónica. Así se obtuvo una congelación rápida de los bloques. Una vez congelados de este modo, se trasladaron a un congelador a -80° C.

Estos bloques se han utilizado para los estudios del metabolismo dopaminérgico mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

2.4.2. Procesamiento histológico

2.4.2.1. Corte de los bloques

Los bloques que contenían el estriado y la SN se cortaron en secciones coronales de 40 µm de grosor con un microtomo de congelación. Los cortes fueron recogidos en 12 series. Una serie fue montada para realizar una tinción de tionina para evidenciar los cuerpos de Nissl, abundantes en el citoplasma neuronal, lo cual nos permitirá distinguir las diferentes regiones anatómicas. Este proceso se llevó a cabo de igual manera para todos los monos. Los cortes de las restantes series se almacenaron a 4° C en PBS junto con azida sódica hasta su uso.

2.4.2.2. Inmunohistoquímica para Tirosina Hidroxilasa (TH) y el transportador de dopamina (DAT)

Se realizaron experimentos de detección inmunohistoquímica de TH y DAT en las zonas del estriado más rostral (ac + 2mm) y del estriado más caudal (ac -4mm) para la identificación de la inervación dopaminérgica en el estriado con microscopía óptica de campo claro. También se analizaron mediante TH los bloques del tronco del encéfalo, donde se encontraba la SN y en el VTA, para identificar los núcleos de neuronas dopaminérgicas que están afectadas en la EP. Se realizó inmunohistoquímica frente a TH en mesencéfalo y estriado, y frente al transportador de dopamina (DAT) en el estriado. La inmunotinción se realizó sobre cortes en flotación de forma seriada. Se utilizaron anticuerpos monoclonales obtenidos de ratón (anti-TH Chemicon MAB5280) y de rata (anti-DAT Chemicon MAB369) en una dilución de 1:1000 para ambos. Se tomó el tejido conservado a 4º C en suspensión de una solución de TBS 0.25 M, con azida sódica al 0.1%. Se procedió a realizar 2 lavados consecutivos de 10 minutos de duración en TBS 0.25 M en agitación a 100 Hz. Para eliminar la peroxidada endógena de los tejidos se procedió a un lavado de 20 minutos en, agitación a 100 Hz, en una solución que contenía: a) H₂O₂ al 30% (Sigma®, H1009) diluido al 3% en TBS 0.25 M, b) metanol al 20%. Tras varios lavados con TBS 0.25 M en agitación se incubaron los tejidos en suero normal de caballo al 10% durante 1 hora a temperatura ambiente con el fin de bloquear los posibles marcajes inespecíficos y mejorar la especificidad del anticuerpo. A continuación, se hicieron 2 lavados con TBS 0.25 M en agitación 100 Hz de 10 minutos cada uno y seguidamente se procedió a la incubación con los anticuerpos específicos para anti-TH y anti-DAT durante 48 horas a 4° C en agitación de 50 Hz. Transcurridas las 48h se lavaron los tejidos 3 veces en TBS 0.25 M durante 10 min en agitación 100 Hz y se incubaron con un segundo anticuerpo biotinilado específico para conejo (Rabbit anti-mouse, Chemicon AP160B para TH y Rabbit anti-rata, Chemicon AP164B para DAT) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación a 100 Hz. Posteriormente, se procedió a realizar 3 lavados de los tejidos en TBS 0.25 M durante 10 minutos cada uno. A continuación, se incubó con el complejo avidita-biotina, durante 1 hora a temperatura ambiente y sin agitación (ABC Elite Vector®). Acabada la incubación se lavaron de nuevo los tejidos 2 veces en TBS 0.25 M durante 10 minutos en agitación de 100 Hz y se hizo un lavado intenso de 10 minutos en TB 0.25 M (Trizma® base al 12% con pH 7.4), y se procedió al revelado. Para ello, se utilizó una solución de diaminobenzidina (DAB) (Sigma®) en 100 mL de TBS 0.25 M.

Se sumergieron los tejidos en la solución de DAB durante un tiempo máximo de 8 minutos hasta observar el viraje colorimétrico a un color pardo. La reacción se detuvo sumergiendo los tejidos en TB 0.25 M. Todas las secciones se incubaron el mismo tiempo en la solución de revelado. A continuación los tejidos se montaron en portas gelatinizados exclusivos para tejido cerebral de mono.

2.4.2.3. Montaje, deshidratación y desengrasado de las secciones histológicas

Las secciones histológicas teñidas y en flotación fueron montadas sobre portaobjetos gelatinizados utilizando tampón fosfato (PB) diluido en agua como medio de montaje. Al menos un día después del montaje, las secciones fueron deshidratadas en soluciones de etanol a concentraciones crecientes y dislipidificadas con xilol, tras lo que se cubrieron con cubre-objetos utilizando DPX como medio óptico y adhesivo.

2.4.2.4 Análisis y cuantificación de los estudios

A) Cuantificación de la densidad de terminales dopaminérgicos en el estriado

Se realizaron las mediciones de las densidades ópticas usando técnicas de análisis de imagen computarizadas, mediante el programa ImageJ (1.41 National Institutes of Health, USA), método ampliamente utilizado en estudios similares (Collier y cols., 2007; Mounayar y cols., 2007; Stephenson y cols., 2007) y que se ha demostrado que es equiparable al contaje de espinas (Villalba y cols., 2009). Las condiciones de este estudio fueron idénticas para el análisis del tejido con inmunotinción de TH y DAT.

Se examinaron 4 cortes coronales de un hemisferio en cada animal, tomando como referencia el corte más rostral en el que la comisura blanca anterior aparece atravesando la línea media. Se seleccionaron tres cortes anteriores y 3 cortes posteriores a dicha referencia separados entre sí por aproximadamente 2500 µm. Los cortes fueron procesados el mismo día y en las mismas condiciones para todos los monos. Se tomaron imágenes del estriado en blanco y negro (8 bits) con una cámara digital (Zeiss Axiocam HRc) acoplada a un sistema de macrofotografía Nikon en idénticas condiciones para todos los animales. Todas las imágenes contenían el estriado completo, incluyendo el caudado, el putamen y el núcleo accumbens. Estas áreas (Caudado, Putamen y Accumbens) fueron delimitadas para el análisis densitométrico como se indica en la Figura 9. Para este análisis, el caudado y el putamen a su vez se diferenciaron en: putamen dorsomedial, dorsolateral, ventromedial y ventrolateral en los cortes de estriado anterior y posterior (Fernagut y cols., 2010). En cada uno de ellos se cuantifico, además, la señal de un cuadrado en el cuerpo calloso que fue considerada como señal de fondo, que era restada en la región estudiada.



ac +2 mm

ac -4 mm

Figura 9: Estructuras anatómicas del estriado mostrando la región más rostral (ac +2mm) y las más caudal (ac -4 mm) con sus respectivas divisiones anatómicas. hCd: Cabeza del Caudado; Put= Putamen; Acb= Nucleo Accumbens; Cd =Caudado.

B) Estimación del número de neuronas inmunoreactivas para TH de los grupos dopaminérgicos del mesencéfalo (SNpc y ATV)

Los experimentos de inmunohistoquímica para TH en el mesencéfalo se realizaron en una sesión empleando tejido de 3 animales por grupo (12 animales en total). De esta forma, se maximizó la uniformidad del procesamiento histológico. Se realizó una estimación estereológica del número total de células inmunorreactivas en la SNpc y el ATV con el objetivo de evaluar la pérdida neuronal dopaminérgica. Para ello, se emplearon secciones de los monos control, monos tratados con MPTP únicamente, monos tratados con MPTP + levodopa y monos tratados con MPTP + levodopa + 7-NI. Estas estimaciones se llevaron a cabo para ambos hemisferios cerebrales. Para ello se utilizo un microscopio Zeiss Axioskop, y el programa ImageJ (versión 14.1, USA). El contaje se realizó de forma uniforme y sistemática para todos los monos por varios

miembros del grupo del laboratorio que desconocían totalmente al tratamiento previo de los mismos.

Para el contaje estereológico, se seleccionaron aleatoriamente 8 secciones coronales de mesencéfalo por animal, siendo el nivel más rostral el que contenía el núcleo del nervio oculomotor (salida del III par craneal) (Figura 10). Una vez trazados los límites de cada región, se identificaron y cuantificaron los perfiles celulares inmunoteñidos, empleando el objetivo microscópico de 40x. Se siguió siempre el mismo criterio, basado en la forma y tamaño de los perfiles y, sobre todo, en la visualización y enfoque de su núcleo a lo largo de todo el espesor del corte (Gundersen y cols., 1988). Sólo se cuantificaron aquellos perfiles que estaban dentro del plano de conteo o aquellos que tocaban el lado superior. Estos criterios se mantuvieron uniformes durante todo el estudio.



Figura 10: Estructuras anatómicas del mesencéfalo de un macaco mostrando la SNpc y la región del la VTA al nivel de la salida del tercer par craneal. SNpc = Sustancia Negra *pars compacta;* VTA = Área tegmental ventral y RN = Núcleo Rojo.

2.5 ESTUDIO DEL METABOLISMO DOPAMINÉRGICO

Todas las determinaciones se realizaron en el Departamento de Farmacología celular y terapéutica de la Universidad de Murcia.

2.5.1 Análisis de catecolaminas y sus metabolitos

niveles de DA, Serotonina (5-HT), Noradrenalina (NA), Ácido Los Homovanílico (HVA) y Ácido 3,4-Dihidroxifenilacético (DOPAC) fueron analizados por HPLC con un detector electroquímico. El HPLC se usa para aislar componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. En el HPLC, el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente a medida que avanzan por la columna dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto en pasar por la columna se denomina tiempo de retención, y se considera una propiedad identificativa característica del compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna, reduciendo así su difusión dentro de la columna y mejorando la resolución de la cromatografía.

2.5.2. Micro-punch para analizar por HPLC

Se procedió a la realización de cortes de 2 secciones de 1500 µm en el criostato (Elsworth y cols., 1998). Un corte fue a nivel del estriado anterior (ac + 2mm) donde se incluían áreas del caudado (dorso medial, dorso lateral, ventro medial y ventro lateral) y áreas del putamen (con las mismas 4 áreas anteriores además del putamen) y del núcleo accumbens. El otro corte fue a nivel del estriado posterior (ac -4 mm) que incluía áreas del caudado (media, lateral y cola del caudado) y áreas del putamen (dorso medial, dorso lateral, ventro medial, ventro lateral). A continuación, de esas secciones, se realizaron con una aguja de 1mm de diámetro, 2 micro-punching para cada área para analizarla por HPLC.

2.5.3 Homogenización

Todos los procesos se realizaron en hielo. Rápidamente, tras el micropunching, las muestras se introdujeron en tubos Eppendorf, pesándolas y conservándolas en hielo seco. Las muestras fueron sonicadas en nitrógeno líquido. Cada tejido fue pesado, depositado en un vial de polipropileno, mantenido en frío, que contenía 1.5 ml de una solución de acido perclórico (0.1 M)-EDTA (2.7 mM), y homogeneizado en un homogeneizador Polytron (Kinematica, Suiza; velocidad 2-3). A continuación, los tejidos se centrifugaron a 15.000 rpm durante 15 min a 4º C, se aspiró el sobrenadante mediante una jeringa y se filtró primero a través de un filtro de 0.45 µm (Millipore, USA), y posteriormente a través de un filtro Ultrafee MC 0.2 (Millipore) empleando una centrífuga refrigerada (15.000 r.p.m., 20 min, 4º C). Por último, se recogió el sobrenadante y se almacenó a -20º C hasta el momento del análisis cromatográfico.

Para el análisis cromatográfico se inyectaron 10 µl de cada muestra en una columna de fase reversa C_{18} (Waters, USA). Para la determinación de NA se empleó un detector electroquímico, fijando una diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo (carbón verificado) y un electrodo de referencia de Ag/Agul (Waters) de +0.65 V. La fase móvil consistió en una mezcla de agua y metanol al 95% (v/v) con acetato sódico (50 mM), ácido cítrico (20 mM), L-octil-sodio sulfonato (3.75 mM), di-n-butilamina (1 mM) y EDTA (0.135 mM), ajustándose el pH a 4.3. La velocidad del flujo fue de 0.9 ml/min y los datos cromatográficos se analizaron con un programa informático Millenium 2010 (Millipore). Los distintos metabolitos dopaminérgicos y catecolaminérgicos se detectaron a unos tiempos de elución entre 2 y 10 min, respectivamente, y se cuantificaron por referencia a patrones de calibración inyectados al inicio y final de cada serie de análisis. Se observaron las referencias lineales entre cantidad de estándar inyectado y la altura del pico de medida. El contenido de DA, DOPAC, 5-HT y NA se expresó en nanogramos por gramo de peso del tejido.

3. ESTUDIO DE LA DENERVACIÓN SIMPÁTICA DEL CORAZÓN DE LOS PRIMATES NO HUMANOS.

3.1. GRUPOS EXPERIMENTALES Y OBTENCIÓN DE TEJIDO CARDÍACO

Empleamos el tejido de 3 grupos experimentales de animales previamente descritos en este manuscrito (ver tabla 2): i) Grupo control, ii) MPTP, iii) MPTP + levodopa.

Al mismo tiempo que extrajimos los cerebros de los monos, también se extrajo de la cavidad torácica el corazón de cada mono el cual fue congelado rápidamente. Para ello, los corazones se colocaron sobre una superficie metálica plana recubierta de papel
de aluminio sobre nieve carbónica y una vez bien orientado el corazón se seccionó a nivel del tabique interventricular. Así, se obtuvo una congelación rápida de los ventrículos. Una vez congelados de este modo, los ventrículos se almacenaron en un congelador a -80° C. Estos corazones se usaron para los estudios de la denervación simpática cardíaca mediante análisis por Western Blot y HPLC.

3.2. ANÁLISIS POR WESTERN-BLOT

Se extrajeron muestras de ambos ventrículos que fueron analizadas por separado. El análisis por Western Blot fue realizado para determinar los niveles de proteínas de Hsp-27 total, Hsp- 27 fosforilada en Ser-82, TH total, TH fosforilada en Ser-40 y la evaluación de la COMT. Las muestras de cada ventrículo fueron colocadas en un tampón homogeneizador [PBS, SDS al 2%, un kit inhibidor de proteasas (Roche, Alemania) y un cocktail inhibidor de fosfatasas (Calbiochem, Alemania)] y homogenizadas durante 1 min antes de de centrifugar a 6000 rpm durante 20 min a 4° C. La concentración total de proteínas fue determinada de forma espectrofotométrica usando el método del BCA (Wiechelman y cols., 1988). La cantidad óptima de proteína fue determinada en experimentos previos mediante geles de carga con contenidos de proteínas en orden creciente (25 a 100 µg) a partir de muestras de los 3 grupos experimentales. Cantidades iguales de proteína (50 µg/calle) de cada muestra fueron cargadas sobre un gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE). Se realizaron las electroforesis y se transfirieron a membranas de poli vinildeno diflouride (PVDF) usando un mini Trans-Blot Electrophoresis Transfer Cell (Bio-Rad Lab., California, USA). Para eliminar la unión inespecífica de los anticuerpos incubamos las membranas con suero de albúmina bovino (BSA) al 1% en tampón tris salino Tween (TBST: 10

mM Tris-HCl, pH=7.6, 150 mM NaCl, y 0.05% Tween 20). Posteriormente, las membranas fueron incubadas a 4° C durante toda la noche usando anticuerpos específicos contra Hsp-27 Total (1:500; sc-1048, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Hsp-27 fosforilada en la Ser-82 (1:400; ab39399, Abcam, UK), TH total (1:1000; Cell Signaling Technology, USA), TH fosforilada en la Ser-40 (1:500; Cell Signalling Technology, USA) y la COMT (1:5000; AB5873, Chemicon International, USA) en TBST con BSA. Después de varios lavados, las membranas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa (anti-cabra sc-2350 para Hsp-27 total; anti-conejo para Hsp-27 fosforilada en la Ser-82, TH total y fosforilada en la Ser-40; y anti-mouse sc-2005 para la COMT a diluciones de 1:5000).

Después de varios lavados, la inmunoreactividad fue detectada con un kit de detección quimioluminiscente/quimioflorescente para Western Blot (ECL Plus, GE Hearthcare, UK) y se visualizó en un dispositivo tipo Typhoon 9410 (GE Healthcare). El *stripping* o desnudamiento de la membrana de los anticuerpos de los blots se llevo a cabo por incubación en un tampón de *stripping* (glicina 25mM y SDS 1%, pH=2) durante 1 hora a 37° C. Usamos anti-β-actina (Cell Signaling, 45 kDa) como gen constitutivo para normalizar los datos de las proteínas analizadas. El ratio de Hsp-27 total/β-actina, Hsp-27 fosforilada/ β-actina, TH fosforilada/ β-actina, TH total/ β-actina y COMT/ β-actina fue representado y analizado. Las cuantificaciones de las proteínas correspondientes a la Hsp-27 total y a la Hsp-27 fosforilada (27-28 kDa), a la TH total y fosforilada (60-62 kDa) y a S-COMT y MB-COMT (25 y 30 kDa) fueron llevadas a cabo por densitometría de bandas (Alphamanager, Nucliber, Madrid). Medimos la densidad óptica integrada en la densidad de las bandas de los blots. Los valores se representaron en unidades de pixeles grises y son proporcionales a la intensidad de cada

píxel durante el tiempo de exposición de la luz a la imagen. La densidad óptica fue normalizada con los valores del fondo (background, sin bandas). Las variaciones relativas entre bandas de muestras experimentales y muestras controles fueron calculadas en la misma imagen.

3.3. ANÁLISIS POR HPLC: ESTIMACIÓN DE NORADRENALINA Y SU METABOLITO NORMETANEFRINA EN EL CORAZÓN DE LOS MONOS PARKINSONIANOS

La noradrenalina y su metabolito normetanefrina fueron determinados por HPLC con detección electroquímica. Cada muestra de tejido cardíaco de cada ventrículos fue pesada, depositada en un vial de polipropileno que contenía 1.5 ml de una solución de acido perclórico (0.1 M)-EDTA (2.7 mM) que se mantuvo en frío, y homogeneizado en un homogeneizador Polytron (Kinematica, Suiza; velocidad 4). A continuación, los homogenizados se centrifugaron a 8.000 rpm, durante 15 min a 4º C, se aspiró el sobrenadante mediante una jeringa de 1 ml y se filtró a través de un filtró de 0.45 µm (Millipore, USA) y centrifugándose de nuevo a 6000 rpm, a 4º C durante 20 minutos y se filtró nuevamente a través de un filtro Ultrafee MC 0.2 (Millipore). Para cada muestra, fueron inyectados 10 μ l en una columna de fase reversa de 5 mm, tipo C₁₈. Para la determinación de NA se empleó un detector electroquímico, fijando una diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo (carbón verificado) y un electrodo de referencia de Ag/AgCl (Waters) de +0.65 V. La fase móvil consistió en una mezcla de agua y metanol al 95% (v/v) con acetato sódico (50 mM), ácido cítrico (20 mM), Loctil-sodio sulfonato di-n-butilamina (3.75)mM), (1mM) ácido y etilendiaminotetracético (EDTA) (0.135 mM), y se ajustó el pH a 4.3. La velocidad del

flujo fue de 0.9 ml/min y los datos cromatográficos se analizaron con un programa informático Millenium 2010 (Millipore). La noradrenalina y su metabolito normetanefrina fueron detectados simultáneamente por el método HPLC de catecolaminas a 2 tiempos de dilución diferentes entre 4.25 y 7.32 min, respectivamente. NA y NMN fueron cuantificadas por curvas de calibración al inicio y al final de cada serie de ensayos. Las relaciones lineales fueron calculadas entre la cantidad del patrón estándar inyectado y el pico de altura máxima de cada compuesto. El contenido de NA y NMN en los ventrículos derecho e izquierdo fue expresado como ng/mg de peso húmedo de tejido.

3.4. ESTADÍSTICA Y ANÁLISIS DE DATOS

Los datos fueron representados como media \pm Error Estándar de la Media. Se utilizó la ANOVA de una vía para analizar la mayoría de los datos. El test *post-hoc* de Newman Keuls o Dunnet fue usado adecuadamente para identificar diferencias entre las medias individuales. Las diferencias con un valor de P<0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas y P<0.01 como muy significativa.

RESULTADOS

1. RESULTADOS EN LOS EXPERIMENTOS EN RATAS

La inyección de 6-OHDA en el estriado produce lesiones de severidad variable. Se obtienen animales con una denervación severa en el 25-50% de los ejemplares, que se define como una depleción de DA estriatal mayor del 90% y un número mayor de 2 vueltas por minuto tras la administración de apomorfina subcutánea. Existió una gran variabilidad interindividual tanto en los niveles de DA estriatal como en la intensidad de la rotación. En los animales tratados con 7-NI se encontraron significativamente mayores concentraciones estriatales de DA, aunque los animales tratados con 7-NI rotaban menos que el resto de los lesionados (Figura 11).

1.1 EL 7-NI REVIERTE EL COMPORTAMIENTO PARKINSONIANO EN RATAS LESIONADAS CON 6-OHDA

El tratamiento con apomorfina induce rotaciones contralaterales en los animales lesionados con 6-OHDA, pero esto no ocurría en los animales controles. Sin embargo, de manera importante, un descenso muy significativo en el número de rotaciones fue vista en los animales lesionados con 6-OHDA y tratados con 7-NI con respecto a aquellos lesionados con 6-OHDA y tratados con el vehículo únicamente (los animales no lesionados no mostraron ninguna rotación (Figura 11, panel A).



Figura 11: (**A**) El número de rotaciones inducidas por apomorfina, 15 días después de la lesión, estuvo disminuido de forma significativa en el grupo del 6-OHDA/7-NI con respecto al grupo 6-OHDA/Veh. (**B**) El EBST se realizó 35 días después de la lesión y estuvo aumentado de forma significativa en los animales lesionados (70%) con respecto los grupos (ANOVA, $F_{(3,19)} = 20.70$, Duncan Test, P<0.001).

El porcentaje de inclinaciones hacia la izquierda medidos por el EBST 5 semanas después de la lesión estriatal en los grupos tratados con 6-OHDA fue significativamente más elevado que en los grupos de ratas controles (Duncan, P<0.05). Los animales del grupo 6-OHDA/Veh mostraban más de un 70% de aumento en el número de inclinaciones comparado con los animales controles. Se observó un ligero descenso, no significativo, en el grupo de ratas tratado con 6-OHDA + 7-NI (Duncan, P>0.05) (Figura 11, panel B).

1.2 EL 7-NI PROTEGE LA VÍA NIGROSTRIATAL EN LAS RATAS LESIONADAS CON 6-OHDA

Los análisis histológicos fueron llevados a cabo en la región dorsolateral del estriado y en la SNpc (en el lado ipsilateral de la lesión). En la región dorsolateral del estriado, se observó la interacción (ANOVA de medidas repetitivas, $F_{(3,16)} = 3.31$, P = 0.047) y un efecto en el factor tratamiento (ANOVA de medidas repetitivas, $F_{(3,16)} = 5.08$, P = 0.012). Los análisis por densitometría nos mostraron una reducción

significativa de las fibras TH⁺ en el estriado lesionado (dorsolateral) de las ratas tratadas con 6-OHDA con respecto a los controles. Sin embargo, se observó un gran efecto protector muy significativo en el grupo de las ratas lesionadas y tratadas con el 7-NI con respecto a los Sham (ANOVA, $F_{(3,19)} = 23.42$, P<0.05) (Figura 12, paneles A-B).



Figura 12: (A) Microfotografías mostrando la distribución de las fibras TH en el estriado dorsolateral en los diferentes grupos experimentales. Las ilustraciones esquemáticas de la derecha muestran las secciones coronales a las que fueron analizadas las fibras TH. (B) Densidad óptica relativa de TH en los diferentes grupos experimentales. Los grupos tratados con sham mostraron una mayor densidad óptica en el estriado dorsolateral que los grupos tratados con 6-OHDA independientemente del tratamiento posterior con 7-NI. (*P<0.05) grupos 6-OHDA vs grupos Sham. (ANOVA, $F_{(3,19)} = 23.42$, P<0.001).

Para el área lesionada, se calculó el grado de la lesión (estimado según la pérdida de terminales dopaminérgicas) con el software informático ImageJ. Los datos fueron expresados en porcentaje del total del área dorsolateral. Grupos Sham/Veh: Sin lesión: 100%. Sham/7-NI: Sin lesión: 100%, 6-OHDA/Veh: Sin lesión: 15,5%; Lesión: 84,5 %

y el grupo 6-OHDA/7-NI: Sin lesión: 37.2%; Lesión: 62,8 %. Además, hubo una correlación negativa muy significativa entre la expresión de las fibras TH⁺ en el estriado y el comportamiento rotacional de los animales (r=-0.869, P<0.001) (datos no mostrados). En la región de la SNpc se observó un descenso significativo del número de neuronas TH⁺ en el grupo de ratas tratadas con 6-OHDA/Veh comparándolo con los grupos Sham/Veh y 6-OHDA/7-NI (ANOVA, $F_{(3,15)} = 3.24$, P<0.05; Duncan, P< 0.05) (Figura 13). En las otras áreas de la SNpc (SN_{lat} y SN_γ) no encontramos ninguna diferencia significativa en el número de neuronas TH⁺ en ningún grupo (ANOVA, $F_{(3,15)} = 3.24$, P>0.05). Estos cambios fueron observados en la SNpc que proyecta hacia el estriado dorsolateral.



Figura 13: (A) Microfotografías mostrando una distribución del número de células en la SNpc en los diferentes grupos experimentales. Las neuronas TH⁺ en el mesencéfalo ventral de las secciones que contenían la porción intra-axial de la salida del tercer par craneal. (B) Densidad de células dopaminérgicas TH⁺ en la SNpc de los diferentes grupos experimentales. Los grupos tratados con 6-OHDA/Veh mostraron un menor número de células dopaminérgicas por 0.5mm² que los grupos control o el grupo 6-OHDA+7-NI. Los datos se expresan como media ±SEM. *P<0.05 (ANOVA, F_(3,15) = 3.24, Duncan, P< 0.05).

1.3 EL 7-NI REDUCE LA EXPRESIÓN ESTRIATAL DE nNOS EN RATAS LESIONADAS CON 6-OHDA

El efecto del factor tratamiento fue observado (ANOVA de medidas repetitivas, $F_{(3,15)}=3,52$, P=0.041). El número de neuronas nNOS⁺ en el grupo 6-OHDA/Vehiculo aumenta en el estriado dorsolateral lesionado comparado con los grupos Sham, pero esto fue revertido tras el tratamiento con 7-NI (ANOVA, $F_{(3,16)}=6.63$, P<0.005) (Figura 14, panel A-B). De manera importante, la densidad de las células nNOS⁺ fue correlacionada de manera negativa con la densidad de las fibras TH⁺ (Figura19).



Figura 14: (A) Microfotografías mostrando las neuronas $nNOS^+$ en el estriado dorsolateral. (B) Densidad de células $nNOS^+$ en el estriado dorsolateral. Se observó un aumento significativo de las neuronas $nNOS^+$ en el grupo 6-OHDA/Veh con respecto a los animales sham. ANOVA de medidas repetitivas, $F_{(3,15)}=3,52$, P=0.041 (*P<0.05 6-OHDA/Veh vs resto de grupos; #P<0.05 6-OHDA/7-NI vs. Sham/Veh).

1.4. EL 7-NI REDUCE LA FOSFORILACIÓN DE LA DARPP-32 EN LAS RATAS LESIONADAS CON 6-OHDA

Para determinar con precisión el aumento en el número de células DARPP-32⁺ en los estados fisiopatológicos en el cerebro *post-mortem*, es importante establecer un control positivo para la cuantificación en un área del cerebro que no esté afectada por la lesión. Para nuestro estudio el control positivo que empleamos fue el córtex motor, inmediatamente por encima del estriado dorsolateral (Figura 15, paneles 1-2) (Ouimet y cols., 1984; Ouimet y cols., 1998). Empleamos la tinción del córtex motor como el área de control para el análisis tanto de la proteína DARPP-32 total, como de la proteína DARPP-32 fosforilada en la Thr-34.



Figura 15: Microfotográficas mostrando las neuronas DARPP-32⁺ en el córtex motor (cabezas de flechas blancas) y en caudado putamen (DL). Para determinar de manera exacta el número de células DARPP-32⁺ y DARPP-32 fosforilada establecimos un control positivo en la zona del córtex motor (justo por encima del estriado) en secciones todas las que fueron analizadas para dichos marcadores.

El análisis con la DARPP-32 fosforilada en la THr-34 mostraba una interacción entre ambos factores (ANOVA de medias repetidas, $F_{(3,16)} = 5.15$, P = 0.011). En el estriado lesionado dorsolateral, la cuantificación del número de células DARPP-32 fosforilada reveló un aumento en la expresión de las mismas en el grupo lesionado con la 6-OHDA/Veh, que fue significativamente revertido con el inhibidor de la NOSn (ANOVA, $F_{(3,16)} = 4.62$, P <0.01). (Figura 16).



Figura 16: Microfotográficas mostrando las neuronas DARPP-32⁺ fosforiladas en el estriado dorsolateral. Se observó un aumento significativo de las neuronas DARPP-32⁺ fosforiladas en el grupo 6-OHDA/Veh comparado con los otros grupos experimentales. Test de ANOVA de medias repetidas y un *post-hoc* de Newman-Keuls. * P<0.05. Grupo 6-OHDA vs resto de los grupos de animales.

En cuanto al número de neuronas totales DARPP-32⁺ se observó un efecto opuesto. Existía una interacción entre ambos factores (ANOVA de medias repetidas, $F_{(3,16)} = 21,53$, P<0.001), y un efecto del tratamiento (ANOVA de medidas repetidas, $F_{(3,16)} = 19.89$, P<0.001). En el estriado lesionado dorsolateral, la células DARPP-32⁺ totales disminuyeron en el grupo 6-OHDA/Veh con respecto a los grupos controles, mientras que se observó un aumento significativo en la expresión de esta proteína en los animales pertenecientes al grupo 6-OHDA/7-NI con respecto a las grupos sham y al grupo 6-OHDA/Veh (ANOVA, $F_{(3,17)} = 27.4$, P<0.001; Duncan, P<0.05) (Figura 17).



Figura 17: (A) Microfotografías mostrando la expresión de DARPP-32 total en neuronas del estriado dorsolateral de animales control e intoxicados con 6-OHDA. (B) Se observó un aumento significativo de las neuronas DARPP-32⁺ en el grupo 6-OHDA/7-NI con respecto a los animales sham. También se observó un descenso significativo en el grupo 6-OHDA/Veh con respecto a los grupos controles. (ANOVA, $F_{(3,17)} = 27.4$, P<0.001; Duncan, *P<0.05).

Además, se observó una correlación entre los niveles de la DARPP-32 fosforilada y la DARPP-32 total lo cual sugiere la consumición de la DARPP-32 total fosoforilada por mecanismos que envuelven al NO (Figura 19). Este podría está involucrado en varios mecanismos que tienen lugar en las MSN vía PKG, esta proteína fosforila a la DARPP-32 total y la proteína vuelve a su forma fosforilada (DARPP-32 fosforilada en la Thr-34) (Figura 18, panel A). Además, observamos una correlación positiva muy significativa entre la NOSn y la expresión de la DARPP-32 fosforilada en el estriado dorsolateral (Figura 18, panel B). Estos resultados demuestran una asociación del estado de fosforilación de la DARPP-32 y el número de células de NOSn⁺ en el estriado.



Figura 18: (A) Esquema donde se muestra la acción del NO en las MSNs, donde activa la PKG y mediante esta vía (sGC) fosforila a la DARPP-32 en la Thr-34. (B) Correlación positiva entre la DARPP-32 fosforilada vs. nNOS, dónde un aumento de la expresión de la DARPP-32 fosforilada está asociado con un aumento de las neuronas nNOS⁺ ($r^2 = 0.6552$, P = 0.011).



Figura 19: (A) Correlación negativa entre la TH vs. nNOS, dónde un aumento de la expresión de la TH está asociado con una disminución de las neuronas nNOS⁺ (r^2 = 0.745, P=0.01). (B) Correlación negativa entre la DARPP-32 total vs. DARPP-32 fosforilada (r^2 =0.565, P=0.04).

1.5 EL 7-NI REDUCE LOS NIVELES DE DARPP-32 FOSFORILADA Y AUMENTA LOS DE DARPP-32 TOTAL EN RATAS LESIONADAS CON 6-OHDA

Los niveles de proteínas de la DARPP-32 total y la DARPP-32 fosforilada fueron analizados por Western blot en el estriado de ratas controles, de animales tratados con 6-OHDA/Vehículo y el inhibidor del óxido nítrico, 7-NI. Las bandas de ambas proteínas (total y fosforilada) fueron localizadas a ~ 32 kDa. En ratas tratadas con 6-OHDA/7-NI, la DARPP-32 total aumentó de forma significativa con respecto al grupo 6-OHDA/Veh (ANOVA, *post-hoc* Newman Keuls, P<0.01) (Figura 20).



Figura 20: Los valores normalizados con β -Actina para la DARPP-32 total fueron comparados con aquellos valores de los grupos experimentales (Sham y lesionados con 6-OHDA). ** significativo con respecto a los grupos Sham. *** muy significativo con respecto entre los grupos tratados con 6-OHDA (ANOVA, *post-hoc* Newman Keuls, P<0.01).

Resultados similares fueron obtenidos por inmunohistoquímica. El efecto opuesto fue observado en la DARPP-32 fosforilada: esta proteína aumenta de forma importante en el grupo 6-OHDA/Vehículo con respecto a los animales controles y el grupo de animales tratados con 6-OHDA y 7-NI (ANOVA de una vía, *post-hoc* Newman-Keuls, P<0.01). (Figura 21). Estos datos son coincidentes con aquellos obtenidos por inmunohistoquímica dando más consistencia a nuestros resultados.



Figura 21: Valores normalizados con β -Actina para la DARPP-32 fosforilada fueron comparados con aquellos valores de los grupos experimentales (Shams y lesionados con 6-OHDA). ** P<0.01 Comparando el grupo 6-OHDA/Veh con respecto al resto de grupos. (ANOVA, *post-hoc* Newman Keuls, P<0.01).

2. RESULTADOS EN LOS EXPERIMENTOS EN MONOS

2.1. ACTIVIDAD MOTORA DE LOS ANIMALES

Para considerar a un mono en un determinado grupo se esperó al menos un mes, para que tuviera un estado motor estable. En función de estas evaluaciones, los monos fueron clasificados de la siguiente manera, acorde a su puntación en la escala de discapacidad motora:

- Grupo Control (n=3): nunca tratados con MPTP y se comportaban de manera normal. La puntuación en la escala motora (Herrero y cols., 1993) fue de 0 y la dosis total de MPTP también fue de 0.
- Grupo MPTP (M1-M3): aquellos monos que, tras finalizar el tratamiento con MPTP y el periodo de estabilización, presentaban síntomas y signos parkinsonianos claros, graves y estables. La puntuación en la escala de discapacidad motora fue de 12,9 ± 0,9 (Figura 22). La dosis total de MPTP fue de 16.1 ± 7.2 mg (Tabla 2).
- Grupo MPTP + L-DOPA (M4-M6): monos que, tras finalizar el tratamiento con MPTP y el periodo de estabilización, presentaban síntomas y signos parkinsonianos claros y estables. La puntuación en la escala de discapacidad motora de estos monos fue de 13,5 ± 0,7 (Figura 22). La cantidad de MPTP que recibieron fue de 20,1 ± 8,25 mg (Tabla 2).
- Grupo MPTP + L-DOPA + 7-NI (M7-M9): monos que, tras finalizar el tratamiento con MPTP y el periodo de estabilización, presentaban síntomas y signos parkinsonianos evidentes y estables en el tiempo. La puntuación en la escala de discapacidad motora fue de 14,01 ± 0,6 (Figura 22). La cantidad total de MPTP que recibieron los monos fue de 17,2 ± 11,5 mg. (Tabla 2).



Figura 22: Evaluación de la función motora durante la intoxicación con MPTP de los monos utilizados para el estudio anatomo-patológico. Este gráfico representa la media de la puntación de la escala motora (Herrero y cols., 1993) para cada mono y su evolución desde el máximo estado parkinsoniano hasta el estado final estable en el momento del comienzo del tratamiento con levodopa.

2.2 RESULTADOS DEL ESTUDIO CLÍNICO DE LAS DISCINESIAS CON EL INHIBIDOR 7-NI

El efecto anti-parkinsoniano de la levodopa fue similar en los 6 monos, tras su administración su puntuación en la escala de discapacidad motora, comparada con la obtenida cuando alcanzó su estado estable parkinsoniano, mejoró de forma significativa. Sus perfiles discinéticos mostraban un pico de dosis máximo a los 80-100 minutos finalizando a los 190-200 minutos (Figura 23, panel A). La co-administración del 7-NI junto con la levodopa a los tras macacacos (M1, M2 y M3) preservó el efecto beneficioso del tratamiento con levodopa sin ninguna diferencia significativa en la escala de discapacidad motora (P>0.05). El inhibidor también disminuyó de manera importante la intensidad y la duración de las discinesias, reduciendo el perfil discinético en más del 50% (Figura 23, panel B-C). Los análisis de la evolución temporal de las

discinesias y el área bajo la curva (AUC) mostraban que el 7-NI reducía muy significativamente las discinesias inducidas por L-DOPA (LIDs) (P<0.001) (Figura 23, panel D).



Figura 23: Cada columna representa los datos de cada mono seleccionados para el estudio clínico de las discinesias (M1, M2 y M3). (A) Perfil discinético de cada mono con y sin el tratamiento del inhibidor 7-NI. (B) Media de la intensidad de las discinesias inducidas por L-DOPA. (C) Duración de las discinesias en minutos y (D) el área bajo la curva (AUC) de cada perfil discinético de cada mono. * significativo con respecto al grupo a los monos que han sido tratados con el inhibidor, 7-NI.

Por su interés clínico desglosamos los resultados y la progresión comportamental del parkinsonismo en cada uno de los tres primates discinéticos tratados con 7-NI.

MONO 1 (M1)

Recibió 9 inyecciones de MPTP durante un periodo de 4.5 meses, desarrollando una bradicinesia significativa, rigidez y freezing después de la 3ª inyección de MPTP. Después de la 5^a inyección apareció el temblor en reposo en las extremidades superiores con distonías transitorias en las extremidades inferiores y en el área oromandibular que desapareció después de la 8ª inyección de MPTP. Después de 4 meses del tratamiento con levodopa desarrolló discinesias estables en el tronco, estereotipias en las manos, posturas distónicas de las extremidades inferiores y en la cola. Los movimientos coreicos rápidos aparecieron 10 minutos después de la administración de levodopa acabando en 200 minutos, y alcanzando el pico de dosis a los 110-120 minutos con una intensidad de 17/21. Desde



Figura 24: Perfil, intensidad, duración y área bajo la curva del mono 1

la primera administración de 7-NI, el perfil discinético cambió llegando a ser significativamente más breve (finalizando a los 145 min) (P<0.001) (Figura 24, panel A-C) y alcanzando el pico de dosis a los 60 minutos con una puntuación de 6/21 (P<0.001) (Figura 24, panel B).

MONO 2 (M2)

Este mono también recibió 9 inyecciones de MPTP durante 4.5 meses. Desarrolló rigidez, bradicinesia severa y un leve temblor en las extremidades superiores y ocasionalmente en la cabeza. Observamos en varias ocasiones, tras la administración de MPTP, movimientos anormales de la boca después de las inyecciones (en forma de masticar chicle). Después de 4 meses de tratamiento con levodopa, hubo movimientos coreicos estables y repetitivos por todo el cuerpo, más evidentes de manera especial en las extremidades inferiores, que aparecían a los 10-15 minutos después de la administración con levodopa. El período discinético acabó a los 200 minutos, alcanzando el pico de dosis máximo a los 120 minutos con una intensidad de 14/21. (Figura 25). Desde la primera administración con 7-NI, la duración de las discinesias fue más corta (finalizando a los 145 min) (P<0.001) (Figura 25) alcanzando el pico de dosis a los 60 minutos



Figura 25: Perfil, intensidad, duración y área bajo la curva del mono 2

con una puntuación máxima de 5/21 (P<0.001) (Figura 25).

MONO 3 (M3)

Este mono recibió 15 inyecciones de MPTP durante un periodo de 6 meses. Se observaron algunos síntomas vegetativos, inmediatamente después de cada dosis de MPTP, pero el animal volvía a su estado basal dentro de las 24 horas posteriores a la administración. Después de la 4ª dosis de MPTP el animal mostraba un comportamiento rotacional. Se observó bradicinesia, rigidez, freezing y temblor en las extremidades superiores junto con distonías oro-mandibulares que aparecieron después de la 7^a dosis de MPTP. Después de 4 meses de tratamiento con levodopa aparecieron movimientos coreicos, estables en el tiempo, de todo el cuerpo completo, especialmente rápidos en las extremidades,





con los dedos retorcidos o girados. Esto aparecía 10-15 minutos después de la administración con L-DOPA acabando a los 200 minutos, y alcanzando el pico de dosis máximo a los 90 minutos (Intensidad 14/21, Figura 26). Desde la 1ª administración de 7-NI, la duración de las discinesias fue más corta (finalizando a los 150 minutos) (P<0.001) (Figura 26) alcanzando el pico de dosis a los 60 minutos con una puntuación máxima de 8/21 (P<0.001) (Figura 26).

2.3. HISTOQUÍMICA

2.3.1. Neuronas TH⁺ del mesencéfalo: Grupos dopaminérgicos A9 Y A10

Los grupos dopaminérgicos del mesencéfalo son los que contienen un mayor número de neuronas dopaminérgicas los que han recibido tradicionalmente más atención en la EP. Por ello consideramos interesante su análisis en nuestro modelo de parkinsonismo experimental con inducción de discinesias. Para verificar la extensión de la lesión producida por el MPTP, se cuantificó el número de neuronas TH⁺ en todos los monos utilizados en este estudio.

2.3.1.1 Grupo A9: Sustancia Negra pars compacta

El grupo A9 está formado por las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Las neuronas más rostrales aparecen en la región del hipocampo, núcleo que se va engrosando en niveles intermedios y se va haciendo cada vez más lateral hasta desaparecer, en niveles más caudales. Realizamos la cuantificación de las neuronas TH⁺ para nuestros grupos experimentales (Figura 27).



A9 (Sustancia Negra pars compacta)

Figura 27: Numero de neuronas dopaminérgicas (TH⁺) en el grupo A9 (Sustancia Negra *pars compacta*) en los diferentes grupos de monos: Control, MPTP, MPTP + L-DOPA y MPTP + L-DOPA + 7-NI. *** muy significativo respecto al grupo control (P<0.001). ANOVA una vía, P<0.01, *post-hoc* Newman-Keuls.

Las neuronas de A9 fueron las más grandes con respecto a las de la VTA, y presentaban una alta inmunoreactividad para TH. El número de neuronas normalmente presentes en este grupo celular fue claramente mayor que en el área de la VTA. Se observó una pérdida significativa del número de neuronas de la SNpc en todos los grupos tratados con MPTP respecto al grupo control.

La cuantificación del número de células y el análisis estadístico para el grupo de monos discinéticos tratado con el inhibidor 7-NI, mostró que no había diferencias significativas con respecto a los grupos de monos discinéticos no tratados y los tratados con MPTP únicamente. Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de monos tratados con MPTP y los tratados con MPTP + levodopa.

2.3.1.2. Grupo A10: Área Tegmental Ventral (VTA)

No existe un límite preciso entre la SNpc y el VTA, por lo que se estableció como límite arbitrario una línea vertical antero-posterior (ventrodorsal) que pasaba por la mitad del núcleo rojo (Figura 28). Las neuronas TH⁺ de la VTA eran más pequeñas que las de la SNpc, y algunas de ellas presentaban una forma más alargada, así como núcleos más alargados. En este grupo de neuronas del área A10 se observó una disminución leve en los todos grupos tratados con MPTP (tanto con levodopa como con 7-NI) con respecto al grupo control sin llegar a ser estadísticamente significativa (Figura 29).



Figura 28: Delimitación de las regiones para el contaje de neuronas que expresan TH⁺ en las secciones de mesencéfalo (SNpc y VTA) utilizadas a nivel de la línea vertical antero-posterior que pasa por la mitad del núcleo rojo.



Figura 29: Número de neuronas dopaminérgicas (TH⁺) en el área A10 (Área Tegmental Ventral) en los diferentes grupos de monos: Control, MPTP, MPTP + levodopa y MPTP + levodopa + 7-NI. No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales. (ANOVA de una vía, P<0.01).

2.3.2. Medida de la densidad óptica de TH Y DAT en el estriado

2.3.2.1 Medida de la densidad óptica en estriado anterior

En el estriado anterior (cabeza del caudado y sus diversas divisiones: DM, DL, VL y VM), se observó una disminución muy significativa progresiva y similar de la expresión de TH y DAT en todos los grupos de monos tratados con MPTP respecto del grupo control (P<0.001) (Figuras 30 y 31). Esta disminución de la expresión no fue revertida por el tratamiento con 7-NI, ni con levodopa, ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con MPTP, tanto con levodopa como con el inhibidor del óxido nítrico (7-NI).



Figura 30: Medida de la densidad óptica (O.D.) en la cabeza del caudado para fibras inmunoreactivas TH⁺. Se analizaron los grupos control, MPTP, MPTP + levodopa y MPTP + levodopa + 7-NI. (** P<0.01 y *** P<0.001) expresan el grado de significatividad obtenido al comparar los valores de cada uno de los grupos respecto al grupo de monos control. hCd = cabeza del caudado; ac = comisura anterior. (ANOVA una vía, P<0.01, *post-hoc* Newman-Keuls).



Figura 31: Medida de la densidad óptica (O.D.) en la cabeza del caudado para el transportador de dopamina (DAT) Se analizaron los grupos control, MPTP, MPTP + levodopa y MPTP + levodopa + 7-NI. (** P<0.01 y *** P<0.001) expresan el grado de significatividad obtenido al comparar los valores de cada uno de los grupos respecto al grupo de monos control. hCd = cabeza del caudado; ac = comisura anterior. (ANOVA una vía, P<0.01, *post-hoc* Newman-Keuls).

En el putamen de las zonas dorsales (DL y DM) había una disminución muy significativa (P<0.001) progresiva y similar de la inmunotinción para TH y para DAT en todos los grupos tratados con MPTP con respecto al grupo control. En relación con el efecto de 7-NI en la preservación de fibras dopaminérgicas TH⁺, solamente en la zona ventro-medial (VM), se observaban diferencias significativas entre el grupo de monos tratados con MPTP + levodopa y el grupo tratado con MPTP + levodopa + 7-NI (P<0.01) (Figura 32).



Figura 32: Medida de la densidad óptica (O.D) en el putamen del estriado anterior para fibras inmunoreactivas TH⁺. Se analizaron los grupos control, MPTP, MPTP + levodopa y MPTP + levodopa + 7-NI. (** P<0.01 y *** P<0.001) expresan el grado de significatividad obtenido al comparar los valores de cada uno de los grupos respecto al grupo de monos control. Put = Putamen; ac = comisura anterior. (ANOVA una vía, P<0.01, *post-hoc* Newman-Keuls).



Figura 33: Medida de la densidad óptica (O.D.) en el putamen del estriado anterior para el transportador de dopamina (DAT). Se analizaron los grupos control, MPTP, MPTP + levodopa y MPTP + levodopa + 7-NI. (** P<0.01 y *** P<0.001) expresan el grado de significatividad obtenido al comparar los valores de cada uno de los grupos respecto al grupo de monos control. Put = Putamen; ac = comisura anterior. (ANOVA una vía, P<0.01, *post-hoc* Newman-Keuls).

2.3.2.2 Medida de la densidad óptica en estriado posterior

En el caudado posterior, se observó una disminución muy significativa progresiva y similar de la inmunotinción para TH y DAT en todos los grupos de monos tratados con MPTP respecto del grupo control (P<0.001) (Figuras 34 y 35). No se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con MPTP, tanto con levodopa como con el inhibidor del óxido nítrico (7-NI).



Figura 34: Medida de la densidad óptica (O.D.) en el cuerpo del caudado del estriado posterior para fibras inmunoreactivas TH^+ . Se analizaron los grupos control, MPTP, MPTP + levodopa y MPTP + levodopa + 7-NI. *** P<0.001) expresa el grado de significatividad respecto al grupo de monos control. BCd = cuerpo del caudado; Put = Putamen; ac = comisura anterior. (ANOVA una vía, P<0.01, *post-hoc* Newman-Keuls).



Figura 35: Medida de la densidad óptica (O.D.) en el cuerpo del caudado del estriado posterior para el Transportador de Dopamina (DAT). Se analizaron los grupos control, MPTP, MPTP + levodopa y MPTP + levodopa + 7-NI. *** P<0.001) expresa el grado de significatividad respecto al grupo de monos control. BCd = cuerpo del caudado del caudado; Put= Putamen; ac = comisura anterior. (ANOVA una vía, P<0.01, *post-hoc* Newman-Keuls).

En el putamen de las zonas dorsales (DL y DM) había una disminución significativa y muy similar de la inmunotinción para TH y DAT en todos los grupos tratados con MPTP. En cambio, en las fibras TH⁺ del grupo de monos tratados con el 7-NI, solamente en la zona ventro-medial (VM) y en la dorso-medial (DM). A pesar de que en los grupos tratados con 7-NI existe una tendencia a la recuperación de las fibras TH⁺ en las zonas ventromediales y dorsomediales del putamen, este aumento no era significativo y por tanto no atribuible al efecto del fármaco (Figura 34). Asimismo, este

efecto no se observa en el gráfico de la densidad óptica para la DAT en las diversas áreas de estudio (Figura 35).

En resumen, el área más afectada en los monos era el estriado posterior donde estaban muy afectadas las áreas del caudado y putamen siendo el núcleo accumbens la zona donde las fibras dopaminérgicas estaban más preservadas.

2.4 CORRELACIONES DEL ESTADO MOTOR-HISTOLOGÍA

El estado motor evaluado mediante la escala de Herrero y colaboradores (1993) correlacionó de forma muy significativa con la pérdida de neuronas TH⁺ en la SNpc (A9) y con la disminución de los niveles de D.O. para TH en el estriado anterior. En la cabeza del caudado (Figura 36, panel A; P<0.001; r²= 0.8578) y en el putamen (Figura 36, panel B; P<0.001; r²= 0.8369). Para el DAT en la cabeza del caudado tenemos (Figura 36, panel C; P<0.001; r²= 0.7096) y en el putamen (Figura 36, panel D; P<0.001; r²= 0.8404) en las diferentes áreas del caudado y el putamen.



Figura 36: (**A-B**) Correlaciones entre el estado motor evaluado con la escala de discapacidad motora y la densidad óptica (D.O.) de la Tirosina Hidroxilasa (TH) y el (**C-D**) Transportador de Dopamina (DAT) en la cabeza del caudado y en el putamen del estriado anterior de todos los monos de nuestro estudio.

También correlacionó de forma muy significativa la pérdida de neuronas TH⁺ en la SNpc (A9) con la disminución de los niveles de D.O. para TH en el estriado posterior. En el cuerpo del caudado (Figura 37, panel A; P<0.001; r²= 0.8578) y en el putamen (Figura 37, panel B; P<0.001; r²= 0.8369). Para el DAT en el cuerpo del caudado tenemos (Figura 37, panel C; P<0.001; r²= 0.7096) y en el putamen (Figura 37, panel D; P<0.001; r²= 0.8404) en las diferentes áreas del caudado y el putamen.


Figura 37: (**A-B**) Correlaciones entre el estado motor evaluado con la escala de discapacidad motora y la densidad óptica (D.O.) de la Tirosina Hidroxilasa (TH) y el (**C-D**) Transportador de Dopamina (DAT) en la cabeza del caudado y en el putamen del estriado posterior de todos los monos.

También encontramos una correlación negativa muy significativa con la pérdida de neuronas TH⁺ en la SNpc (A9) y la escala de discapacidad motora (P<0.001; r^2 = 0.8458) (Figura 37). El número de neuronas TH⁺ en la región del VTA no correlacionó con la escala motora (P=0.2997; r^2 =0.1068) (Figura 38).



Figura 38: Correlación motora entre el número de neuronas TH⁺ en la Sustancia Negra *pars compacta* y la escala de discapacidad motora. P<0.001; r²= 0.8458.



CORRELACIÓN MOTORA - Neuronas TH⁺ A10

Figura 39: Correlación motora entre el número de neuronas TH^+ en el área tegmental ventral (VTA) y la escala de discapacidad motora. P=0.2997; r²=0.1068.

La disminución del número de neuronas de la SNpc correlaciona a su vez con la disminución de los valores de D.O para TH en la cabeza del caudado anterior (Figura 40, panel A; P<0.001; r^2 = 0.9518) y en el putamen anterior (Figura 40, panel B; P<0.001; r^2 = 0.8783).

Para el DAT en la cabeza del caudado tenemos (Figura 40, panel C; P<0.001; r^2 = 0.8892) y en el putamen anterior (Figura 40, panel D; P<0.001; r^2 = 0.9186).



Figura 40: (**A-B**) Correlaciones entre el número de neuronas TH⁺ en la SNpc y la densidad óptica (DO) para Tirosina Hidroxilasa (TH) y para el (**C-D**) Transportador de Dopamina (DAT) en el estriado anterior de todos los monos.

La disminución del número de neuronas de la SNpc correlaciona a su vez con la disminución de los valores de DO para TH en el cuerpo del caudado posterior (Figura 41, panel A; P<0.001; r^2 = 0.8897) y en el putamen posterior (Figura 41, panel B; P<0.001; r^2 = 0.8916). Las correlaciones entre el número de neuronas en la SNpc y la densidad óptica para DAT fueron estadísticamente significativas tanto en la cabeza del caudado (Figura 41, panel C; P<0.001; r^2 = 0.8910) como en el putamen (Figura 41, panel D; P<0.001; r^2 = 0.9128) también en la zona del estriado posterior.



Figura 41: (**A-B**) Correlaciones entre el número de neuronas TH⁺ en la SNpc y la densidad óptica (DO) para Tirosina Hidroxilasa (TH) y para el (**C-D**) Transportador de Dopamina (DAT) del estriado posterior de todos los monos.

A modo de resumen se observó que tanto en el caudado como en el putamen de las zonas más anteriores y posteriores existen unas correlaciones muy significativas con respecto a la escala de discapacidad motora. Esto nos indica que todos los monos tratados con MPTP presentan un grado de afectación de la vía nigroestriatal que correlaciona con sus alteraciones comportamentales.

3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA DENERVACIÓN SIMPÁTICA DEL CORAZÓN DE LOS MONOS PARKINSONIANOS.

3.1. EFECTOS DE LOS MONOS TRATADOS CON MPTP Y LEVODOPA SOBRE LA EXPRESIÓN DE HSP-27 TOTAL Y FOSFORILADA EN EL CORAZÓN DE LOS MONOS.

Las proteínas Hsp-27 y Hsp-27 fosforilada en la Ser-82 del ventrículo derecho y del izquierdo fueron analizadas por Western blot en monos controles y en animales tratados con MPTP y con MPTP + levodopa. Las bandas que se detectaron para la proteína Hsp-27 se localizaron a ~ 27 kDa (Figura 41). En animales tratados que desarrollaron un parkinsonismo (tras tratamiento con MPTP) y tras tratamiento con MPTP + levodopa el nivel de la Hsp-27 total fue similar en el ventrículo derecho y en el izquierdo al observado en los grupos controles. Sin embargo, el análisis de los niveles de la proteína Hsp-27 fosforilada mostró diferencias significativas en los 2 ventrículos. En el ventrículo derecho observamos diferencias significativas cuando comparamos el grupo de monos con MPTP + levodopa con respecto a los otros grupos (Controles y MPTP únicamente, P<0.01). En el ventrículo izquierdo también observamos diferencias significativas cuando comparamos los monos del grupo MPTP + levodopa con respecto a los otros grupos (P<0.01) (Figura 42).



Figura 42: Hsp-27 total y fosforilada fue detectada en una banda localizada a 27 kDa. Los niveles de Hsp-27 fosforilada en Ser-82 en el grupo de animales tratados con MPTP+L-DOPA fueron diferentes en ambos ventrículos comparándolos con los otros grupos. **P<0.01 grupo MPTP+L-DOPA *vs.* otros grupos.

3.2. EFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA TH TOTAL Y LA TH FOSFORILADA EN EL CORAZÓN DE MONOS TRATADOS CON MPTP Y LEVODOPA.

Llevamos a cabo el análisis de la TH total (banda localizada a 62 kDa) y de su forma fosforilada en la Ser-40 (banda localizada a 65 kDa) en el ventrículo derecho e izquierdo para determinar el efecto de la severidad del parkinsonismo en los monos tratados con MPTP y con MPTP más levodopa. En el ventrículo izquierdo observamos una disminución significativa de la TH total en el grupo de monos tratados con MPTP con respecto a los controles (P<0.01), la cual era mayor y estadísticamente significativa frente a ambos grupos tras el tratamiento con levodopa (P<0.001). En el ventrículo derecho la dinámica de expresión de la TH total sigue una tendencia similar a lo observado para el ventrículo izquierdo aunque no es estadísticamente significativo. Tras analizar la TH total, examinamos también su forma fosforilada en la Ser-40 la cual igualmente se expresa en el corazón del monos. En el ventrículo derecho, observamos un aumento significativo de la forma fosforilada en los monos tratados con MPTP con respecto al resto de los grupos (P<0.01) (Figura 43). En el ventrículo izquierdo, también encontramos un aumento muy significativo de la TH fosforilada en la Ser-40 tras el tratamiento con MPTP con respecto al grupo control de animales (P<0.001), el cual también era significativo aunque en menor medida (P<0.01) tras el posterior tratamiento con levodopa (Figura 43).



Figura 43: La TH total y la TH fosforilada en la Ser-40 fueron detectadas en una banda localizada a 65 kDa. Los niveles de expresión de la TH total fueron significativos en el ventrículo izquierdo mientras que la expresión de la forma fosforilada varió en ambos ventrículos con el tratamiento. (** P<0.01 y *** P<0.001 expresa el nivel de significatividad estadística en el análisis de los grupos tratados frente al grupo control; * P<0.05 expresa la diferencia significativa observada entre el grupo tratado con MPTP y el grupo tratado con MPTP + levodopa.

3.3. ACTIVACIÓN DE LA COMT DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON MPTP Y LEVODOPA EN AMBOS VENTRÍCULOS CARDÍACOS.

La expresión de la proteína catecol-o-metiltransferasa (COMT) se realizó por Western Blot. Identificamos la presencia de dos bandas aproximadamente de 30 y 25 kDa, respectivamente. Basándonos en los tamaños y en la abundancia relativa, la subunidad unida a la membrana (MB-COMT) es la banda de 30 kDa y la banda de 25 kDa representan la subunidad soluble (S-COMT) (Figura 44). Los análisis cuantitativos mostraron un incremento no significativo en la expresión de la subunidad S-COMT en los 2 ventrículos del corazón de los monos. En cambio, observamos un aumento significativo en la expresión de la subunidad MB-COMT en el ventrículo derecho de los animales tratados con MPTP + levodopa comparado con el grupo control de animales (P<0.05). Además, en el ventrículo izquierdo, observamos un aumento muy significativo en la expresión de la subunidad MB-COMT del grupo de animales tratados con MPTP + levodopa comparado con los grupos controles (P<0.001), que era menor pero igualmente estadísticamente significativo en el grupo tratado únicamente con MPTP con respecto a los controles (P<0.05) (Figura 44).



Figura 44: Análisis cuantitativo de los niveles de la proteína COMT en el ventrículo derecho y en el ventrículo izquierdo. El análisis de la sub-unidad S-COMT no mostró diferencias significativas en ninguno de los ventrículos. En cambio en la MB-COMT observamos un aumento significativo en el VD del grupo tratado con levodopa con respecto al grupo control. Además en el VI, se observa un importante aumento en la expresión de MB-COMT del grupo MPTP + levodopa con respecto al grupo control y en los monos intoxicados con MPTP con respecto al grupo control. (*P<0.05, **P<0.01 y *** P<0.001 con respecto al grupo control). RV = Ventrículo derecho; LV = Ventrículo izquierdo.

3.3.1. Análisis mediante HPLC del efecto de la administración de MPTP y MPTP

junto a levodopa sobre el turnover del metabolismo noradrenérgico.

Las concentraciones de noradrenalina (NA), normetanefrina (NMN) así como su turnover (ratio estimado entre NMN/NA) fueron medidas tanto en el ventrículo derecho como en el izquierdo en monos controles, en monos tratados con MPTP y en monos tratados con MPTP + levodopa. El análisis de las concentraciones de la NA (ng/g) en los dos ventrículos mostró una disminución no significativa en los monos parkinsonianos tratados con MPTP y con MPTP + levodopa con respecto a los controles (P>0.05) (Figura 45 y 46). En la concentración de la NMN observamos diferencias en los 2 ventrículos. En el derecho, la concentración de NMN (ng/g) fue significativamente muy superior en los monos tratados con MPTP + levodopa cuando los comparamos con el grupo de monos tratados con MPTP únicamente (P<0.01). En cambio, también observamos un descenso significativo en la concentración de la NMN cuando comparábamos los animales tratados con MPTP con animales controles, pero no con los tratados con levodopa (P<0.05). El turnover de NA estaba significativamente aumentado en el grupo de monos MPTP + levodopa con respecto a los grupos tratados con MPTP (P<0.001 en VD; P<0.05 en VI) y a los monos controles (P<0.01 en VD; P<0.05 en VI) (Figura 45 y 46).



HPLC Analysis. Right Ventricle

Figura 45: La NA (ng/g) no se veía afectada por el tratamiento en el ventrículo derecho del corazón de los monos, en cambio, al medir los niveles de NMN observamos un descenso significativo cuando comparábamos el grupo de monos tratados con MPTP con respecto al control. El grupo tratado con levodopa experimentaba un aumento significativo con respecto al control. El ratio NMN/NA disminuyó en el grupo MPTP y aumentó de forma significativa en el grupo de animales tratados con levodopa. * significativo con respecto al grupo control. + significativo con respecto al grupo control. # significativo con respecto al grupo tratado únicamente con MPTP.



Figura 46: Las concentraciones de NA (ng/g) en el ventrículo izquierdo del corazón mostraban un descenso no-significativo en los grupos MPTP y en los MPTP + levodopa. En cambio, al medir los niveles de NMN observamos un aumento muy significativo cuando comparábamos el grupo de monos tratados con MPTP y levodopa con respecto al control. La ratio NMN/NA disminuyó en el grupo MPTP y aumentó de forma significativa en el grupo de animales tratados con levodopa. * significativo con respecto al grupo tratado con MPTP. # muy significativo con respecto al grupo control.



1. RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Los signos cardinales de la EP se ponen de manifiesto cuando el déficit dopaminérgico estriatal es de aproximadamente un 70 % y la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc es de un 50% (Fearnley y Lees, 1991). Este importante déficit bioquímico se asocia usualmente con leves signos motores, localizándose en una zona concreta del cuerpo, por ejemplo, en forma de torpeza en la movilización de una mano o temblor en una pierna. Por tanto, el cerebro debe contar con importantes mecanismos capaces de compensar el déficit durante la fase pre-sintomática del proceso e incluso en los momentos posteriores al diagnóstico. En los años inmediatamente antes y después del diagnóstico de la EP, el proceso neurodegenerativo en la SNpc tiene su fase más acelerada, siguiendo un curso exponencial de pérdida celular (Bruck y cols., 2009; Hawkes, 2008; McGeer y cols., 1988). Los cambios celulares y los circuitos neuronales implicados y que sustentan los mecanismos que compensan el déficit de DA todavía no están bien definidos, para su estudio uno de los modelos del que disponen los investigadores es el tratamiento con MPTP. Es ampliamente conocido que la administración del MPTP a primates no humanos induce el desarrollo de los síntomas característicos de la EP y reproduce sus principales alteraciones histológicas (Burn y cols., 1983; Jenner y cols., 1984; Perez-Otano y cols., 1994; Bezard y cols., 1997). Sin embargo, una de las limitaciones más importantes de este modelo es el aparente carácter "no progresivo" que produce la administración de MPTP y que contrasta con la evolución progresiva de la EP.

<u>Distonías</u>: Nos ha llamado mucho la atención el fenómeno de las distonías transitorias producidas por la administración crónica con MPTP en los monos que han

aparecido en dos de nuestros animales. Concretamente se produjeron al término de la 5^a dosis de MPTP y se localizaron principalmente en los miembros inferiores y en el área oro-mandibular. Estas desaparecieron después de la 8° dosis de MPTP. Este fenómeno no está descrito en la literatura en este modelo de parkinsonismo bilateral con MPTP vía intravenosa (i.v.), pero en cambio si esta descrito para el modelo de hemiparkinsonismo con MPTP por vía intracarotídea en babuinos y en macacos (Tabbal y cols., 2006).

En el modelo utilizado con la rata lesionada con 6-OHDA en el estriado, hemos desarrollado un modelo de déficit dopaminérgico lento y progresivo que nos permita el estudio para evaluar nuevas moléculas biológicas con potenciales acciones neuroprotectoras como el inhibidor del NO, el 7-NI y nos ayude a comprender los eventos celulares y moleculares de la EP.

Tratamiento con levodopa: La levodopa continúa siendo el tratamiento de elección en la EP. En la presenta tesis se presentan y se discuten las bases que explican el principal mecanismo farmacológico y que permiten entender su éxito terapéutico: el reemplazo de dopamina. Asimismo, en nuestro trabajo se cuestiona el porqué de la generación de sintomatología colateral durante el tratamiento por reemplazo, principalmente las discinesias, y se citan algunas propuestas farmacológicas que, con base en hallazgos experimentales recientes, contribuirían a mejorarla y a entenderla mejor.

Además, en nuestro estudio aportamos como hallazgo novedoso que un inhibidor del oxido nítrico, concretamente el 7-NI, provoca una disminución de las discinesias inducidas por la administración crónica de levodopa en primates no humanos, además de ejercer un efecto neuroprotector de la vía nigroestriatal en ratas lesionadas con 6-OHDA (Yuste y cols., 2012).

También proponemos un posible mecanismo bioquímico, en donde incluimos las proteínas DARPP-32 total y fosforilada, donde está involucrado el NO y que modula ambas condiciones basales y de parkinsonismo.

Denervación simpática cardíaca: Junto a la disfunción secundaria a la administración de MPTP producida principalmente en la red de circuitos en los ganglios basales, también observamos que está significativamente afectada la función simpática (adrenérgica) miocárdica de los monos parkinsonizados y tratados con levodopa. Este hallazgo es muy novedoso ya que apenas existen trabajos en la literatura que describan este fenómeno en los primates no humanos (Goldstein, 2010) y en humanos (Wong y cols., 2012). Para poder medirlo hemos utilizado una serie de marcadores bioquímicos (TH, Hsp-27 y la COMT) para ver el grado de afectación y su posible implicación con el tratamiento farmacológico con Madopar® en los monos tratados crónicamente con MPTP.

En esta Tesis Doctoral se ha demostrado, mediante evaluaciones continuadas de la conducta motora en monos, que la administración repetida de un inhibidor del NO (7-NI) junto con la administración crónica de la levodopa permite reducir en más de 40% la intensidad, duración, y el tiempo de las discinesias que se producen en el modelo animal ensayado de parkinsonismo experimental con primates no humanos. Además también se ha comprobado el efecto neuroprotector producido por el 7-NI en el modelo de la rata lesionada con 6-OHDA. Así, se ha puesto en evidencia mediante diferentes técnicas como el Western Blot, HPLC, inmunohistoquímica y diversos tests comportamentales que el NO esta implicado en el desarrollo de estas discinesias en los diversos modelos de animales de parkinsonismo ensayados en este trabajo, tanto con ratas como con primates no humanos.

2. DISCUSIÓN DE LOS MÉTODOS

2.1 VALIDEZ DEL MODELO DE LA 6-OHDA EN LAS RATAS

La administración de 6-OHDA en el estriado de la rata induce una degeneración estática, rápida y casi completa de las neuronas DA de la SN (Zuch y cols., 2000). A diferencia de otros modelos, como la administración sistémica de MPTP, presenta una serie de ventajas: i) la prueba rotacional inducida farmacológicamente permite demostrar qué animales se encuentran verdaderamente lesionados; ii) se pueden observar los cambios neuronales plásticos compensatorios en la vía DA nigroestriatal contralateral al lado lesionado; y iii) posibilita utilizar al mismo animal como sujeto enfermo (vía DA lesionada) y como sujeto control (vía DA indemne) siendo más representativos los potenciales efectos neuroprotectores de las nuevas drogas (Zheng y cols., 2006; Aguiar y cols., 2005).

La degeneración neuronal con 6-OHDA también difiere sustancialmente de la que ocurre en la EP (dónde la pérdida neuronal es lenta y progresiva). Por ello, en los últimos años está siendo utilizando como modelo de degeneración neuronal DA la inducida por la inyección estriatal de 6-OHDA, que es el que se ha utilizado en este trabajo de Tesis. La inyección estriatal única de 6-OHDA ($24 \mu g$) o en infusión continua produce atrofia y degeneración lenta y progresiva de las neuronas DA de la SN homolateral (Aguiar y cols., 2005). Esta disfunción dopaminérgica se asocia con un trastorno de la deambulación en la rata que muestra algunos puntos coincidentes con los trastornos de la marcha que se presentan en la enfermedad de Parkinson idiopática (Doan y cols., 2008).

Este modelo resulta muy interesante por varias razones: en primer lugar representaría un modelo de EP en un estadio inicial de la enfermedad ya que la pérdida neuronal que se obtiene oscila entre un 60-70%; asimismo, de acuerdo a la dosis de 6-OHDA inyectada en el estriado, permite obtener una lesión parcial nigroestriatal (Roedter y cols., 2001; Kirik y cols., 1998) y, por tanto, puede ser el modelo ideal a utilizar para el estudio del efecto neuroprotector de determinadas sustancias como el 7-NI, utilizado en esta Tesis Doctoral.

Se ha demostrado un efecto neurotóxico de la 6-OHDA inyectada en el estriado directamente proporcional a la concentración de la misma administrada. Así, Roedeter y colaboradores, empleando un modelo consistente en 4 microinyecciones de 5 μ l cada una, encontraron una depleción estriatal del 35% al 70% (Roedter y cols., 2001), mientras Kirik y colaboradores con pautas de 2, 3 y 4 microinyecciones de 6-OHDA de 7 μ l cada una obtuvieron lesiones estriatales en torno al 50-80% (Kirik y cols., 1998). En nuestro estudio, cuyo propósito era simular lo más fehacientemente posible los estadios iniciales de la EP, indujimos lesiones poco agresivas a nivel estriatal por lo que empleamos concentraciones relativamente bajas de 6-OHDA para lo que realizamos 2 micro-inyecciones intraestriatales de 2 μ l cada una (un total de 4 μ l), una dosis relativamente baja en función de lo que encontramos en la literatura.

Por último, el hecho de que la inyección estriatal de 6-OHDA induzca degeneración progresiva de las neuronas DA de la SN apunta la posibilidad de que en la EP la degeneración primaria ocurra a nivel de las terminales dopaminérgicas estriatales y secundariamente exista una degeneración retrógrada de las neuronas DA de la SN (Yuan y cols., 2005). Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que neurotoxinas dopaminérgicas como 6-OHDA y MPTP, cuando se administran por vía sistémica o

intraventricular (estereotáxica) resultan más tóxicas sobre las terminales DA que sobre el soma neuronal (Schwarting y Huston, 1997; Lee y cols., 1996).

2.2 TEST COMPORTAMENTALES EN LAS RATAS: EBST

Un test adicional que realizamos en nuestro trabajo fue el *elevated body swing test* (EBST) para verificar la lesión parcial en el estriado y evitar los posibles efectos comportamentales de sensibilización ante repetidas inyecciones de apomorfina (Blandini y cols., 2007). Este test está bien descrito en la literatura por Borlang y Sanberg (Borlongan y Sanberg, 1995) y se realizó 15 días después del test rotatorio de la apomorfina. Nosotros lo utilizamos de complemento como test libre de drogas junto con el test de la apomorfina. Este tándem de test (Apomorfina y EBST) fue un gran acierto ya que podíamos medir el grado de lesión producido por la 6-OHDA por dos vías diferentes y sin que se solapasen en el tiempo. Además, como ha sido comentado anteriormente, con el EBST evitábamos la sensibilización a las inyecciones con apomorfina en donde en algunos trabajos del mismo área han sido duramente criticados (Armentero y cols., 2006).

2.3 PROTOCOLO DE INTOXICACIÓN CON MPTP Y EVALUACIÓN MOTORA DE LOS MONOS

La intoxicación con MPTP en el mono es probablemente el modelo más relevante que existe en la actualidad para estudiar la clínica de la EP (Fox y Brotchie, 2010). Este modelo no solo replica la muerte de las neuronas dopaminérgicas y la consecuente depleción estriatal de DA, sino que también reproduce la casi totalidad de los síntomas motores que se ponen de manifiesto en la EP. Una de las mayores limitaciones del modelo del mono con MPTP, es hasta ahora, la dificultad que existe en reproducir la pérdida gradual de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc y la correspondiente aparición progresiva de los síntomas motores, tal y como ocurre en la EP (Jakowec y Petzinger, 2004; Selikhova y cols., 2009).

2.3.1. Protocolos y susceptibilidad individual

Se han desarrollado numerosos protocolos de intoxicación con el fin de replicar esta progresión. Sin embargo, la mayoría de ellos tienen importantes limitaciones, esencialmente relacionadas con la farmacocinética y el mecanismo de acción del tóxico (Bezard y cols., 1997b; Ding y cols., 2008; Hantraye y cols., 1993; Taylor y cols., 1997). El MPTP y sus metabolitos no son excretados totalmente hasta tres días después de su inyección (Przedborski y cols., 2001; Schintu y cols., 2009) y los síntomas motores post-intoxicación pueden no aparecer hasta 3-4 días después de la misma (Pessiglione y cols., 2004; Schintu y cols., 2009), complicando el análisis y la relación dosis-respuesta. Con administraciones diarias, la acumulación de MPP⁺ lleva a una infraestimación de los síntomas producidos por cada dosis y conduce a que el estado motor continúe empeorando, incluso una vez que la intoxicación ha terminado (Johnston y cols., 2010).

El intervalo de tiempo entre las inyecciones, llevado a cabo en nuestro protocolo de estudio, permitió un control mucho mayor de la gravedad de intoxicación sistémica del cuadro motor, de tal manera que era más sencillo evaluar su actividad motora en los monos y observar su clínica de forma más tranquila percibiendo todo tipo de detalles que nos han sido de gran utilidad para estudiar después su *postmortem*. Además, cuando estos síntomas parkinsonianos eran muy evidentes los monos se mantenían largo tiempo

con estos síntomas estables antes de comenzar con el tratamiento con la levodopa. En conjunto, esta pauta de administración consigue distinguir con mayor nitidez entre diferentes grados de alteración motora evaluados con nuestra escala de discapacidad motora. La posibilidad de evaluar los síntomas tras cada inyección individual es fundamental para la elaboración de un modelo progresivo (Przedborski y cols., 2001).

Asimismo, al igual que en los humanos (Borm y Van Vliet, 1988; Tetrud y cols., 1989), la susceptibilidad individual de los síntomas es muy variable entre los diferentes animales (primates no humanos), incluso usando el mismo protocolo de intoxicación (intervalo, cantidad, mismo número de dosis, etc.) (Eidelberg y cols., 1986; Elsworth y cols., 2000; Taylor y cols., 1997). Además, existe una cierta recuperación motora espontánea en alguno de los monos que son intoxicados con MPTP, también variable en cuanto a intensidad y curso temporal con que evoluciona (Mounayar y cols., 2007; Taylor y cols., 1997). En algunos protocolos de intoxicación aguda se han inyectado dosis de 0.4-0.5 mg/Kg durante 5 días, produciéndose un amplio rango de gravedad de los síntomas, desde la estabilización de los mismos a casi una recuperación total (Eidelberg y cols., 1986; Elsworth y cols., 2000; Taylor y cols., 1997) que puede estar en relación con la máxima gravedad alcanzada (Taylor y cols., 1997). También se ha descrito que la edad y el sexo de los animales es un factor que puede influir en su recuperación (Degryse y Colpaert, 1986; Ovadia y cols., 1995) aunque existen otros estudios que afirman que, aunque la edad influye en el número de dosis necesarias para conseguir un parkinsonismo clínico estable, no influye en su posible recuperación¹. Sin embargo, desde el punto de vista experimental, esta característica del modelo abre oportunidades muy interesantes para su estudio. En este trabajo de Tesis Doctoral se inyectaron dosis bajas de MPTP (0.3 mg/Kg) a intervalos de 15 días. Otros trabajos

¹ Por recuperación nos estamos refiriendo a una cierta mejoría en las capacidades motoras del animal después de estar un tiempo sin administrarle MPTP.

previos han usado también la misma pauta de dosis que seguimos nosotros en la tesis (Masilamoni y cols., 2011; Bezard y cols., 2001; Barcia y cols., 2004) durante un periodo de tiempo de entre 1 ó 2 semanas entre cada inyección de MPTP. De esta manera conseguimos un modelo progresivo de la EP en nuestros animales.

2.3.2. Evaluación del parkinsonismo

Para evaluar el grado de parkinsonismo, se utilizó la escala de discapacidad motora diseñada en la Universidad de Navarra (Herrero y cols., 1993) que valora los principales síntomas del parkinsonismo inducido por MPTP. Además, todas las observaciones coincidieron con una segunda evaluación ciega realizada por 5 miembros del grupo de investigación con amplia experiencia en primates no humanos, por lo que se puede concluir que la clasificación de los monos en los diferentes grupos de afectación motora fue fiable. No obstante, se disponen de vídeos de cada uno de los animales en diferentes momentos y estadios que permite corroborar y analizar de nuevo su estado motor si así fuese preciso.

2.3.3. Distonías

Cabe destacar que de nueve monos que fueron intoxicados con MPTP por vía intravenosa, dos de ellos desarrollaron distonías transitorias en los miembros inferiores después de la 7^a dosis de MPTP. Este fenómeno ha sido muy poco descrito en la literatura y siempre en un modelo de hemiparkinsonismo en babuinos y macacos intoxicados con MPTP por la carótida interna (Perlmutter y cols., 1997; Tabbal y cols., 2006) por lo que adquiere gran importancia nuestro hallazgo dado que es la primera vez que se demuestra la existencia de estas distonías en un modelo bilateral, ya que no hemos encontrado en la literatura descripciones de esas distonías focales en este modelo bilateral de parkinsonismo inducido por MPTP vía sistémica.

2.4 PROTOCOLO DE ADMINISTRACIÓN DE LA LEVODOPA Y EVALUACIÓN DE LAS DISCINESIAS

Seis de los 12 monos fueron tratados de manera crónica con Madopar® durante aproximadamente 4 ± 0.6 meses. La pauta de tratamiento seguida en nuestro protocolo fue similar a la descrita en la literatura en los trabajos del grupo de investigación de Teresa Di Paolo (Morin y cols., 2012; Riahi y cols., 2011; Grégoire y cols., 2011; Ouattara y cols., 2010)². Existen otros trabajos donde la pauta de administración de la levodopa es de 2 capsulas diarias pero con unas dosis del fármaco menores (20-40 mg/kg de levodopa y 5-10 mg de benserazida) (Pearce y cols., 2001), o incluso utilizando otros inhibidores de la levodopa descarboxilasa en vez de la benserazida como puede ser la carbidopa o L-α-metil-DOPA (L-AMD) (Tayarani-Binazir y cols., 2010).

La carbidopa o la benserazida se administran simultáneamente con cada dosis de levodopa. Esto supone que, al inicio, la inhibición de la actividad de la DOPA descarboxilasa (DDC) se produce con la suficiente rapidez para evitar el metabolismo y la inhibición de la levodopa periférica que persiste durante un cierto tiempo en el medio (Pinder y cols., 1976). La vida media plasmática ($t_{1/2}$) de la carbidopa y la benserazida es aproximadamente de 2,5 horas y esto se correlaciona con el grado de inhibición de actividad de la descarboxilasa (Lieberman y cols., 1975; Korten y cols., 1975).

 $^{^{2}}$ El protocolo de administración fue de una única dosis diaria de una cápsula (vía oral) que contenía 100 mg de levodopa y 25 mg de benserazida.

En el tratamiento sintomático de la EP, tanto la carbidopa como la benserazida se utilizan comúnmente junto con la levodopa en la misma proporción fija de 1:4 (Tayarani-Binazir y cols., 2010). Estudios clínicos realizados hace mas de 20 años no mostraron ninguna diferencia significativa global entre el beneficio clínico de los dos inhibidores de la DDC (carbidopa o benserazida) (Marsden y cols., 1973.; Admani y cols., 1985). Sin embargo, el aumento de los niveles plasmáticos de levodopa era mayor cuando se administraba junto con benserazida comparándolo con su efecto al coadministrarlo con carbidopa (aunque las dosis de los inhibidores de la DDC utilizados pudieron no haber sido las mismas) (Hagan y cols., 1980).

2.4.1. Escalas de análisis de las discinesias

La escala para evaluar la severidad de las discinesias en los primates no humanos que hemos utilizado en nuestro trabajo está bien descrita en la literatura (Hadj Tahar y cols., 2004)³. Existen evidencias de otras escalas para evaluar las discinesias en macacos que son muy similares a la utilizada por nosotros, evaluando cada 30 min sobre grabaciones hasta la finalización del experimento oscilando los valores de alteración discinética entre 0 y 4 (Hill y cols., 2003; Savola y cols., 2003). Nosotros llevamos a cabo una doble evaluación, por una parte tras la administración del fármaco llevábamos a cabo una valoración *"in vivo"* o directa, por personal entrenado de nuestro laboratorio, que podía ser corroborada posteriormente por una valoración indirecta fruto de la grabación diaria de todo este proceso, esta doble valoración tuvo lugar durante todo el periodo de tiempo que duró el tratamiento hasta el día de su sacrificio.

³ Se realizaba cada 30 minutos durante un periodo total de 200 minutos. Los valores oscilaban desde 0 a 3. Abarcaba distintos segmentos del cuerpo: la cara, el cuello, el tronco, los miembros superiores y los miembros inferiores.

3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 TESTS COMPORTAMENTALES EN LAS RATAS

3.1.1 Evaluación del comportamiento rotatorio

Para determinar el éxito de la denervación parcial estriatal las ratas fueron inyectadas con apomorfina 15 días después de la lesión con 6-OHDA. Este protocolo está muy bien descrito en la literatura dando un intervalo de entre 7 y 21 días para cuantificar el número de rotaciones contralaterales (Padovan-Neto y cols., 2009; Moroz y cols., 2004; Belforte y cols., 2001).

En nuestro trabajo solamente las ratas que exhibieron más de 15 rotaciones contralaterales a la lesión en 45 minutos fueron incluidas en el estudio histológico (Yuste y cols., 2012). En otros trabajos se ha descrito en la literatura diferentes límites entre el número de rotaciones y el grado de la lesión producida por la toxina (Walker y cols., 2012; Walker y cols., 2010).

Otro posible test farmacológico para evaluar el comportamiento rotatorio de las ratas después de la lesión con 6-OHDA es el test de la anfetamina, en donde se miden las rotaciones ipsilaterales a la lesión, no contralaterales como la apomorfina, y se realiza a las 3 semanas después de realizar la lesión con cirugía estereotáxica (Walker y cols., 2010).

3.1.2 Elevated Body Swing Test

Este test adicional lo hicimos 15 días después del test rotatorio de la apomorfina. Los resultados que obtuvimos fueron muy similares a los encontrados en la literatura (Baluchnejadmojarad y Roghani, 2004). Las ratas realizaron más giros hacia la izquierda (lado contralateral de la lesión) en torno a un 25-30 % más con respecto a las ratas controles. De estos resultados podemos concluir varias cosas: i) el EBST es un test valido y libre del efecto de drogas para cuantificar la lesión de la 6-OHDA en el modelo de la rata y ii) de acuerdo con anteriores estudios descritos en la literatura (Borlongan y Sanberg, 1995; Roghani y cols., 2002) la dirección del comportamiento oscilante tomada por las ratas con lesiones estriatales corresponde con la dirección contralateral inducida por apomorfina en el test de comportamiento rotatorio.

3.2 TEST COMPORTAMENTALES EN LOS PRIMATES NO HUMANOS

3.2.1 Datos de la escala de discapacidad motora

En los primates no humanos y para evaluar el grado de incapacidad de cada mono tratado con MPTP se utilizó la escala de Herrero y colaboradores (Herrero y cols., 1993) que fue desarrollada en la Universidad de Navarra y en donde nuestro grupo tiene una dilatada experiencia con ella. Existen otras escalas bien descritas también en la literatura para evaluar el grado de afectación motora como son la de Imbert, Kurlan, Papa y la Canadiense (Imbert y cols., 2000). Todas ellas presentan diferentes ítems y puntaciones para evaluar a los monos parkinsonianos.

A todos estos monos se les grabó continuamente durante todo el tratamiento con MPTP tanto a las pocas horas de la inyección como semanas después para estudiar su evolución clínica a lo largo del tiempo (Chassain y cols., 2001). Se les pasaba la escala de discapacidad motora 1 vez por semana (Herrero y cols., 1993), además de cuando estaban en la jaula a las pocas horas de inyectar el MPTP. 9 monos fueron tratados con MPTP y su comportamiento clínico fue muy similar a excepción del mono 9 (M9) el cual a partir de la 3^a inyección de MPTP se puso muy grave y decidimos interrumpir el tratamiento para que no muriera (Figura 47).

Este fenómeno se debió a que cada mono tiene una diferente susceptibilidad al MPTP, y el M9 expresó una susceptibilidad muy alta. Sin embargo, otros monos (M1 y M2) presentaron una susceptibilidad al MPTP fue mucho menor, necesitando unas $14 \pm 2,3$ dosis de MPTP, pero al final todos ellos alcanzaron un umbral medio de parkinsonismo similar.

Así, tras 30 semanas de tratamiento con MPTP, el resto de monos alcanzó el umbral de los 10 puntos (medio-severo) en la escala de discapacidad motora observándose un síndrome clínico parkinsoniano muy similar entre ellos.



Figura 47: Escala de discapacidad motora de los 9 monos tratados con MPTP durante las 30 semanas de tratamiento.

Todos los monos al finalizar el tratamiento con el MPTP, y antes de comenzar el tratamiento con levodopa, presentaban bradicinesia muy marcada, inestabilidad

postural, temblor de acción y disminución significativa de la actividad espontánea muy evidente ante el estímulo alimenticio.

3.2.2 Escala de las discinesias en los monos

Tras estabilizar el síndrome parkinsoniano durante un mínimo de 2 semanas se comenzó el tratamiento crónico con Madopar® (100mg levodopa + 25 mg benserazida) en 6 de los animales parkinsonizados hasta que desarrollaron discinesias estables en el tiempo durante aproximadamente 4 ± 0.6 meses. La escala que utilizamos para evaluar las discinesias desarrolladas por los monos fue la del grupo de investigación de Di Paolo y colaboradores donde evaluaban por segmentos corporales (cara, cabeza, cuello, miembros superiores y miembros inferiores) el efecto de la levodopa (Hadj Tahar y cols., 2004). A los primeros días del tratamiento los monos no desarrollaron discinesias hasta que pasaron aproximadamente unas 2 semanas donde algunos de los monos (M1 y M4) comenzaron a realizar algunos movimientos involuntarios en la primera hora de efecto de la administración de levodopa. Después de 2 meses de tratamiento el resto de los monos desarrollaron discinesias estables y mantenidas a lo largo del tiempo después de cada administración de levodopa (Figura 48).

Hay que destacar también la presencia de distonías en los miembros inferiores de 3 monos durante el periodo que fueron tratados con levodopa, además de trastornos del sueño-vigilia que eran muy evidentes. Algunos de estos monos dormían por el día y estaban despiertos por la noche. Estos efectos no motores no han sido analizados en este estudio aunque se han observado con el estudio comportamental. Este fenómeno también se ha descrito en la clínica de la EP con los humanos (Verbaan y cols., 2008).



Figura 48: Puntuación de discinesias durante los días de tratamiento con levodopa en los 6 monos parkinsonizados con MPTP.

3.3 EFECTO NEUROPROTECTOR SOBRE EL ESTRIADO MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE 7-NI

Nuestros resultados muestran como dos micro-inyecciones unilaterales intraestriatales de 6-OHDA en ratas produjeron una pérdida significativa de fibras TH⁺ en el estriado y una disminución del número de neuronas en la SNpc (Yuste y cols., 2012). El grupo de Yuan y colaboradores analizan dos grupos experimentales con lesiones en el haz prosencefálico medial y en el estriado, obteniendo resultados histológicos con la TH en el estriado muy similares a los encontrados en nuestro trabajo (Yuan y cols., 2005). Sin embargo, ellos no analizaron el descenso del número de neuronas dopaminérgicas en la SN. Además, la concentración de 6-OHDA que ellos utilizaron fue sensiblemente más elevada que en nuestro trabajo, el grupo de Yuan y colaboradores utilizaron una concentración de 6-OHDA de 4 μ g/ μ l y nosotros de 2 μ g/ μ l. En los grupos de ratas lesionadas con 6-OHDA y tratadas con el inhibidor de

NOS, 7-NI, hay una menor pérdida de fibras neuronales y del número de neuronas en el estriado y en la SNpc, sugiriéndonos un efecto neuroprotector del inhibidor de la NOS neuronal.

Este efecto en el estriado ha sido observado por Padovan-Neto y colaboradores (Padovan-Neto y cols., 2009) pero no correlacionado con la disminución del número de neuronas en la SN como hemos descrito nosotros en el presente trabajo. En nuestro trabajo hemos observado que la administración de 7-NI previene tanto de la pérdida de fibras TH⁺ en el estriado como de neuronas en la SNpc. Este fenómeno podría ser explicado por el hecho de que la depleción de la DA en el estriado aumenta el estrés oxidativo influenciado por los peroxinitritos, los cuales son reconocidos como importantes mediadores neuronales en la degeneración del sistema dopaminérgico (Smith y Cass, 2007). Además, los inhibidores de la NOS, como el 7-NI, pueden proteger contra los procesos de oxidación y nitración, reduciendo los niveles de peroxinitritos (Denicola y Radi, 2005) y atenuando la toxicidad de la 6-OHDA. Adicionalmente es sabido que además de la inhibición de la NOSn, el 7-NI es un buen inhibidor de la MAO-B, y esta característica ha podido contribuir al mecanismo neuroprotector del efecto del 7-NI en ratones intoxicados con MPTP (Royland y cols., 1999). El inhibidor selectivo 7-NI exhibe efectos neuroprotectores ya que evita el descenso de ATP tras la administración de MPTP pero este efecto no tiene lugar con el tratamiento con L-NOARG (otro inhibidor de la NOSn) tras intoxicación con MPTP (Royland y cols., 1999). Asimismo, tras atravesar la barrera hematoencefálica y en presencia de la enzima MAO-B, el MPTP se convierte en su metabolito tóxico MPP⁺. Este ión entra de manera selectiva a las neuronas nigroestriatales donde inhibe la fosforilación oxidativa mitocondrial dando lugar a la muerte neuronal (Synger y cols., 1987). La inhibición de la enzima MAO-B mostró que atenúa la neurotoxicidad del

MPTP (Royland y cols., 1999). Sin embargo, la elevada actividad de la MAO-B en ratones transgénicos no ha aumentado su sensibilidad al MPTP, sugiriéndonos que la conversión de MPTP a MPP⁺ no es el único factor limitante para la neurotoxicidad del MPTP (Anderson y cols., 1996). Por otro lado, inhibidores de la MAO-B no mostraron efecto inhibidor de la neurotoxicidad generada en ratas intoxicadas con 6-OHDA (Heeringa y cols., 1997).

3.3.1. 7-Nitroindazol como neuroprotector

Otro punto interesante a discutir de nuestro estudio es que el 7-NI se lo administramos a las ratas antes de la intoxicación con la 6-OHDA y por tanto su efecto sobre la muerte neuronal estaría relacionado con su función neuroprotectora. Sin embargo, en nuestro estudio en los monos, dicho inhibidor fue administrado después de la intoxicación con MPTP, cuando la pérdida neuronal ya es casi irreversible y por tanto no pudiese tener un efecto neuroprotector. Dicho efecto neuroprotector del 7-NI fue demostrado por el grupo de Hantraye y colaboradores en 1996 (Hantraye y cols., 1996) quienes mostraron el efecto neuroprotector del 7-NI en babuinos administrado previamente al tratamiento con MPTP, como nosotros hicimos en nuestra tesis con las ratas y 6-OHDA.

Esta pauta de tratamiento con 7-NI en monos se derivaba de nuestro interés no en saber si el 7-NI podía actuar como un buen neuroprotector, sino como un buen antidiscinético, es por ello por lo que era de suma importancia que el grado de parkinsonismo inducido en el mono fuese avanzado, cosa que *a priori* es imposible de anticipar antes de la intoxicación con MPTP, ya que cada mono, como se ha mencionado anteriormente, tiene una diferente susceptibilidad al MPTP como ocurre también en los humanos (Tetrud y cols., 1989; Morrow y cols., 2012).

3.4 EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE 7-NI SOBRE LAS DISCINESIAS INDUCIDAS POR LEVODOPA

En el presente trabajo mostramos como la administración de 7-NI simultanea con levodopa disminuye la duración e intensidad de las discinesias en un modelo de parkinsonismo de primate no humano sin que esto afecte a la eficacia antiparkinsoniana de la levodopa. Aunque previamente se había descrito que la administración del 7-NI podía producir estados catalépticos en ratas (Padovan-Neto y cols., 2009), en nuestro estudio no observamos ningún efecto letárgico o cataléptico en la evaluación motora de los monos parkinsonianos. De hecho, anteriores estudios llevados a cabo con babuinos mostraron que la administración del 7-NI en primates causaba hiperactividad (Hantraye y cols., 1996). En nuestro estudio no vimos ninguna evidencia ni de estadios de catalepsia ni de hiperactividad en los animales tratados con 7-NI. El análisis del área bajo al curva (AUC) que engloba la intensidad y duración de la respuesta discinética total de cada mono, demuestra la inhibición de la NOS de manera constante y una reducción significativa del perfil discinético de cada mono. Estos resultados de los perfiles discinéticos (intensidad y duración de las discinesias) son muy similares a los encontrados en humanos (Cenci y cols., 2009). En nuestro estudio administramos una dosis de levodopa de inicio elevada (100 mg/Kg) como en los estudios del grupo de Di Paolo y colaboradores (Ouattara y cols., 2010). Con ello, determinamos si los animales respondían bien a la levodopa al igual que ocurre en la clínica. Posteriormente se observó que todos los monos parkinsonizados tratados crónicamente con levodopa desarrollaron discinesias que era la finalidad de nuestro estudio para poder después ensayar el inhibidor de la NOS, el 7-NI.

3.4.1. Tipos de discinesias tras la administración con 7-NI

Al administrar el inhibidor del NO (7-NI), el efecto se repetía en los 3 animales que fueron analizados, consiguiendo efectos positivos y mejora en la escala discinética en los 3 monos tratados, tanto en duración como intensidad. Sin embargo, los perfiles discinéticos permanecían similares (pico de dosis donde se alcanza la máxima puntuación en la escala discinética, observándose después como va disminuyendo esa intensidad con el tiempo al igual que ocurre con nuestros monos, el llamado fenómeno deterioro fin de dosis o "wearing off"). Con respecto al tipo de discinesias exhibidas en los 3 monos tratados crónicamente con levodopa y 7-NI estas no eran iguales en todos los animales, pero eran similares a las que exhibían sin la co-administración con 7-NI.

3.4.2. Mecanismos de acción estriatal del 7-NI

Para poder explicar el fenómeno anti-discinético del inhibidor de las NOS, 7-NI, un posible mecanismo podría ser el papel que juegan las interneuronas nitrérgicas en el estriado. Las interneuronas nitrérgicas son activadas por trasmisión sináptica corticoestriatal (vía directa) o por terminales dopaminérgicos (receptores D1/D5) dentro de la red neuronal estriatal (West y cols., 2002). Varias líneas de investigación muestran la evidencia de que tratamientos prolongados con levodopa alteran el funcionamiento de las neuronas espinosas de tamaño medio localizadas en el estriado. Una de estas alteraciones son cambios en la señalización del AMPc asociado a las LIDs tanto en el modelo de la 6-OHDA en los roedores (Breese y cols., 1987; Joyce, 1991; Marshall y cols., 1989) como el del MPTP en los monos (Aubert y cols., 2005). Todas estas evidencias sugieren que las discinesias puedan producirse por hiperactivación estriatonigral. Un importante mediador del AMPc es la proteína DARPP-32 (Hara y cols., 2010). La PKA cataliza la fosforilación en la Thr-34 de la DARPP-32 inhibiendo a la PP-1, la cual es muy abundante en las MSNs (Yuste y cols., 2012; Santini y cols., 2008) (Figura 49). Por tanto, cuando administramos nuestro inhibidor, 7-NI, actuaria inhibiendo la NOS, produciendo una menor cantidad de NO, que a su vez da lugar a una menor activación de la sGC/sAC y de la PKG/PKA, produciendo una menor cantidad de proteína DARPP-32 fosforilada en la Thr-34 y una mayor concentración de la DARPP-32 total. El NO juega un papel muy importante y critico en el estriado: i) activa el GMPc en las neuronas espinosas de tamaño medio (MSNs) activando el AMPc (Lin y cols., 2010) e inhibiendo la liberación de glutamato en las vías corticoestriatales (Calabressi y cols., 1999) y ii) provoca una depresión a largo plazo (LTP) de las MSNs (West y Tseng, 2011) (Figura 49), por tanto el 7-NI actuaría provocando un descenso de la DARPP-32 total.

Así, una posible explicación para la reducción de las discinesias inducidas por levodopa en modelos animales de parkinsonismo experimental es la vía donde está implicado el AMPc/GMPc. Un desequilibrio de los segundos mensajeros esta implicado en la alteración de la señal de traducción con DA y levodopa. En animales discinéticos tratados crónicamente con levodopa los niveles de AMPc y de GMPc en las regiones córtico-estriatal-palidal de ambos hemisferios cerebrales disminuyen (Giorgi y cols., 2008), lo que conlleva la híper-sensibilización de las MSNs estriatales a la levodopa.

El aumento de sensibilización podríamos atribuirlo a la sobreexpresión de componentes específicos (por ejemplo Gαolf) de la maquinaria de transducción de los receptores DA tipo 1 (D1R) (Alcacer y cols., 2012).

171



Figura 49: Diagrama esquemático mostrando el mecanismo del NO en las MSNs del estriado y en las interneuronas nitrérgicas en respuesta a la transmisión dopaminérgica en condiciones normales y con la EP (Yuste y cols., 2012).

3.5 ESTUDIO DE LA PROGRESIÓN DEL DEFICIT MOTOR

3.5.1 Recuento celular en el mesencéfalo

3.5.1.1 Ratas

Nosotros hemos descrito en un estudio con el modelo de la rata lesionada en el estriado con 6-OHDA que existe un ligero ascenso, no significativo, en los recuentos de neuronas DA en la SNpc provocado por el efecto del inhibidor 7-NI (Yuste y cols., 2012). El resto de áreas estudiadas en el mesencéfalo (SN γ y la SN_{lat}) no se observaron aumentos significativos. Este hallazgo es novedoso ya que en otros trabajos similares en la literatura no se habían contado las neuronas DA de la SN tras el tratamiento con el inhibidor 7-NI (Padovan-Neto y cols., 2009). Cabe destacar que la lesión con la toxina fue de un 80% en el grupo de ratas tratados con la 6-OHDA/Veh. En cambio en el grupo tratado con el inhibidor 6-OHDA/7-NI el grado de lesión solo fue de aproximadamente un 60% (Yuste y cols., 2012).

3.5.1.2 Primates no humanos

El estudio estereológico realizado ha demostrado una sensibilidad al MPTP diferente en las 2 regiones mesencefálicas analizadas (SNpc y VTA) que corresponden a diferentes poblaciones dopaminérgicas (Parent y Lavoie, 1993). Los cerebros de pacientes parkinsonianos muestran un patrón muy específico de perdida dopaminérgica en el mesencéfalo (Shih y cols., 2007) muy similar y proporcional al hallado en nuestros monos. Esto nos sugiere de nuevo la idoneidad del modelo MPTP en el primate no humano para el estudio de la EP (Jenner, 2009).

El grado de pérdida neuronal es muy alto en la SNpc (A9) pero la pérdida es menor en la VTA (A10). La región A9, que constituye el principal origen de la vía nigroestriada, mostró una pérdida progresiva en el recuento celular, encontrándose una correlación muy significativa entre el estado motor de cada mono y el grado de lesión, imitando en gran manera lo que ocurre en la EP. En cambio hay que tener en cuenta que cada mono tiene su propia susceptibilidad genética al MPTP y por tanto no siempre se observa lo descrito anteriormente (estado motor y grado de lesión). Teniendo en cuenta que estudiamos 9 monos tratados con MPTP, y que el tamaño de la muestra no es muy grande para poder concluir esa hipótesis, no podemos afirmar que haya una relación directa entre el grado de discapacidad motora de cada mono y el grado de lesión histológica en otros estudios de este tipo. Otros autores han descrito la correlación entre el nivel de discapacidad motora y las lesiones histológicas observadas (TH y DAT) con resultados muy similares a los nuestros (Blesa y cols., 2012). Sin embargo, las pautas de administración de MPTP no fueron las mismas en ambos estudios, y tampoco trataron a los animales con levodopa como en el presente trabajo.
Este análisis del número de neuronas del mesencéfalo permite establecer un valor umbral para el número de células TH⁺ en la SNpc, que define el paso del estado motor normal al parkinsoniano.

En el presente estudio el valor umbral se situó alrededor del 65% de la pérdida neuronal. Esta cifra umbral se acerca a la de estudios realizados en el cerebro de pacientes con EP, en los que se ha calculado que el inicio de los signos motores cardinales se asocia con aproximadamente un 55-60% de perdida neuronal en la SNpc (Damier y cols., 1999; Fearnley y Lees, 1991). En estudios en el modelo de mono intoxicado por MPTP existe una mayor variabilidad en los resultados encontrados (Bezard y cols., 2001b; Ding y cols., 2008; Mounayar y cols., 2007) aunque la mayoría de los estudios sitúan este umbral en torno al 60-70%, si bien los protocolos de intoxicación y parkinsonización son también diferentes. Asimismo, esta moderada discrepancia descrita debe ponerse en perspectiva en el modelo aquí utilizado y de la técnica de recuento que hemos empleado. (Barcia y cols., 2004).

La pérdida neuronal en el VTA (A10) fue la misma también en todos los monos tratados con MPTP, con MPTP y levodopa, o con MPTP, levodopa y 7-NI. El patrón de pérdida es similar al hallado en la EP (Damier y cols., 1999; Gibb y Lees, 1991) en la que característicamente el VTA muestra un porcentaje de pérdida neuronal significativamente menor que en el de la SNpc (Herrero y cols., 1993; Cruz-Muros y cols., 2009). La menor vulnerabilidad de las neuronas de A10 a tóxicos como el MPTP (Hererro y cols., 1993) o a la 6-OHDA es bien conocida, siendo similar en otros modelos animales (Rodriguez y cols., 2001). Este hallazgo de la disminución de neuronas observado en la VTA también ha sido descrito en células en cultivo de ratones y humanos exponiéndolas al tóxico MPTP y a distintas concentraciones de levodopa (Mosharov y cols., 2009). También se ha correlacionado el grado de pérdida

dopaminérgica en las neuronas de A10 con la apatía y el grado de afectación de la vía VTA-Accumbens con la perdida dopaminérgica en la SNpc (Brown y cols., 2012). Este aspecto apático es muy común a las personas que tienen la EP y el estudio de Brown y colegas lo pone de manifiesto "*in vivo*", sugiriéndonos que un daño en el sistema dopaminérgico puede producir comportamientos apáticos.

En este sentido, es reseñable que las neuronas de A10 tienen una expresión menor de DAT que las de A9, lo cual podría resultar un factor significativo en su menor vulnerabilidad al proceso neurodegenerativo (Alfonso-Oramas y cols., 2009; Gonzalez-Hernandez y cols., 2004; Stephenson y cols., 2007). Adicionalmente, las neuronas dopaminérgicas del VTA tienen un patrón fenotípico diferente a las de la SNpc que las hace más resistentes y menos vulnerables a diferentes agresiones (Reyes y cols., 2012; Harvey y cols., 2000; Herrero y cols., 1993). Estas diferentes agresiones pueden hacer que estas neuronas DA se comporten de diferente manera a: i) la EP y la toxina parkinsonizante MPTP (Dickson y cols., 2009; Garrido-Gil y cols., 2009), ii) los diferentes factores tróficos (DDC) que son claves para el desarrollo fenotípico de las células DA (Reyes y cols., 2012), y iii) los diferentes patrones de los factores de transcripción génica y molecular (Otx2, Pitx3 y Nurr1) (Chung y cols., 2005; Greene y cols., 2005).

El DAT tiene un papel fundamental en el grado de diferente vulnerabilidad de las neuronas, ya que es la vía de entrada del MPTP. Un resultado interesante en el presente estudio ha sido la pérdida de neuronas DA en la región A10 en los grupos tratados con MPTP + levodopa. No se observa un efecto neurorescatador o neurotóxico de la levodopa, ya que el número de neuronas dopaminérgicas es el mismo con o sin tratamiento con levodopa posterior a la lesión con MPTP, siendo significativamente menor que el que se observa en el grupo de animales control. El recuento estereológico tras la administración de levodopa mostró una disminución de la expresión de las células TH⁺ encontrada en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc después de un periodo de degeneración crónica en el sistema mesoestriatal. Este fenómeno demuestra que el tratamiento crónico con levodopa no tiene ningún efecto sobre la degeneración de las células DA encontrada en estos grupos de tratamiento. Este fenómeno también ha sido descrito en la literatura (Guigoni y cols., 2005) pero con pequeñas diferencias en el tratamiento con MPTP y las pautas de tratamiento de la levodopa.

Además, cuándo le administrábamos nuestro inhibidor al grupo de tratamiento con levodopa se inducía una leve recuperación en el número de células DA pero no era lo suficientemente grande para ser significativa. Algo similar observamos también en la SNpc del estudio de las ratas lesionadas con 6-OHDA (Yuste y cols., 2012).

Todos estos resultados sugieren que el patrón de pérdida neuronal descrito en este modelo crónico de parkinsonismo inducido por MPTP imita en gran medida al propio de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas en el enfermo de Parkinson y que los tratamientos con levodopa no modifican el patrón de pérdida neuronal con respecto al grupo de monos tratados con la neurotoxina parkinsonizante únicamente.

3.5.2 Inervación dopaminérgica estriatal

3.5.2.1 Ratas

En el modelo de rata lesionada con 6-OHDA observamos una pérdida significativa de la inervación estriatal (medida con inmunocitoquímica cuantitativa de TH), efecto que corrobora lo descrito en la literatura (Lee y cols., 2012; Kobylecki y cols., 2010) y valida el síndrome hemiparkinsoniano. El descenso significativo del número de fibras dopaminérgicas estaba situado en la zona dorso-lateral del estriado en

las ratas lesionadas sin tratar, pero se evidenció un aumento significativo de las fibras dopaminérgicas con respecto al grupo de los controles en aquellas ratas tratadas con 7-NI (Yuste y cols., 2012). Este hallazgo no había sido descrito previamente, en la literatura previa solo se había descrito el efecto antidiscinético del 7-NI con tests comportamentales (Padovan-Neto y cols., 2009) sin evidencias histológicas ni del estriado ni de la SN (Novaretti y cols., 2010; Padovan-Neto y cols., 2009). Considerando que el 7-NI se administró 30 minutos antes de la cirugía estereotáxica de inyección de 6-OHDA, con este protocolo se ha demostrado el efecto neuroprotector de 7-NI.

3.5.2.2 Primates no humanos

Los valores de los resultados de la densidad óptica para TH y DAT obtenidos en el estriado fueron muy similares a lo que el grupo de Erwan Bezard y colaboradores describieron ya en la literatura (Fernagut y cols., 2010). Ambos marcadores siguieron un patrón de recuento estereológico muy similar (Banckiewicz, 1991) en los animales tratados con MPTP y con levodopa. Esta gran semejanza en el patrón sugiere que la reducción tanto de TH como de DAT en el estriado no es debida a un descenso de la síntesis de ambos marcadores sino a la degeneración de terminales dopaminérgicas estriatales, que ambos marcadores reflejarían de igual manera. Si se observan más detenidamente los resultados de la densidad óptica en el putamen, encontramos que en el grupo de monos tratados con 7-NI existe una tendencia no de recuperación dopaminérgica no significativa con respecto de los otros grupos de monos tratados con MPTP. Este resultado es muy similar al encontrado en el experimento de las ratas con el grupo del inhibidor, no llegando a ser significativo en ninguno de los 2 casos. Debe reconocerse que los dos marcadores aquí utilizados (TH y DAT) mostraron una disminución del cuerpo del estriado (en todas sus áreas), siendo el núcleo accumbens el menos afectado con respecto a los animales controles. Los estudios patológicos en pacientes con EP han demostrado que el putamen esta mas afectado que el caudado (Brooks y cols., 1990; Kish y cols., 1988). En el modelo de mono intoxicado con MPTP existen resultados contradictorios: mientras algunos autores sostienen este mismo patrón de pérdida (Hantraye y cols., 1993; Moratalla y cols., 1992) otros afirman que la pérdida en el caudado es mayor que en el putamen (Elsworth y cols., 1989; Iravani y cols., 2005; Perez-Otano y cols., 1992).

El análisis por regiones de este trabajo mostró un gradiente rostro-caudal en el putamen anterior (ac +2mm) con los dos marcadores estudiados (TH y DAT) con respecto al putamen posterior estando este más afectado que el anterior. Con respecto al núcleo caudado también se encontró un gradiente rostro-caudal con respecto al caudado posterior (ac -4mm) pero más pronunciado que en el núcleo putamen.

El déficit dopaminérgico del caudado podría relacionarse con alteraciones cognitivas actualmente reconocidas en estadios iniciales de la EP (Rodriguez-Oroz y cols., 2009) y que supone otra posible aplicación de este modelo para estudios futuros. Es posible que la forma lenta de administración y el uso de dosis de MPTP mas bajas de las habituales utilizadas en la literatura, pueda ocasionar una lesión más selectiva en la proyección nigro-estriada. En este estudio no se han encontrado diferencias significativas entre los diferentes grupos de monos tratados con MPTP, tanto con levodopa como con el 7-NI. Al comparar estos resultados con lo descrito previamente observamos cierto paralelismo con respecto a otros estudios con primates no humanos tratados con MPTP y con MPTP junto con levodopa (Ahmed y cols., 2010; Samadi y cols., 2008). Sin embargo, es la primera vez que se utiliza el tratamiento con 7-NI y se realizan estudios en el estriado de monos parkinsonizados.

En los monos no se ha demostrado el efecto neuroprotector de 7-NI ya que este fue administrado meses después de la intoxicación con MPTP cuando la pérdida neuronal ya era irreversible.

3.6 ESTUDIO DE ALTERACIONES CARDIACAS EN LOS MONOS PARKINSONIANOS Y TRATADOS CON LEVODOPA

La disfunción del sistema nervioso autónomo es un aspecto importante, aunque poco conocido, de las manifestaciones clínicas y etiológicas de las disautonomías primarias degenerativas. En la EP la denervación simpática cardíaca es provocada por degeneración de las neuronas post-ganglionares, y se cree que puede iniciarse en etapas presintomáticas de la enfermedad (Goldstein, 2010). La consecuente disfunción simpática cardiaca, generalmente asintomática en las primeras etapas, puede poder diagnosticarse de forma no invasiva mediante pruebas autonómicas cardiovasculares y de imagen funcional (Jain y Goldstein, 2012). La presencia y grado de disautonomía cardíaca se evalúa en el diagnóstico diferencial de los síndromes parkinsonianos y tiene correspondencias pronosticas y de respuesta al tratamiento. Asimismo, estudios postmortem con inmunocitoquímica para TH han demostrado que existe una importante denervación simpática cardiaca en la EP, confirmada en análisis in vivo con agentes marcados radiactivamente como con ¹²³I-metaiodobencilguanidina (¹²³I-MIBG) o con ¹⁸F-fluorodopa (Orimo, 2012). El patrón de denervación simpática cardíaca en la EP es extenso, asimétrico y segmentario ya que está más afectada la pared proximal lateral del ventrículo izquierdo, con preservación relativa de las paredes septales anterior y proximal, como se demostró en un estudio por emisión de positrones (PET) con (¹¹C)-Meta-Hidroxiefedrina (HED) (Wong y cols., 2012). Por ello, es de gran interés que en la

EP incipiente se realicen tests funcionales (y se apliquen técnicas de imagen) que permitan identificar disautonomías con el fin de emitir diagnósticos diferenciales de los síndromes parkinsonianos (Chaudhuri, 2001). En nuestro trabajo, mediante técnicas de WB y HPLC, se ha visto reflejada una disminución de los niveles de TH esencialmente en el ventrículo izquierdo. También se ha observado el aumento de la TH fosforilada y de la Hsp-27 fosforilada en ambos ventrículos de los monos parkinsonizados crónicamente con MPTP (tanto los tratados con levodopa como sin tratamiento sintomático) siendo de mayor significación en el ventrículo izquierdo. De igual manera, las medidas de la COMT estuvieron aumentadas en ambos ventrículos cardíacos.

Estudios *post-mortem* de corazón de pacientes que habían padecido EP muestran una disminución de las terminaciones de los axones simpáticos pero un aumento de la presencia de agregados de α-sinucleína en los axones simpáticos remanentes, e incluso agregados de α -sinucleína mas abundantes en los ganglios paravertebrales simpáticos (Orimo y cols., 2008). Estos agregados proteicos se correlacionan con la disminución de la denervación dopaminérgica, e indicarían que la degeneración es un proceso cronológico y dinámico que comienza distalmente en el epicardio antes que en los ganglios simpáticos (prevertebrales o paravertebrales) (Orimo y cols., 2008). Mediante estudios bioquímicos (HPLC y WB) del tejido cardíaco postmortem de los monos parkinsonizados analizamos una serie de proteínas relacionadas con la muerte neuronal (TH), con el estrés celular causado por el parkinsonismo experimental (Hsp-27 y su versión fosforilada), así como la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT) que controla la reacción limitante de la formación de la normetanefrina (NMN). También se han estudiado los metabolitos NA, NMN y sus ratio en ambos ventrículos cardíacos. Todos estos análisis no se habían realizado previamente en tejido cardíaco de primates no humano intoxicados con MPTP.

3.6.1 HSP-27

Las proteínas de choque térmico (HSP) son una familia altamente conservada de proteínas que se inducen en respuesta a diversos factores de estrés ambiental, incluyendo las especies reactivas del oxígeno derivadas de la neurotoxina MPTP (Lee y cols., 2012). La proteína Hsp-27 es una proteína chaperona con la capacidad de aumentar la supervivencia celular en respuesta al estrés oxidativo. En nuestra tesis doctoral esta proteína y su versión fosforilada han sido analizadas en los diferentes grupos de monos tratados con MPTP y con MPTP + levodopa evidenciando que tras la inducción del parkinsonismo existe un aumento significativo de las proteínas fosforiladas en los dos ventrículos cardíacos (con valores muy similares en ambos). Estos resultados indican que existe una condición de estrés en el animal después de inducir el parkinsonismo con MPTP (Di Domenico y cols., 2010) y posteriormente, administrarle tratamientos dopaminérgicos, en este caso con levodopa. Este mismo fenómeno ha sido descrito recientemente en el modelo de parkinsonismo en ratones C57BL/6 tratados con MPTP (Lee y cols., 2012) pero sin tratamiento con agonistas dopaminérgicos. Asimismo, en pacientes con EA se han descrito niveles elevados de las HSP cerebrales como respuesta al estrés celular (Di Domenico y cols., 2010). Sin embargo, no existe ningún dato de la proteína Hsp-27 (fosforilada o sin fosforilar) en tejido cardiaco de monos parkinsonizados y discinéticos.

3.6.2 TH total y TH fosforilada en SER-40

Otro de los aspectos novedosos de nuestra tesis doctoral son los resultados del análisis de la TH fosforilada en la Ser-40 en ambos ventrículos cardíacos. La TH fosforilada en la Ser-40 está íntimamente ligada a los niveles de AMPc (Kumer y

Vrana, 1996). Cuando estos niveles se incrementan en el tejido cardíaco se produce un aumento de la TH fosforilada en la Ser-40 (Haycock y Haycock, 1991). En el presente estudio hemos comprobado la TH fosforilada en la Ser-40 aumenta de manera significativa en ambos ventrículos cardíacos en los monos tratados con MPTP con respecto a los animales controles. Adicionalmente, en el ventrículo izquierdo de los monos tratados con MPTP y levodopa también se produce un aumento significativo con respecto a los controles, pero en el ventrículo derecho revierte y los niveles de TH fosforilada no alcanzan el umbral de significación (este hallazgo es novedoso y no existe ninguna referencia similar). La interpretación de esta respuesta diferencial entre el ventrículo derecho e izquierdo pudiera ser debida a que la inervación adrenérgica del ventrículo izquierdo es más abundante (su volumen también lo es) y la diferencia solo se evidencia en respuesta al tratamiento con levodopa. La dualidad de respuesta de ambos ventrículos desde el punto de vista anatómico y hemodinámico ha sido descrita previamente en el humano (Cadete y cols., 2012) aunque no existen datos referentes al tratamiento de la levodopa. Asimismo, los datos obtenidos de TH total son semejantes a los comentados para la TH fosforilada: los datos de TH total del ventrículo izquierdo descienden significativamente tanto en los monos tratados con MPTP como en los discinéticos respecto a los controles, pero los datos del ventrículo derecho no alcanzan la disminución significativa de la TH total ni en los monos parkinsonianos ni en los animales discinéticos. A la vista de estos resultados podemos decir que un aumento de la fosforilación de la TH en la Ser-40 podría estar asociado a un aumento de la resistencia de las neuronas DA y a los tratamientos farmacológicos como la levodopa (Salvatore y Pruett, 2012). Este fenómeno no está muy descrito en la literatura en la EP, pero si en células tumorales o en el síndrome de abstinencia a distintas drogas (Aita y cols., 2012; García-Carmona y cols., 2012).

3.6.3 La COMT

Los análisis de la enzima COMT en los dos ventrículos cardíacos en monos parkinsonizados pueden resumirse en base a los resultados de sus dos posibles isoformas:

 i) la COMT soluble en el citosol (S-COMT) mantenía unos niveles muy estables en todos los grupos experimentales: controles, parkinsonizados y discinéticos.

 ii) la COMT unida a la membrana (MB-COMT) estaba significativamente aumentada en el ventrículo derecho de los monos tratados con levodopa con respecto al grupo control, pero no en los MPTP.

En cambio en el ventrículo izquierdo la COMT estaba aumentada muy significativamente en los animales parkinsonizados (tanto tratados como no tratados con levodopa)⁴. Este resultado abre una nueva ventana terapéutica para coadministrar levodopa junto con inhibidores de la COMT a los pacientes con EP (que ya se utiliza en la clínica para alargar la vida de acción de levodopa: entacapone).

3.6.4 NA, NMN y sus ratios por cromatografía líquida

Los análisis por HPLC evidenciaron la disminución significativa de los niveles de NA y un aumento de los niveles de NMN en ambos ventrículos cardíacos en los animales parkinsonizados comparados con los monos controles. Estos resultados concuerdan con los descritos a nivel plasmático en monos parkinsonizados (Goldstein y cols., 2003) y sugieren que la afectación del sistema nervioso autónomo en la EP es más frecuente de lo esperado y en los primeros estadíos es asintomática o de escasa trascendencia clínica (Jain y Goldstein, 2012; Goldstein, 2007). A pesar de ello su valor

⁴ De nuevo se evidencian diferencias entre ambos ventrículos cardíacos debido a su diferente morfología y fisiología.

está matizado por la dificultad de establecer un diagnóstico de probabilidad en estos trastornos en los que no existen marcadores clínicos y la evolución de la enfermedad resulta un dato fundamental (Goldstein y cols., 2011). Estos hechos podrían facilitar en algunos casos más complejos una adecuada orientación diagnóstica, especialmente en pacientes presintomáticos que no presentan aún la clínica típica de la enfermedad, y en aquellos otros en los que se planteen dudas en el diagnóstico diferencial con otros parkinsonismos (Jain y Goldstein, 2012).

4. RESUMEN Y PERSPECTIVAS

Esta Tesis Doctoral describe los siguientes aspectos:

a) la acción de un fármaco antidiscínetico para reducir las discinesias y que no se pierda el efecto antiparkinsoniano de la levodopa.

 b) la definición de los posibles mecanismos implicados en la acción del NO sobre las discinesias en la EP.

c) el efecto neuroprotector del 7-NI sobre las neuronas dopaminérgicas en el estriado.

d) el papel que tiene el NO en los patrones de actividad neuronal en el estriado, GPe y
GPi principalmente y el efecto de su bloqueo reversible con más antagonistas de la
NOSn.

e) La función de las proteínas DARPP-32 (Total y fosforilada) sobre el posible papel del eje Estriado-SN en la EP.

f) El rol de las proteínas implicadas (Hsp-27, TH y COMT) en las alteraciones del tejido cardiaco de monos parkinsonianos y tratados con levodopa. En resumen, los resultados aquí presentados avalan la idea de que las discinesias inducidas por levodopa en un modelo de parkinsonismo experimental, se reducen administrando un inhibidor de la oxido nítrico sintasa neuronal, el 7-NI. Además, se pone de manifiesto el efecto neuroprotector de este inhibidor en las neuronas dopaminergicas del eje estriato-nigral. De esta forma, sería posible analizar la hipótesis aquí planteada de las proteínas DARPP-32 (Total y fosforilada) sobre el posible papel del eje Estriado-SN en la EP. Para estudios futuros se podría coadministrar otros agonistas dopaminérgicos junto al 7-NI.

Por ejemplo agonistas receptores del tipo D3/D2/D1 podrían ser dados de forma continua por vía transdermal (Stockwell y cols., 2009) o agonistas parciales de la dopamina también se podrían ensayar como el SLV308 (Tayarani-Binazir y cols., 2010).

Finalmente, los resultados relativos a las proteínas implicadas (Hsp-27, TH y COMT) en las alteraciones del tejido cardiaco de monos parkinsonianos y tratados con levodopa pueden conllevar la ampliación de este modelo al estudio de funciones electrofisiológicas y al análisis de imagen "*in vivo*", hecho de gran actualidad en el panorama de los síntomas no motores de la EP.

Sin embargo, son necesarios más estudios con series numerosas de pacientes que confirmen todos estos resultados y que incluyeran análisis comparativos entre entidades en las que la existencia de α -sinucleína constituya un dato patogénico fundamental con parkinsonismos de otro origen (taupatías, vasculares, etc.) para encontrar la verdadera especificidad de las exploraciones.

CONCLUSIONES

RATAS: ESTUDIO DE NEUROPROTECCIÓN

1) El 7-NI, inhibidor de la óxido nítrico sintasa, protege la vía nigroestriatal y revierte el comportamiento hemiparkinsoniano en ratas lesionadas con 6-OHDA en el estriado dorsal.

 El 7-NI reduce la fosforilación de DARPP-32, aumentando la concentración de DARPP-32 total en ratas lesionadas con 6-OHDA en el estriado.

3) El NO y sus vías de activación e inhibición desempeñan un papel crucial en el restablecimiento de las funciones de los ganglios basales en la EP.

MONOS: ESTUDIO DE LA EVALUACIÓN DEL PARKINSONISMO Y DE LAS DISCINESIAS

4) La pérdida significativa de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra pars compacta (A9) correlacionó significativamente con el grado de discapacidad motora, pero fue similar en los monos parkinsonizados mediante su intoxicación con MPTP.

5) En el caudado y en el putamen, las expresiones de TH y DAT mostraron una similar pauta de expresión en todos los grupos de monos parkinsonizados.

6) En la VTA (A10) se observó un descenso no significativo de la pérdida de neuronas dopaminérgicas en los distintos grupos de monos tratados con MPTP, no existiendo diferencias entre los distintos tratamientos con levodopa con o sin el inhibidor.

7) Existen unos patrones de degeneración muy similares en el estriado anterior y posterior de los monos parkinsonizados con MPTP, presentando un gradiente rostrocaudal, siendo este más evidente en el caudado que en el putamen.

8) El tratamiento con 7-NI disminuye la severidad de las discinesias en los monos tratados con levodopa, además de tener un efecto antidiscinético, sin restarle funcionalidad a la disminución de la sintomatología clínica inducida por levodopa.

MONOS: ESTUDIO DE LA DENERVACIÓN SIMPÁTICA CARDÍACA

9) En el tejido cardíaco, el tratamiento con MPTP disminuye los niveles de catecolaminas de NA, NMN y dopamina y aumenta la expresión de la proteína TH-40 fosforilada lo cual indica un posible efecto tóxico del MPTP sobre las células cardiacas implicadas en las vías de las catecolaminas.

10) El tratamiento crónico con levodopa revierte la sintomatología parkinsoniana y aumenta la expresión de Hsp-27 fosforilada, la COMT, y la TH-40 fosforilada además del ratio NMN/NA. El efecto cardioprotector en los monos parkinsonizados estaría mediado por el aumento a nivel cardíaco en la fosforilación de Hsp-27.

11) A pesar de los efectos secundarios derivados del tratamiento con levodopa, esta no presenta ningún efecto sobre la denervación simpática cardíaca por lo que su tratamiento debería de extenderse hasta que clínicamente no suponga ningún efecto para el paciente parkinsoniano, sugiriendo que dicho tratamiento tenga como fármacos coadyuvantes algún inhibidor de la COMT.

EUROPEAN MENTION

CONTENTS

1. INTRODUCTION
2. OBJECTIVES AND HYPOTHESIS
3. EXPERIMENTAL PROCEDURES
4. RESULTS
4.1. Results in rats
4.2. Results in monkeys
5. DISCUSSION
6. CONCLUSIONS

1. INTRODUCTION

Idiopathic Parkinson's disease (PD) is a common age-related movement disorder characterized by bradykinesia, rigidity, resting tremor and postural instability. The neuropathological hallmarks of PD are the progressive loss of dopaminergic neurons in the Substantia Nigra pars compacta (SNpc) and the presence of intraneuronal cytoplasmic inclusions Lewy bodies (LB) in some surviving nigral dopaminergic (DA) neurons. The clinical manifestations of PD occur when about 50% of nigral dopaminergic neurons and about 70% of the striatal dopamine are lost (Hornykiewicz and Kish, 1987; von Bohlen Und Halbach, 2004). This loss of DA fibers in the striatum causes disorganization of the activity of the striatal neurons, accompanied by a subsequent alteration of the basal ganglia circuitry with detrimental effects for the patients concerned. Therefore, PD neuropathology suggests neurodegenerative changes that involve neurons in autonomic pathways affecting multiple organ systems (Beach et al., 2010). This in turn may lead to widespread changes in autonomic physiology which if quantified may serve as non-motor markers of PD. Such markers could allow earlier diagnosis and better treatment of PD as non-motor features of PD occur earlier and contribute more to the burden of disease than do motor features (Chaudhuri et al., 2005). We explore cardiovascular autonomic dysfunction measure as physiological manifestations of PD neurodegeneration.

Animal models of PD have proved highly effective in the discovery of novel treatments for motor symptoms of PD and in the search for clues to the underlying cause of the illness. Models based on specific pathogenic mechanisms may subsequently lead to the development of neuroprotective agents for PD that could stop or slow disease progression. The array of available rodent models is large and ranges from acute pharmacological models exhibiting destruction of the dopaminergic nigrostriatal pathway, such as the classical 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in the rodents. Rats with unilateral dopaminergic denervation of the striatum, induced by the lesion of the median forebrain bundle with 6-OHDA, are often used for *in vivo* screening of potential dopamine (DA) agonists or antagonists. The 6-OHDA model can be utilized for the evaluation of either D1 or D2 receptor-driven contralateral turning behaviour that can be induced by directly- acting nonselective or selective dopamine receptor agonists, after the development of a supersensitive response in the dopamine differentiated striatum of the lesioned side (Ungerstedt, 1971a; Robertson and Robertson, 1986; Sonsalla et al., 1988). Furthermore, stimulation by partial DA agonists can also induce contralateral turning in 6-OHDA-lesioned rats (Gerber et al., 1988). Major limitations to the pharmacotherapy of PD are the motor complications resulting from levodopa treatment. Levodopa chronic administration leads to motor complications expressed as fluctuations in clinical responses and the appearance of abnormal involuntary movements, known as levodopa-induced dyskinesias (LIDs) (Jankovic and Stacy, 2007). Effective treatment for LIDs is limited because, although molecular based research has suggested a potential role for several neurotransmitters and receptors (Gottwald and Aminoff, 2011), the mechanisms underlying this phenomenon are still unclear (Jenner, 2008). Dopaminergic stimulation of the denervated striatum is a key mechanism underlying LIDs (Olanow et al., 2008), exacerbating the sensitization process (Nadjar et al., 2009) and inducing activation pathways, which leads to the development of post-synaptic plastic changes in basal ganglia circuits, thus facilitating abnormal involuntary movements (Cenci and Lindgren,

2007). This is probably due to excessive glutamatergic excitation (Chase, 2004) and corticostriatal dendritic spine alterations (Scholz et al., 2008).

Three relatively recent developments have incited thought about whether involvement of the autonomic nervous system provides a window for the early detection of PD. The first is the increased recognition that non-motor manifestations such as dementia, loss of sense of smell (anosmia), REM behavior disorder, orthostatic hypotension and clinical evidence of autonomic dysfunction manifest years before onset of motor signs and sometimes can dominate the clinical picture (Takahashi, 1991). The second is the concept promulgated by Braak (Braak et al., 2003) for a particular pathogenetic sequence based on deposition of α -synuclein in Lewy bodies and neurites. The third is the discovery of cardiac sympathetic denervation in PD (Jain and Goldstein, 2012). Recently, the observed decrease in cardiac uptake of $\begin{bmatrix} 123 \end{bmatrix}$ metaiodobenzylguanidine (MIBG), a physiological analogue of norepinephrine (noradrenaline, NA) on scintigraphy in PD patients, is attracting increasing attention, because this decreased uptake is detectable even before other autonomic disturbances are evident (Yoshita, 1998 and Orimo et al., 1999), thus being potentially useful in early diagnosis of PD. Because this decrease is usually not observed in other degenerative conditions with Parkinsonian syndromes such as multiple system atrophy (MSA), progressive supranuclear palsy (PSP) or corticobasal degeneration (CBD) (Yoshita, 1998; Orimo et al., 2003), it is also useful in the differential diagnosis of PD. Profound depletion of cardiac sympathetic nerve fibers in PD, as demonstrated in previous studies from biopsy specimens (Amino et al., 2005), may account for the decreased cardiac uptake of MIBG.

The neurotoxic chemical agent 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydroxypyridine (MPTP) has been used by several groups to produce animal models of PD (Burns et al.,

197

1983; Heikkila and Sonsalla, 1992). The extent and severity of MPTP neurotoxicity are well known to vary substantially across species and strains (Luthman and Sundstrom, 1990). Although MPTP exposure unquestionably provokes Parkinsonism in humans and other primates (Langston et al., 1983; Langston and Ballard, 1983; Ballard et al., 1985; Bankiewicz et al., 1986; Skirboll et al., 1990; Eberling et al., 1997), it is still unknown whether it produces cardioselective sympathetic denervation. In our work we used western blot and HPLC analysis for measuring cardiac levels of catecholamine and their deaminated metabolites in order to assess cardiac and sympathetic innervation in severe parkinsonized macaque monkeys chronically treated with levodopa.

Substantial evidence demonstrates the involvement of NO in the degeneration of dopaminergic neurons of the nigrostriatal pathway (Duncan and Heales, 2005; Zhang et al., 2006). However, the exact contribution of NO-dependent mechanisms to neurodegeneration is still not completely understood. Nitric oxide (NO) has emerged as a key endogenous modulator of the neuronal function, but its role in the regulation of the activity of striatal neurons and its implication for PD are still unclear. NO is an intracellular and short-lasting reterograde second messenger that is synthesized from Larginine in several brain regions by a reaction catalyzed by NO synthase (NOS) (Ignarro, 1990; Dawson et al., 1991). NOS is located in neurons, perivascular nerves, glial cells and the endothelium (Bredt and Snyder, 1990; Murphy et al., 1993). The family of NOS, the enzymes that induce NO, consists of two different classes: the inducible and constitutive forms (Dawson and Snyder, 1994; Marletta, 1994). Additionally, among the constitutive forms, there are two calcium-dependent NOS (cNOS) isoforms: the neuronal NOS (nNOS) present in neurons, and the endothelial NOS (eNOS) present in both pyramidal cells and endothelial cells (Moncada et al., 1991). Nitrergic mechanisms could contribute to the pathogenesis of LIDs because

nitric oxide (NO), which is synthesized in striatal interneurons by NO synthase (NOS) (Vicent and Kimura, 1992; Kiss and Vizi, 2001; Hara and Snyder, 2007), modulates the striatal function, changing its input-output relationship and producing a functionally significant impact on target neurons (West and Grace, 2004). It has been suggested that: NO synthesis is increased in the basal ganglia following experimental parkinsonism and chronic treatment with levodopa, (Gomes and Del Bel, 2003; Pavon et al., 2006; Chalimoniuk and Langfort, 2007), concomitant with the obsereveable elevation in nitrate and nitrite levels found in the cerebrospinal fluid of PD patients treated with dopaminergic drugs (Molina et al., 1996).

In neuronal cells, striatal NO is synthesized primarily in nNOS-containing interneurons, as revealed with NADPH-diaphorase histochemical staining or nNOS immunohistochemical labelling (Kawaguchi, 1993; Gracy and Pickel, 1997). However despite recent advances in our knowledge, the role of NOS in striatal interneurons is still unclear. Current knowledge seems to point to two postulated roles of striatal interneurons: They may serve to control local blood flow in the striatum by releasing NO, which acts directly on sGC in the vascular smooth muscle to cause vasodilatation. Additionaly, they may produce NO, which can modulate striatal discharge and plasticity either through direct interactions with ligand-gated channels or by influencing surrounding striatal medium spiny neurons (MSNs) via the stimulation of second messenger systems (West et al., 2002). In non-neuronal cells, high levels of NO induce cell death by two different means: (i) energy depletion mediated necrosis, or (ii) oxidative/nitrosative stress mediated apoptosis (Brown and Borutaite, 2002). Importantly, a potent NOS inhibitor, 7-NI, has been successfully tested in dyskinetic rats showing reduced abnormal involuntary movements (AIMs) (Padovan-Neto et al., 2009). In our study we had demonstrated a neuroprotective effect after subchronic

treatment with a specific inhibitor of the NOS, 7-NI in a rat model unilaterally infused with 6-OHDA in the dorsal CPu (Yuste et al., 2012).

7-NI is not a selective nNOS inhibitor since it inhibits eNOS with a similar potency. 7-NI may also inhibit endothelial NOS, and thus limit the availability of levodopa to the brain. Another interesting point is that 7-NI inhibits Monoamine Oxide B (MAO-B) and is able to extend the duration of dopamine produced following levodopa (Di Monte et al., 1997). However, even if dyskinesias developed in rodents are relevant, (Cenci et al., 2002) those developed in non-human primates are remarkably similar to those seen in humans.

Therefore, our aim was to determine whether the administration of 7-NI could be an efficient and safe treatment for reducing LIDs in non-human primates without affecting the therapeutic effect of levodopa.

2. OBJECTIVES AND HYPOTHESIS

2.1. OBJECTIVES

The main objectives of this study are summarized below:

- To detect the protective effects of a subchronic treatment (five days after the lesion) with 7-NI, a specific inhibitor of nNOS, following the neurotoxicity induced by 6-OHDA microinjection in the dorsal CPu of rats.
- 2. To evaluate the antidyskinetic effect of 7-NI in chronically treated levodopa parkinsonian monkeys (*Macaca fascicularis*) which developed different grades of parkinsonism.
- To measure the degree of dopaminergic striatal innervation in post-mortem brains of lesioned macaques in the nigrostriatal pathway after chronic administration of MPTP and to further study the neuroprotective effects of drug therapy with levodopa and 7-NI.
- 4. To analyze a possible role for nitric oxide in the neurotransmitter balance within the basal ganglia in the pathophysiology of experimental parkinsonism.
- 5. To analyze changes in biochemical cardiac levels in the heart tissue of MPTPtreated monkeys that were chronically treated with levodopa.

2.2. HYPOTHESIS

- 3. Treatment with 7-NI will have a possible neuroprotective effect in 6-OHDA lesioned rats. (to explain why).
- 4. 7-NI administration could be efficient in reducing LID in non-human primates without interfering with anti-parkinsonian effect.(to explain why mechanistically)
- 5. NO has a crucial role in the neurotransmitter balance within the basal ganglia in the pathophysiology of experimental parkinsonism.
- 6. To test whether chronic treatment with levodopa may cause temporary autonomic disturbances in MPTP-treated monkeys affecting noradrenergic cardiac innervation.
- 7. To test whether chronic levodopa treatment could produce a cardioprotective effect in the parkinsonian monkeys.

3. EXPERIMENTAL PROCEDURES

3.1 RATS

Sixty-four adult male Sprague-Dawley rats weighing 250–300 g (purchased from Harlan) were housed in groups of four animals per cage in a temperaturecontrolled room (21 ± 1 °C), under a 12-h light–dark cycle, with free access to food and water. All experiments with animals were carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific procedures) Act, 2010, and associated guidelines, and the European Communities Council Directive of November 2010 (2010/63/ECC) for the care and use of laboratory animals. All efforts were made to minimise animal suffering and to reduce the number of animals used in these experiments.

3.1.1 6-OHDA microinjections

Rats were anesthetized with a mixture of ketamine/xylazine (50 mg/kg; 10 mg/kg i.p.) and placed on a stereotaxic frame (Kopf ,Texas Instruments U.S.A). Unilateral striatal lesions were performed by microinjecting 6-OHDA with 0.02% ascorbic acid (4 μ g/ μ l, RBI-Sigma) in 0.9% saline into the right striatum (2 microinjections of 2 μ l each) with a 10 μ l Hamilton syringe, at a rate of 1 μ l/min using a syringe pump model. The concentration of 6-OHDA was selected on the basis of its successful use for inducing lesions restricted to the dorsolateral striatum in the rat, which rotated, in response to treatment with apomorphine (Schwarting and Huston, 1996). To prevent noradrenergic (NA) failure, ten minutes before the 6-OHDA injection, the animals were treated with desmethylimipramine (inhibitor of the high

affinity noradrenaline transport system; 25 mg/kg i.p., Sigma) and pargyline (inhibitor of the monoamine oxidase enzyme; 40 mg/kg i.p., Sigma). The stereotaxic coordinates of the two injections, according to The Rat Brain Atlas of Paxinos and Watson (1998), locating the tooth bar at -2.4 mm, were: (First injection) anterior: 1.20 mm; lateral: 2.5 mm; ventral: -4.5 mm; and (second injection) anterior: 0.48 mm; lateral: 3.4 mm; ventral: -5.0 mm from bregma. Sham-operated control animals (n = 9) were injected with saline (vehicle) instead of the neurotoxin using the same procedure. After the injection, the syringe was left in place for an additional two minutes before removal.

3.1.2 Pharmacological treatment

The 7-NI (RBI-Sigma) administrations started thirty minutes before the stereotaxic surgery. The inhibitor was dissolved in peanut oil and administered for 5 days (one per day) at a therapeutic dose, previously tested in preliminary experiments, thus preventing cataleptic behavior in the animals (15 mg/kg, i.p., x5) (Guevara et al., 2002; Padovan-Neto et al., 2009). Every group, Sham or lesioned, was divided into two subgroups, treated with vehicle (peanut oil) or treated with 7-NI: i) Sham + vehicle (n=9), ii) Sham + 7-NI (n=9), iii) 6-OHDA + vehicle (n=11) and iv) 6-OHDA + 7-NI (n=11). The rats were placed in clean cages on warming pads to recover from the surgery, after which they were returned to group housing (two or three rats per cage).

3.1.3 Behavioural tests

To determine the success of unilateral striatal denervation, rats were injected with apomorphine hydrochloride (0.5 mg/kg s.c., RBI-Sigma) 15 days after the 6-OHDA lesion. The total number of (contralateral) rotations was recorded every 5 min for 45 min (Padovan-Neto et al., 2009). Turns were counted by a rotometer (Ungerstedt and Arbuthnott, 1970) [built in the CAID (Centro de Apoyo a la Investigación y al Desarrollo) of our university]. The behavioral evaluation was performed blindly by the observers. Given that after 6-OHDA lesion small depletions of striatal DA were associated with a lower intensity of rotations with apomorphine (Costall et al., 1976), only animals in the 6-OHDA/Veh group, which exhibited more than 15 total turns contralateral to the side of the 6-OHDA lesion, in 45 min, were included in this study. An additional evaluation with EBST was made to verify the partial striatal lesion (Blandini et al., 2007) and to avoid the behavioral sensitization effects of repeated apomorphine injections. The EBST was performed to evaluate 6-OHDA-treated animals 35 days after the lesion as previously described (Borlongan and Sanberg, 1995). The animals were placed in a Plexiglas box (40 X 40 X 35.5 cm) for 2 min for habituation. Then, each rat was held 3 cm from the base of its tail and suspended approximately 3 cm above the table. In this position the animals start swinging to the right or left side and the number of events counted. Animals must return to the outstretched position for the next swing to be counted. At the beginning, a gentle pinch in the tail may stimulate the behavior. The number of left-biased (L) swings and right-biased (R) swings were counted during a period of 1 minute. Biased swinging behavior was calculated as follows: L (% of total BS for left-biased swings) and R (% of total BS for right-biased swings), Total BS = L+R. All experimental tests were performed at the same time of day.

3.1.4 Tissue preparation

To study the histological effects of the lesion, forty days after the last behavioral screening, 40 animals were deeply anesthetized with a mixture of ketamine/xylazine (50 mg/kg; 10 mg/kg i.p.) and transcardially perfused with PBS 0.01 M (300 ml; pH 7.4) followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M cold phosphate buffer (250 ml; pH 7.4).

The brains were rapidly removed and postfixed in the same fixative for 24 h (4 °C) and then cryoprotected in 30% sucrose/phosphate buffer. Brains were quickly frozen in cold isopentane (-40 °C; Sigma) and stored at -80 °C until further histochemical and immunocytochemical procedures to be carried out.

Drugs and Chemicals

3.1.5 Immunohistochemistry and Histochemistry

Thirty µm-thick serial coronal sections were cut with a cryostat (Leica). After a period of time, adjacent brain sections containing the Caudate-Putamen complex (CPu) nucleus or SNpc were immunostained for Tyrosine Hydroxilase (TH), 32 kDa dopamine and cyclic AMP-regulated protein (DARPP-32) and neuronal Nitric Oxide synthase (nNOS). TH immunohistochemistry was performed as previously described (Barcia et al., 2004), and the same procedure was carried out for nNOS, total DARPP-32 and its phosphorylated Thr-34 analogue. Briefly, tissue sections were rehydrated in PBS pH 7.4 (3 washes) and incubated for 18–24 h with the primary antibody (TH, 1:1000, Calbiochem; NOS1, 1:1000, Santa Cruz; total DARPP-32 and DARPP-32 phospho T34, 1:400, Abcam ab51139 and ab51076, respectively). Sections were processed by the avidin-biotin immunoperoxidase method (Vectastain ABC kit, Vector

Lab) and immunopositive cells were visualized by addition of the chromogen 3,3'diaminobenzidine (DAB; Sigma, 1 mg/ml) and hydrogen peroxide (0.2%v/v). For both DARPP-32, 1% Nickel was added to visualize the cells with enhanced contrast. Sections were mounted on gelatin-coated glass slides (LineaLAB), dehydrated in ethanol, cleared in xylene and cover-slipped for microscopic observations. Cytoplasmic DARPP-32 positive cells were visualized as a blue or dark blue reaction product, respectively, and nNOS and TH as a brown precipitate. In all experiments, tissues from sham and from all lesioned groups were always processed in the same assay.

3.1.6 Western blot analysis

Ten non-lesioned rats groups (Sham/Veh and Sham/7NI) and fourteen 6-OHDA rats groups were killed by decapitation 30 min after the last 7-NI injection. The brains were removed, and the striatum dissected out on an ice-cold surface. The structure was immediately immersed in liquid nitrogen. Samples were placed in homogenization buffer [phosphate buffered saline, 2% sodium dodecylsulfate (SDS) plus protease inhibitors (Boehringer Mannhein, Germany) and phosphatase inhibitors Cocktail Set (Calbiochem, Germany)] and homogenized for 50 s prior to centrifugation at 6000 g for 20 min at 4 °C. Total protein concentrations were determined spectrophotometrically using the bicinchoninic acid assay (Wiechelman et al., 1988). The optimum amount of protein to be loaded was determined in preliminary experiments by loading gels with increasing protein contents (25 to 100 µg) from samples of each experimental group. Equal amounts of protein (50 µg/lane) from each sample were loaded on a 10% SDS–polyacrylamide gel (SDS–PAGE), electrophoresed, and transferred onto a poly vinylidene difluoride (PVDF) membrane using a Mini Trans-Blot Electrophoresis

Transfer Cell (Bio-Rad Lab., California, USA). Non-specific binding of antibodies was mitigated by incubating membranes with 1% bovine serum albumin (BSA) in Tris buffer saline Tween (TBST: 10 mM Tris–HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween 20). Membranes were immunoblotted overnight using selective antibodies against Phospho-Thr34-DARPP-32 (1:1000; Cell Signaling Technology) and Total DARPP-32 (1:1000; Cell Signaling Technology). After extensive washings with TBST, the membranes were incubated for 1 h, at room temperature, with peroxidase-labeled secondary antibodies (anti-rabbit sc-2004 for DARPP-32 phosphorylated at Thr-34 and Total DARPP-32, at 1:2000 dilutions). After washing, immunoreactivity was detected with an enhanced chemiluminescent/chemifluorescent western blot detection system (ECL Plus, GE Healthcare, U.K) and visualized by a Typhoon 9410 variable mode Imager (GE,Healthcare U.K). Antibodies were stripped from the blots by incubation with stripping buffer (glycine 25mM and SDS 1%, pH 2.0), for 1 h at 37 °C. Anti β -actin was used as a running control (Cell Signaling, 45 kDa). The ratio of total DARPP-32/ β -actin concentration was plotted and further analyzed.

3.1.7 Quantitative methods

3.1.7.1 Immunohistochemistry and Histochemistry

The whole histological quantification was performed blindly. Neuroanatomical sites (Dorso-lateral striatum and SNpc) were identified using the Paxinos and Watson (1998) Rat atlas. The antero-posterior (AP) localization of the analyzed dorsolateral striatum area was AP: 1.20 mm from bregma.

Images of immunostained neurons were captured from slices using a computerassisted image analysis system (ImageJ 1.43 Analysis software; rsb.info.nih.gov/ij/) that was connected with a Zeiss microscope mounted to a digital camera (CoolSnap) using a 10 x objective with a 0.1 x adapter (Barcia et al., 2004). The loss of dopaminergic fibers in the dorso-lateral striatum was analyzed by measuring the optical density of the TH immunoreactivity with ImageJ software. The optical density of a tissue area devoid of staining (corpus callosum) was measured, adjusting the light intensity to give a background density value. For background correction, the background was subtracted from all subsequent measurements. A mean value for staining intensity was calculated and expressed on arbitrary gray scale as relative optical density units (ROD units) (Echeverry et al., 2004). The boundary of SNpc was outlined under magnification of a 4X objective (Zeiss). Cells were counted with a 40X oil-immersion objective using a Nikon 80i microscope.

Serial sections through the whole SNpc were placed 6 per slide ((30μ m-thick) for systematic analysis of randomly placed counting frames (size 50 x 50 μ m) on a counting grid (size of 190 x130 μ m) and sampled using an 18 μ m optical dissector with 2 μ m upper and lower guard zones. The nNOS labeled neurons were quantified in the dorsolateral region of the striatum. For quantification of labeled neurons and cytoplasmic DARPP-32, an average number from a fixed size/area of the dorsolateral part of caudate nucleus was observed. For each treatment, three sections from each animal were evaluated. A mean value for the number of cells in the three regions of the animal was then calculated.

3.2 MONKEYS

All studies were carried out in accordance with the guidelines promulgated by the European Convention for the protection of Vertebrate Animals used for
Experimental and other scientific purposes of the Council of Europe (nº 123, September 22th, 2010) and the European Communities Council Directive 2010/63/ECC. Monkeys were supervised by veterinarians and technicians skilled in the health care and maintenance of non-human primates. The animals were housed in primate cages under controlled conditions of humidity, light and temperature, and food (Masuri primate diet; Scientific Dietary Services, UK); fresh fruit and water were available ad libitum. Experiments were performed with 9 adult males cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis, 3.8 – 4.5 kg) (purchased from R.C. Hartelust BV, The Netherlands) which were rendered parkinsonian with MPTP-hydrochloride (Sigma, 0.3-0-4 mg/kg i.v. for 7 months; 1 injection every 2 weeks) as previously described (Barcia et al., 2004). None of the animals had been previously used in other studies. After reaching stable Parkinsonism, the monkeys were daily treated with Madopar® (Riahi et al., 2011; Ouattara et al., 2010) (100 mg levodopa and 25 mg benserazide (Roche); v.o; ratio 4:1) (termed levodopa hereafter) for 4 months until they developed stable and moderatesevere LIDs. 25 mg/kg of the NOS inhibitor (7-NI; Sigma-Aldrich) was dissolved in peanut oil solution, and subcutaneously administered to three monkeys every day 45 min prior to each levodopa injection during 5 days. This working dose (25 mg/Kg) was chosen based on previous work by Hantraye and co-workers (Hantraye et al., 1996) who treated monkeys with this inhibitor.

3.2.1 Drugs and chemicals

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) hydrochloride was purchased from Sigma-Aldrich. Madopar[®] was purchased from Roche, (levodopa/benserazide, ratio 4:1(v/v)). NOS inhibitor (7-NI; purchased from RBI- Sigma) was dissolved in peanut oil solution (from RBI-Sigma)). All solutions and drugs were prepared immediately before use and given at a volume of 2 mL/kg body weight.

3.2.2 Behavioural assessments and clinical study

The level of Parkinsonism was assessed with a previously described (Herrero et al., 1993) motor scale which evaluates the following symptoms: akinesia/bradykinesia, freezing, tremor, self-feeding, posture and spontaneous activity (maximum disability score of 25). Parkinsonian disability was assessed at the end of each session in order not to interfere with the assessment of general activity levels. All 3 monkeys reached similar stable parkinsonism levels. The intensity of dyskinesia was rated for each body segment (face, neck, trunk, arms and legs) every 30 min using a Dyskinesia Disability Scale (maximal score of 21 points) (Hadj Tahar et al., 2004). The dyskinetic score obtained was the sum of the scores for all body segments. Each monkey was evaluated several times with the Dyskinesia Disability Scale after levodopa injection, and averaged for the intensity of LIDs, Dyskinesia duration as the area under curve. Dyskinesias were charecteristically choreic but dystonia was also observed. Stereotypes or licking were not considered as dyskinesias. The animals were placed in special observation cages for video recording and the dyskinetic score was blindly evaluated with or without 7-NI co-administration.

3.2.3 Monkey tissue processing

After a lethal overdose of anaesthetic (pentobarbital sodium, 150 mg/Kg), the **brains** of the monkeys were removed quickly from the skull and the hemispheres were separated. The right hemisphere of each brain was divided into blocks that were post-

fixed for 3 days [4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS)] and then cut on a freezing microtome in serial, free-floating 40 µm-thick transverse sections.

3.2.3.1 TH immunohistochemistry in the Substantia Nigra (SN)

Fresh-frozen, cryostat-cut, 40-µm-thick slide-mounted mesencephalic sections were processed for TH immunohistochemistry and then counterstained with cresyl violet (Nissl staining) as previously described (Bezard et al., 2003a; Bezard et al., 2001). Cell counts were performed using a computer-based image analyzer (Biocom, Visioscan v4.12, Les Ulis, France). The boundaries of the SNpc were chosen on three consecutive sections corresponding to a representative median plane of the SNpc for examination of the size and shape of the different TH-ir neuronal groups as well as the cellular relationships to axonal projections and nearby fiber bundles.

The number of both TH-ir and Nissl-stained neurons in the SNpc representative plane was calculated three times by one blind examiner with regard to the experimental condition. Mean and SEM cell number per plane were calculated for each group of monkeys.

3.2.3.2 TH and DAT immunohistochemistry in the Striatum

Forty micrometer coronal sections, cut on a freezing microtome, were collected in 0.1M PB, containing 30% sucrose and 30% ethylene glycol, and stored at -80°C. Sections through the striatum were thoroughly washed in 0.1 M PB to remove the cryoprotectant and incubated in 10% normal horse serum with 0.04% Triton X-100 in PB for 30 min. They were then incubated for 72 hr in the same solution containing primary antibody against either TH (1:500, rabbit polyclonal antibody, Pel-Freeze Biologicals; 1:1000, rabbit polyclonal antibody, Eugene Tech; 1:2000, mouse monoclonal antibody, Chemicon) or the dopamine transporter (DAT; 1:125, rat monoclonal antibody) (Miller et al., 1997). The sections were then rinsed in 0.1M PB and incubated for 2 h in a combination of secondary antibodies. Finally, the sections were rinsed in 0.1 M PB, mounted on gelatin-coated slides, and coverslipped using Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). The immunoreactivity for TH⁺ and DAT⁺ was visualized using a Vector Avidin–Biotin complex (ABC) kit (Vector Laboratories, Burlington, CA, USA) with diaminobenzidine (DAB; Sigma) as a chromogenand counterstained with cresyl violet.

3.2.4 Data analysis

DA depletion was evaluated by measuring the optical density of TH-ir fibres in the striatum with a computer-based system (ImageJ Ver1.41). Statistical analysis was performed using a one-factor or two-factor ANOVA (analysis of variance) (clinical state factor: control or MPTP-treated; striatal region factor: caudate nucleus, putamen or accumbens nucleus) followed by Newman-Keuls *post hoc* analysis. A *P* value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

3.3 SYMPATHETIC CARDIAC DENERVATION

Six monkeys were rendered parkinsonian by treatment with MPTP hydrochloride (Sigma, 0.3-0-4 mg/kg i.v. for 7 months, 1 injection every 2 weeks) as previously described (Barcia et al., 2004). The rest of the monkeys (n=3) were treated with saline. Animals were sacrificed by sodium pentobarbital overdose (150 mg/kg, i.v.) 90 min after the last levodopa dose and the hearts were quickly removed after death.

Each heart was bisected along the coronal axis, and half of each heart containing right and left structures respectively was immediately frozen with dry ice and then stored at -80° C.

3.3.1 Western Blot analysis

Samples from both ventricles were extracted and analysed separately. Western blot analysis was performed in order to measure total and phosphorylated Hsp-27, total and phosphorylated TH and COMT protein levels. Samples were placed in homogenization buffer [phosphate buffered saline, 2% sodium dodecylsulfate (SDS) plus protease inhibitors (Roche, Germany) and phosphatase inhibitors Cocktail Set (Calbiochem, Germany)] and homogenized for 50s prior to centrifugation at 6000 g for 20 min at 4 °C.

Total protein concentrations were determined spectrophotometrically using the bicinchoninic acid method (Wiechelman et al., 1988). The optimum amount of protein to be loaded was determined in preliminary experiments by loading gels with increasing protein contents (25 t- 100 µg) from samples of each experimental group. Equal amounts of protein (50 µg/lane) from each sample were loaded on a 10% SDS– polyacrylamide gel (SDS–PAGE), electrophoresed, and transferred onto a poly vinylidene difluoride (PVDF) membrane using a Mini Trans-Blot Electrophoresis Transfer Cell (Bio-Rad Lab., California, USA). Non-specific binding of antibodies was mitigated by incubating membranes with 1% bovine serum albumin (BSA) in Tris buffer saline tween (TBST: 10 mM Tris–HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween 20). The blots were incubated at 4 °C (for total Hsp-27 and Hsp-27 phosphorylated at Ser82) or phosphorylated TH in Ser 40 and COMT, with the following primary

antibodies: polyclonal anti-total Hsp27 antibody (1:500; sc-1048, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); polyclonal antiphospho Ser82 Hsp27 (1:400 dilution; ab39399, Abcam, USA), or monoclonal anti-COMT (1:5000; AB5873, Chemicon International, MA, USA) in TBST with 1% BSA. After extensive washings with TBST, the membranes were incubated for 1 h, at room temperature, with peroxidase-labeled secondary antibodies (anti-goat sc-2350 for total Hsp27; anti-rabbit sc-2004 for Hsp27 phosphorylated at Ser82; for COMT, Chemicon; antimouse sc-2005 at 1: 5000 dilutions). After washing, immunoreactivity was detected with an enhanced chemiluminescent/chemifluorescent western blot detection system (ECL Plus, GE Healthcare, UK) and visualized by a Typhoon 9410 variable mode Imager (GE Healthcare). Antibodies were stripped from the blots by incubation with stripping buffer (glycine 25mM and SDS 1%, pH=2), for 1 h at 37 °C. Anti- β actin (Cell Signaling, 45 kDa) was used as a running control.

The ratio of concentration of total Hsp27/ β -actin, phospho-Hsp27/ β - actin, phospho-TH/ β -actin and total TH/ β -actin was plotted and analysed. Quantifications of immunoreactivity corresponding to total Hsp27 (27 kDa), Hsp27 phosphorylated at Ser82 (28 kDa), (Soluble-COMT) S-COMT and (Membrane-COMT) MB-COMT (25 and 30 kDa) bands were carried out by laser densitometry (AlphaImager, Nucliber, Madrid). In each instance, a measure of the the integrated optical density of bands was quantified and evaluated. The values were expressed in units of pixel gray levels are proportional to the light intensity on a particular pixel during image exposure . The optical density was then normalized to the background values. Relative variations between bands of experimental samples and control samples were calculated for the same image.

3.3.2 HPLC analysis

Noradrenaline and its metabolite normetanephrine were determined by highperformance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection. Each tissue was weighed, placed in a dry-cooled propylene vial and homogenized with a Polytron-type homogenizer (setting 4 for 50 s) in 1.5 ml of perchloric acid (0.1 M). The homogenates were centrifuged (8000 g, 4° C, 15 min), the supernatant layer was removed into a 1-ml syringe, filtered through a 0.45 mm filter (Millipore, Bedford, USA) and centrifuged (6000 g, 4° C, 20 min) again using Ultrafree MC 0.2 (Millipore). From each sample, 10 µl was injected into a 5 mm C18 reverse phase column (Waters, Milford, MA, USA) through a Rheodyne (Rheodyne, Cotati, CA, USA) syringe loading injector attached to a 200 µl loop. Electrochemical detection was accomplished with a glass carbon electrode set at a potential of +0.65mV with respect to the Ag/AgCl reference electrode (Waters). The mobile phase consisted of a 95:5 (v/v) mixture of water and methanol with sodium acetate (50 mM), citric acid (20 mM), l-octyl-sodium sulfonate (3.75 mM), di-n-butylamine (1 mM) and EDTA (0.135 mM), adjusted to pH 4.3. The flow rate was 0.9 ml/min, and chromatographic data were analysed with Millenium 2010 Chromatography Manager Equipment (Millipore). Noradrenaline, normetanephrine, and DA were simultaneously detected by the described HPLC method at an elution time of 4.25 and 7.32 min, respectively. Noradrenaline and normetanephrine were quantified and referenced to calibration curves that were run at the beginning and the end of each series of assays. The content of noradrenaline and normetanephrine in the right and left ventricle were expressed as ng/mg wet weight tissue.

4. **RESULTS**

4.1 **RESULTS IN RATS**

4.1.1 7-NI reverts to parkinsonian behavior in 6-OHDA-lesioned rats

The treatment with apomorphine induced contralateral rotations in 6-OHDAlesioned animals but not in control animals. However, a significant decrease in the number of rotations was observed in the animals treated with 7-NI with respect to those treated with the vehicle alone (control animals did not show any rotations (Sham/Vehicle, n = 4; Sham/7-NI, n = 5) (ANOVA, $F_{(3,19)} = 20.70$, P < 0.001) (Fig. 1, panel A). Although stereotyped behavior may be observed as a typical response to the lesion in the striatum of the rat (Iversen and Koob, 1977; Olds et al., 1999), in our animals no significant differences were observed between the experimental groups (*data not shown*). The percentage of left-biased swings measured by EBST five weeks after the striatal-lesion was significantly higher than in Sham rats (Duncan, P<0.05). 6-OHDA/Vehicle animals showed more than a 70% increase in the number of left-biased swings compared with Sham animals. A not significant decrease was observed in 6-OHDA/7-NI animals (Duncan, P > 0.05) (Fig. 1, panel B).



Figure 1: (A) Number of apomorphine-induced turns, 15 days after lesion, were significantly lower in the 6-OHDA/7-NI group than in the 6-OHDA/Veh group. (B) Left-biased swings measured by EBST 35 days after lesion in the 6-OHDA/Veh group were increased by 70% compared with Sham animals. * P < 0.05 lesioned animals vs. Sham groups (ANOVA followed by the Duncan test).

4.1.2 7-NI reduces nNOS striatal expression in 6-OHDA-lesioned rats

There was a significant effect of 7-NI treatment on nNOS striatal expression in lesioned rats (ANOVA Repeated Measures, $F_{(3,15)} = 3.52$, P = 0.041). The density of nNOS-immunoreactive positive neurons in the 6-OHDA/Vehicle group increased in the lesioned-dorsolateral striatum compared with Sham groups but it was partially reverted in the 6-OHDA/7-NI group (ANOVA, $F_{(3,16)} = 6.63$, P < 0.005) (Fig. 2, panel B).



Figure 2: Increase of striatal nNOS was reverted by 7-NI. (A) Photomicrographs show nNOS labeling in the dorsolateral striatum. (B) An increase of nNOS⁺ cells was observed in the 6-OHDA/Veh group with respect to Sham animals and was slightly lower in the 7-NI treatment (6-OHDA/7-NI). * P < 0.05 6-OHDA vs. Sham groups, and # P < 0.05 6-OHDA/7-NI vs. Sham/Veh (ANOVA followed by the Duncan test).

4.1.3 7-NI protects the nigrostriatal pathway in 6-OHDA-lesioned rats

Histological analyses were carried out in the lesioned dorsolateral striatum and in the ipsilateral SNpc area. Previously, an analysis of both sides was performed. In the dorsolateral striatum region, an interaction (ANOVA Repeated Measures, $F_{(3,16)} = 3.31$, P = 0.047), and effect in treatment factor was observed (ANOVA Repeated Measures, $F_{(3,16)} = 5.08$, P = 0.012). Densitometry analysis revealed a significant reduction of TH⁺ fibers in the lesioned-dorsolateral striatum of 6-OHDA rats. However, a significant effect was observed in the 6-OHDA/7-NI group (ANOVA, $F_{(3,19)} = 23.42$, P < 0.001) (Fig. 3, panel A-B).



Figure 3: (A) Photomicrographs showing the distribution of TH^+ fibers in the dorsolateral striatum in the different experimental groups 45 days post-lesion. Schematics illustrations of the analyzed coronal section are shown on the right. (B) The treatment with 7-NI moderately attenuated the loss of TH^+ fibers in 6-OHDA-lesioned animals. Results are expressed as the mean \pm SEM of TH optical density.

Using the ImageJ software we measured the lesioned striatal area (DA terminal loss) on the lesioned side, and data were expressed as the percentage of each area (lesioned or intact) with respect to the total dorsolateral area. The percentages obtained were Sham/Veh: No lesion: 100%, Sham/7-NI: No lesion: 100%, 6-OHDA/Veh: No lesion: 15.5%; Lesion: 84.5% and 6-OHDA/7-NI: No lesion: 37.2%; Lesion: 62.8%. Besides, there was a significant negative correlation between the expression of striatal TH⁺ fibers and rotational behavior ($\mathbf{r} = -0.869$, P < 0.01) (*data not shown*). We designed an analysis of the SN, but only significant differences in TH⁺ neurons staining were detected in SNpc, and no significance in the other (SN_{lat} and SN γ) groups analyzed

(ANOVA, $F_{(3,15)} = 3.24$, P > 0.05) (Fig. 4, panel A). In the SNpc region (but not in SN_{lat} and SN γ), a decrease in TH⁺ neurons was seen in 6-OHDA/Vehicle animals compared with Sham/vehicle and 6-OHDA/7-NI groups (ANOVA, $F_{(3,15)} = 3.24$, P< 0.05; Duncan, *P*< 0.05) (Fig. 4, panel B). These changes were observed in the SNpc, which projects towards the dorsolateral striatum.



Figure 4: TH⁺ neurons in the ventral mesencephalon in a section containing the intra-axial portion of the third cranial-nerve. (A) Graph showing the count of TH-immunoreactive positive neurons in the 3 areas of the SN (SNpc, SN γ and SN_{lat}). The three different regions, analyzed of the SN are indicated in the scheme localized on the right of the panel (SN localized at AP -5.80 mm from bregma). (B) We found only a significant difference in the SNpc with respect to other areas (ANOVA, F_(3,15) = 3.24, post-hoc Newman-Keuls). **P*<0.05, 6-OHDA/Veh *vs*. Sham/Veh and 6-OHDA/7-NI. OD: Optical Density, ROD units: Relative Optical Density units.

4.1.4 7-NI reduces DARPP-32 phosphorylation in 6-OHDA-lesioned rats

To accurately determine the increase in DARPP-32⁺ cell numbers in pathophysiological stages in *postmortem* brain, it was important to establish a positive control for its quantification in a non-involved brain area. In all the sections we analyzed the motor cortex immediately above the striatum, (Fig. 5-6, panel A) (Ouimet et al., 1984; Ouimet et al., 1998), for both total DARPP-32 and phosphoThr-34-DARPP-32. Analysis with pospho-Thr34-DARPP-32 showed an interaction between both factors (ANOVA Repeated Measures, $F_{(3,16)}$ = 5.15, P = 0.011). In lesioneddorsolateral striatum, the number of pospho-Thr34-DARPP-32 cells revealed an increase in the 6-OHDA/Vehicle group, which was significantly diminished in the 6-OHDA - lesioned group treated with the nNOS inhibitor (ANOVA, $F_{(3,16)} = 4.62$, P< (0.01) (Fig. 6, panel C). An opposite effect was observed in the total DARPP-32⁺ cell number. Previously, an interaction between both factors was observed (ANOVA Repeated Measures, $F_{(3,16)} = 21.53$, P < 0.001), and also an effect on the treatment factor (ANOVA Repeated Measures, $F_{(3,16)} = 19.89$, P < 0.001). In lesioned-dorsolateral striatum, DARPP-32⁺ cells decreased in the 6-OHDA/Vehicle group, whereas a significant increase was also found in the 6-OHDA/7-NI group (ANOVA, $F_{(3,17)} = 27.4$, P < 0.001; Duncan, P < 0.05) (Fig. 5, panel C). Furthermore, a significant correlation was seen between the levels of phospho-Thr34-DARPP-32 and total DARPP-32 which suggests consumption of the total DARPP-32 phosphorylated by NO-mediated mechanisms (data not shown). This means that PKG (via NO) phosphorylated total DARPP-32 with an increase phospho-Thr34-DARPP-32. Thus, these results demonstrate a correlation between the state of phosphorylation of DARPP-32 and the

nNOS –expressing cell numbers in the lesioned striatum based on the previous results shown.



Figure 5: Total DARPP-32 in the dorsolateral striatum is reduced by intrastriatal 6-OHDA injections and up-regulated by the ulterior 7-NI treatment. (A) Photomicrographs showing cytosolic DARPP-32 labeling in Motor Cortex (arrowheads), and Caudate-Putamen. (B) Photomicrographs showing an overall expression of total DARPP-32⁺ cells in 6-OHDA/7-NI group compared with the other experimental groups. The quantification in the dorsolateral striatum showed a decrease in 6-OHDA/Veh and a striking increase in the 6-OHDA/7-NI group (C) * P < 0.05 with respect to Sham groups (ANOVA followed by the Duncan test).



Figure 6: (A) Photomicrograph showing cytosolic **Phospo-Thr34-**DARPP-32 labeling (arrowhead) in Motor Cortex, and Caudate-Putamen. (B) Photomicrographs showing an increased expression in 6-OHDA/Veh group compared with the other experimental groups. Quantifications of the Phospho-Thr34-DARPP-32 revealed a significant increase in 6-OHDA/Veh group that is prevented by 7-NI treatment (C) * P < 0.05 6-OHDA *vs.* the other groups (ANOVA followed by the Duncan test).

4.1.5 7-NI reduces values of phospho-DARPP-32 and increases total DARPP-32 in 6-OHDA-lesioned rats by Western Blot analysis

Striatal Phospho-Thr43-DARPP-32 and total DARPP-32 immunoblots were examined by Western blot analysis in control treated with 6-OHDA/Vehicle and treated with 6-OHDA+ 7-NI in all the groups. As regards DARPP-32, this was detected in a band located at ~ 32 kDa. The protein quantifications showed that in rats treated with 6-OHDA/7-NI, the total DARPP-32 protein increased significantly with respect to and 6-OHDA treated groups (ANOVA, post-hoc Newman-Keuls, P < 0.01, Fig. 7). Similar results were obtained by immunohistochemistry showing an overall expression of total DARPP-32⁺ cells in 6-OHDA/7-NI group compared with the other experimental groups) (Fig. 5). The opposite effect was observed in the phospho-Thr34-DARPP-32, which increased in the 6-OHDA/Vehicle group with respect to controls animals (One Way ANOVA, post-hoc Newman-Keuls, P < 0.01, Fig. 8). These data are consistent with those obtained by immunohistochemistry, giving more accurate estimates to support our results.



Figure 7: Normalized values with β -actin were compared with those of Sham or 6-OHDA treatment groups. ** *P*<0.01, 6-OHDA/Veh *vs*. Sham groups and *** *P*<0.001, 6-OHDA/Veh *vs*. 6-OHDA/7-NI (One way ANOVA followed by Newman-Keuls *post hoc* test).



Figure 8: Normalized values with β -actin were compared with those of Sham or 6-OHDA treatment groups. ** *P*<0.05 6-OHDA/Veh *vs.* Sham groups and 6-OHDA/Veh *vs.* 6-OHDA/7-NI (One way ANOVA followed by the Newman-Keuls post-hoc test).

4.2 **RESULTS IN MONKEYS**

4.2.1 CLINICAL EFFECT OF 7-NI TREATMENT IN DISKYNETIC MONKEYS

The anti-parkinsonian effect of levodopa was similar in all three monkeys whose disability motor scores compared with their stable parkinsonian state improved very significantly (Fig. 9). Levodopa administration resulted in the rapid development of LID in MPTP-treated monkeys, which showed its highest peak about 90 min after treatment and then gradually declined over the 220 min period. 7NI co-treatment decreased dyskinesias after initial drug administration.



Figure 9: Disability motor score values of the 3 animals (M1, M2 and M3) and its average in three different pharmacological states: i) Prior to levodopa treatment Stable Parkinsonism (SP), ii) after levodopa treatment and iii) after levodopa + 7-NI co-administration. A decrease in the motor score in both levodopa treated groups with respect to SP (*** P<0.001, One-way ANOVA, Friedman test) is observed.



Monkeys were treated with a dose of 25 mg/Kg of 7-NI during 6 weeks after the start of levodopa treatment. There was a significant reduction in LIDs from 2 weeks after the treatment until the end of the experiment (Fig. 10). The daily time- course studies show that there was no loss in the beneficial effect of 7NI against LID over three different periods in time of: 2, 4 and 6 weeks (Fig. 10, panel A-C).

Figure 10: Daily time course of LID scores with 7NI co-treatment in moderatelysevere parkinsonian monkeys. LIDs were assessed every 30 min for the period of observation (~ 220 min). LIDs performance was significantly decreased over the entire 2h time period when compared to levodopa (+) 7NI co-administration monkeys group to (+)levodopa treated group from week 2 onwards. The reduced LID scores due to levodopa + 7NI co-treatment was maintained for 45 days. The values represent the mean \pm SEM of 3 monkeys. (*P< 0.05, **P< 0.01 and ***P< 0.001). Two-way repeated ANOVA followed by a Bonferroni *post-hoc* test.

4.2.2 Individual dyskinetic profiles in the monkeys with levodopa and 7-NI CO-treatment

Levodopa-treated animals showed a dyskinetic profile with a highest score (peak-dose) at 80-100 min and finishing at 190-200 min (Fig 11, panel A). As previously shown in this work, 7-NI co-administration preserved the beneficial antiparkinsonian effect of levodopa treatment without significant differences in the disability motor score (P > 0.05) (Fig. 9). 7-NI, also dramatically decreased the intensity (Fig. 11, panel B) and duration (Fig. 11, panel C) of the dyskinesias, reducing the profile by more than 50%. Analyses of the time course and overall dyskinetic response (AUC) showed that 7-NI significantly reduced LIDs (P< 0.001) (Fig. 11, panel



Figure 11: Each column represents the data of each monkey (M1, M2 and M3). (A) **Dyskinetic profile of each monkey with and without 7-NI treatment showing the intensity** (dyskinesias score) and duration (min) in the 3 monkeys (M1, M2, and M3) with levodopa with and without 7-NI co-administration. (B) **Average intensity of LIDs**. For each monkey and for each treatment (only levodopa or levodopa + 7-NI) we performed five different measures which were similar and consistent for each monkey as well as for all the monkeys. 7-NI significantly reduced the average intensity of LIDs over the time course: M1 without (9/21) and with (4/21) 7-NI co-treatment, M2 without (7/21) and with (1/21) co-treatment and M3 without (6/21) and with (3/21) 7-NI co-treatment, (t-test M1 and M3 ***P*<0.01, levodopa *vs.* levodopa + 7-NI and M2 ****P*<0.001, levodopa *vs.* levodopa + 7-NI) and (**C) Dyskinesia duration in minutes.** For each monkey and for each levodopa treatment (with or without 7-NI) we performed

five different measures that showed consistent results in each monkey as well as between all monkeys in each group.

The duration of dyskinesias in MPTP-treated monkeys with/without 7-NI treatment were: M1 without (200 min) and with (130 min) 7-NI co-treatment, M2 without (200 min) and with (135 min) 7-NI co-treatment and M3 without (200 min) and with (140 min) 7-NI co-treatment (t-test M1, M2 and M3 ***P<0.001, levodopa *vs.* levodopa + 7-NI). (**D**) Area under curve (AUC). For each monkey and for each treatment (only levodopa or levodopa + 7-NI) we performed five different measures that were similar and consistent in each monkey as well as between monkeys in each group. The AUC, a measure that encompasses both intensity and duration of the LIDs, was significantly reduced with 7-NI co-administration for each monkey (Paired t-test, M1 **P<0.01, levodopa + 7-NI and M3 ***P<0.001, levodopa + 7-NI ws. levodopa without 7-NI). These data are expressed as the mean AUC ± SEM between 0 and 200 min in each monkey.

Monkey 1 which received 9 injections of MPTP over a period of 4.5 months, developed significant bradykinesia, rigidity and freezing after the third MPTP injection. After the fifth MPTP injection resting tremor in the upper limbs also appeared, and it showed a transient dystonia in the inferior limbs and in the oro-mandibular area, which disappeared after the eighth MPTP injection. After 4 months of levodopa treatment they showed stable body trunk dyskinesias, hand stereotypies, jerking motions and dystonic postures of lower limbs and tail. Fast choreic movements appeared 10 min after levodopa administration, lasting 200 min, and reaching the peak-dose at 110-120 min (intensity 17/21). From the first co-administration with 7-NI, the dyskinetic profile changed, becoming significantly shorter (finishing at 145 min) (P<0.001) (Fig. 11, panel A-C) and reaching the peak-dose at 60 min with a score of 6/21 (P<0.001) (Fig. 11, panel B-C).

Monkey 2 also received 9 injections of MPTP over 4.5 months. It developed rigidity, severe bradykinesia and slight tremor in upper limbs, and occasionally in the head. On several occasions following MPTP injection abnormal movements of the mouth (repeated chewing) were observed. After 4 months of levodopa treatment, stable choreic movements of the whole body, but especially in the lower limbs appeared 10-15 min after levodopa administration lasting 200 min, and reaching the highest peak-dose at 120 min (intensity 14/21) (Fig. 10, panel A). From the first co-administration with 7-NI, the duration of dyskinesias was significantly shorter (finishing at 145 min) (P<0.001) (Fig. 11, panel A), reaching the peak-dose at 60 min with a maximal score of 5/21 (P<0.001) (Fig. 11, panel B-C).

Monkey 3 received 15 injections of MPTP during a period of 6 months. Some vegetative symptoms were observed immediately after each dose but the animal returned to a normal state within 24 h. It showed rotational behaviour after the fourth MPTP injection. Bradykinesia, rigidity, freezing, and tremor in the upper limbs, and oromandibular dystonia appeared after the seventh dose of MPTP. After 4 months of levodopa treatment stable choreic movements of all the body, especially evident in the lower limbs which presented a toe twist, appeared 10-15 min after levodopa administration, lasting 200 min, and reaching the highest peak-dose at 90 min (intensity 14/21, Fig. 11, panel A). From the first co-administration with 7-NI, the duration of dyskinesias was significantly shorter (finishing at 150 min) (P<0.001) (Fig. 11, panel A) reaching the peak-dose at 60 min with a maximal score of 8/21 (P<0.001) (Fig. 11, panel B-C).

4.2.3 POSTMORTEM ANALYSIS

4.2.3.1 Number of dopaminergic cells in SNpc and VTA

A marked and significant loss of dopaminergic neurons was observed in the SNpc (A9 region) of all MPTP-monkeys (60% cell loss approximately). No significant differences were observed between levodopa groups, indicating that levodopa does not alter the survival of dopaminergic cells in the SNpc. In the VTA area (A10 region) dopaminergic neurons showed a slight decrease in all groups treated with MPTP (both with levodopa as with 7-NI) compared with the control group without reaching statistical significance (Fig. 12).





Figure 12: Neuronal loss in the mesencephalon. Number of TH+ neurons in midbrain hemisections immunostained for TH at the level of the third cranial nerve in the substantia nigra *pars compacta* (A9) in the different groups of monkeys: Control, MPTP, MPTP + L-DOPA y MPTP + L-DOPA + 7-NI. All MPTP treated groups showed a significant decrease compare with the vehicle treated groups. ***P<0.001). One-way ANOVA, P<0.01, *post-hoc* Newman-Keuls.

4.2.3.2 TH and DAT immunoreactivity in the striatum

A reduction in the immunoreactivity levels of two dopaminergic presynaptic markers (TH and DAT) was observed in the striatum of all MPTP-treated monkeys (Fig. 13, Fig. 15). Anterior (ac +2mm) and posterior (ac -4mm) striatal sections were separately analyzed. In the anterior striatum (head of caudate and putamen) the density of TH-ir (immunoreactive) neurons in levodopa-treated monkeys was decreased twofold with respect to control animals (P = 0.034). Thus, in the control monkeys, optical density (O.D) of TH-ir fibers in the anterior striatum was 86.6 ± 2.8 , while that in the levodopa groups this decreased to 24.1 ± 8.6 units of O.D (Fig. 13-14)



Figure 13: Optical density (O.D) of TH-ir for dopaminergic fibers at the head of the anterior caudate nucleus. All groups (control, MPTP alone, MPTP + levodopa and MPTP + levodopa + 7-NI) were analyzed. There were significant differences when we compared all groups with control group (** P <0.01 and *** P <0.001). (One-way ANOVA, P <0.01, *post-hoc* Newman-Keuls). hCd = head of caudate, ac = anterior commissure.



Figure 14: Optical density (O.D) of TH-ir for dopaminergic fibers at the head of the anterior caudate nucleus. All groups (control, MPTP alone, MPTP + levodopa and MPTP + levodopa + 7-NI) were analyzed. There were significant differences when we compared all groups with control group (** P <0.01 and *** P <0.001). (One-way ANOVA, P <0.01, *post-hoc* Newman-Keuls). *Put = putamen, ac = anterior commissure*.

Although a similar pattern of reduction in both markers was observed, TH showed a greater decline than DAT in the posterior striatum (Fig. 15). The O.D of DAT⁺-ir was greater in the control group than in the MPTP-treated group (P = 0.021), what was also correlated with a greater increase in the striatal TH-ir cell density of the MPTP-treated group compared with intact animals (P = 0.034). On the other hand, the quantification of O.D of TH-ir in the posterior striatum (body of the nucleus caudate and putamen) was lower that in anterior striatum. In the control monkeys, the value of O.D of TH-ir fibers in the posterior striatum was 80.6 ± 3.1, while in the levodopa-treated groups it decreased to 16.1 ± 5.3 units of O.D (Fig. 15).



Figure 15: Optical density (O.D) of TH-ir for dopaminergic fibers at the head of the anterior caudate nucleus. All groups (control, MPTP alone, MPTP + levodopa and MPTP + levodopa + 7-NI) were analyzed. There were some significant differences when we compared all groups with control group (*** P <0.001). (One-way ANOVA, P <0.01, *post-hoc* Newman-Keuls). *BCd* = *body of the caudate*.

Moreover, the optical density of DAT-ir fibers was greater in the control group than in the levodopa-treated group (P<0.001), which correlates with a greater increase of the striatal TH-ir fiber density levels in these animals compared with untreated animals (P = 0.034). No significant differences were found between MPTP treated groups, both with levodopa and with the nitric oxide inhibitor (7-NI). These results indicate that in terms of intra-striatal changes, the anterior putamen was relatively less affected than the posterior putamen and caudate (Fig. 14-15). Moreover, both markers also showed a noticeable immunoreactivity gradient in the dorsoventral axis.

4.2.4 HEART TISSUE ANALYSIS

4.2.4.1 Effects of MPTP and levodopa-treated monkeys on total HSP-27 and phospho-HSP 27 expressions

Total Hsp 27 and phosphorylated Hsp27 at Ser-82 immunoreactivity in the right and left ventricle were examined by Western blot analysis in control monkeys and in MPTP and MPTP + levodopa treated animals. Total Hsp 27 total and pHsp27 were detected in a band located at ~ 27 kDa (Fig. 16). In animals treated with MPTP and MPTP + levodopa the total Hsp 27 levels were similar, in right (RV) and left ventricle (LV), to that obtained in the control group. However, the levels of pHsp27 Ser82 protein were significantly affected by the treatment (Fig. 16, panel A-B). We observed a significant increase in the levels of this protein in both ventricles when we compared MPTP + levodopa-treated monkeys with the other groups (P<0.01).



Figure 16: Effects of MPTP and levodopa-treated monkeys on total Hsp 27 and phospho-Hsp 27 expressions in tissue heart. Total and Phospho-Hsp27 were detected in a band located at 27 kDa. In animals treated with MPTP and MPTP + levodopa, levels of total Hsp27 were similar in both ventricles. However, in phospho-Hsp27 at Ser82 protein there are significant differences in the two ventricles (P<0.01) (Panels A-B). (A) In the RV, MPTP + levodopa treated monkeys with respect to the other groups (One Way ANOVA, P<0.01).

4.2.4.2 EFFECTS OF MPTP AND LEVODOPA-TREATED MONKEYS ON EXPRESSION OF TOTAL TH AND TH PHOSPHORYLATED

We also studied the total TH (band located at ~ 62 kDa) and the phosphorylated TH at Ser40 (band located at ~ 65 kDa) in the right and left ventricle for estimating the severity of the Parkinsonism in MPTP and MPTP + levodopa treated monkeys. As shown in Figure 17, we observed that MPTP + levodopa and levodopa-treated monkeys had a slight decrease in the total TH of RV when compared to controls, but with no statistical significance. In contrast, in the LV, we observed an important decrease in MPTP + levodopa-treated monkeys with respect to control animals (P<0.001) and to MPTP-treated monkey's with respect to control and MPTP + levodopa-treated animals (P<0.01). Secondly, we examined the phospho-TH, phosphorylated at Ser 40, expression in the heart of control and treated monkeys. In the RV, we observed a significant increase in phospho-TH levels in MPTP-treated monkeys compared with the other groups (P<0.01). However, in the LV, we also found an important increase of phopho-TH at Ser40 in the MPTP + levodopa-treated monkeys (P<0.001) and MPTP-treated monkeys when compared to control animals (P<0.001) and MPTP-treated monkeys when compared to control animals (P<0.001) and MPTP-treated monkeys (P<0.001).



Figure 17: Effects of MPTP and levodopa treatments on expression of total TH and phospho-TH in both cardiac ventricles. There was an important decrease of Total TH in the heart of MPTP + levodopa-treated monkeys with respect to control animals (P<0.001) and MPTP-treated monkey with respect to control and MPTP + levodopa-treated animals (P<0.01). In the RV we found a significant increase in the p-TH levels of heart of MPTP-treated monkeys with respect to the other groups (P<0.01). However, in the LV, we also found an important increase of p-TH at Ser40 in the heart of MPTP + levodopa-treated monkeys (P<0.001) and MPTP-treated monkeys (P<0.001) and MPTP-treated monkeys (P<0.001).

4.2.4.3 COMT ACTIVATION AFTER CHRONIC MPTP PLUS LEVODOPA-TREATED MONKEYS

The COMT protein expression in extracts of the right and left monkey heart is shown in Figure 17. Western blotting revealed the presence of two bands at approximately 25 and 30 kDa, respectively. Based on the sizes and relevant abundance, the 25 kDa band is presumed to be the (soluble subunit) S-COMT in the heart with the 30 kDa band representing the (membrane subunit) MB-COMT (Fig. 18). Quantitative analysis showed a non-significant increase in the expression of S-COMT subunit in neither of the two ventricles. In contrast, we observed a significant increase in the expression of MB-COMT in the RV of MPTP + levodopa-treated animals compared with normal controls (P<0.05) (Fig. 18, panel A). Moreover, in the LV, we showed an important and significant increase in the expression of MB-COMT in MPTP + levodopa-treated animals (P<0.001) and in MPTP-intoxicated monkeys when compared with controls. (P<0.05) (Fig. 18, panel B).



Figure 18: COMT activation after chronic MPTP and levodopa treatment in both cardiac ventricles of monkeys. Quantitative analysis showed a non-significant increase in the expression of S-COMT subunit in the two ventricles of monkey's heart. In contrast, we observed a significant increase in the expression of MB-COMT in the RV (A) of MPTP + levodopa-treated animals compare with normal controls (P < 0.05). (B) Moreover, in the LV, we showed a very significant increase in the expression of MB-COMT of MPTP + levodopa-treated animals (P < 0.001) and in MPTP-intoxicated monkeys when compared with control animals (P < 0.05).

4.2.4.4 EFFECTS OF MPTP AND MPTP PLUS LEVODOPA ON NORADRENALINE TURNOVER

Concentrations of noradrenaline, normetanephrine, as well as noradrenaline turnover (as estimated by NMN/NA ratio) were measured in the RV and LV in monkeys treated with MPTP or with MPTP + levodopa. The concentrations of the NA (ng/g) in both ventricles showed non-significant decrease in MPTP and MPTP + levodopa treated-monkeys with respect to controls (Fig. 19, panel A). We also observed significant differences in the NMN concentrations (ng/g) in both ventricles. There was a significant increased expression of NMN (ng/g) in the RV of MPTP + levodopa-treated monkeys (P<0.01) compared to MPTP-treated animals. In contrast, we also observed a significant decrease in NMN concentrations when compared MPTP-treated animals with control animals (P<0.05) (Fig. 19, panel B). The NA turnover in both ventricles was increased in MPTP + levodopa-treated monkeys with respect to both MPTP-intoxicated monkeys (P<0.001) and to controls animals (P<0.01) (Fig. 20).



Figure 19: (A) The analysis of NA (ng/g) concentrations in the RV showed a nonsignificant decrease in the heart of MPTP and MPTP + levodopa-treated monkeys compared to controls, which was only significantly decreased in the LV of MPTP + levodopa treated monkeys compared to controls. (B) In the RV the concentrations of NMN (ng/g) in the dyskinetic monkeys show a striking and very significant increase compared with MPTP-treated animals (P < 0.01). In contrast, we also observed a significant decrease in NMN concentration betweenMPTP-treated animals as compared to controls. (P < 0.05).



Figure 20: Effects of MPTP and MPTP + levodopa on noradrenaline turnover obtained by HPLC analysis. The analysis of the noradrenaline turnover (as estimated by NMN/NA ratio) was carried out in both RV and LV of control and treated monkeys this shows a significant increase in the MPTP + levodopa-treated monkeys with respect to both MPTP-intoxicated monkeys (P < 0.001) and controls animals (P < 0.01).

5. **DISCUSSION**

The administration of 6-OHDA in the striatum of the rat induces static, rapid and nearly complete DA degeneration of neurons in the SN (Zuch et al., 2000). In contrast to other models, such as systemic administration of MPTP, 6-OHDA model has been shown to be an excellent model because it has a large number of advantages. These include i) drug-induced rotational test can accurately assess which animals are truly injured, ii) shows compensatory plastic neuronal changes in the contralateral nigrostriatal DA pathway to the lesioned side, and iii) enables to use the same animal both as an injured (analyzing the denervated DA pathway) and a control subject (via non-denervated DA pathway) and thus, a robust model for the potential assessment of prospective neuroprotective drugs (Zheng et al., 2006; Aguiar et al., 2005). The neuronal degeneration with 6-OHDA in rats also differs substantially from that which occurs in PD (where neuronal loss is slow and progressive). Therefore, this paradigm is also taken into account in this study with the use of a particular model which addresses selective o neuronal 6-OHDA-induced striatal degeneration of DA neurons. Another important application of 6-OHDA, is the possibility of behavioural assessments to analyse the dopaminergic lesion as performed in this present study with the elevated body swing test (EBST). This test was mainly applied in order to verify the partial lesion in the striatum and to avoid any possible effects of behavioral sensitization to repeated injections of apomorphine (Blandini et al., 2007). This test was performed 15 days after the apomorphine rotation test, as it has been previously validated as a complementary drug-free test of the apomorphine test (Borlang and Sanberg, 1995). Based on quantitative immunohistochemical and behavioral analyses, the present study

provides *in vivo* evidence of the up-regulation of DARPP-32-signaling caused by a moderate DA depletion in the striatum, controlled by nNOS mediated mechanisms.

Our results show that a unilateral intrastriatal injection of 6-OHDA in rats induces a slight loss of TH⁺ fibers in the striatum and TH⁺ cells in the SNpc, associated with a low intensive rotation secondary to apomorphine administration (Ungerstedt, 1971b; Costall and Naylor, 1975; Herrera-Marschitz and Ungerstedt 1984; Koob et al., 1984). Although drug-induced rotational behavior is widely used to evaluate the level of DA lesion, a more sensitive test (as is used in our present model) should be used due to the sensitization effects of apomorphine (Mattingly et al., 1991). In our rats, the small DA depletion in the SNpc and the striatum was reliably detected by rotational behavior and by a significant contralateral biased-swing activity. Therefore, the EBST seems to be a good drug-free measure for asymmetrical motor behavior (Borlongan and Sanberg, 1995). These asymmetries were detected in body swing behaviour revealing a small imbalance of DA output that other methods may not be sensitive enough to uncover (Yuan et al., 2005; Baluchnejadmojarad and Roghani, 2004). Similar to injections of 6-OHDA in the medial forebrain bundle or the SNpc, the unilateral intrastriatal injection of 6-OHDA in rats could also be considered a good model for describing progressive loss of DA-containing structures in PD (Przedborski et al., 1995; Kirik et al., 1998; Debeir et al., 2005), and hence as a good model to study nNOS regulation and its effects in DA neurodegenerative processes (Gomes et al., 2008). Our results agree with previous studies showing that a striatal 6-OHDA lesion causes an increase in nNOS positive cells in the anterior and middle striatum, with a significant decrease of nNOS density in cells of the SNpc, an effect that is modified by NOS inhibitors (Gomes et al., 2008). This increase of nNOS may be responsible for the increase of NO that contributes to DA neurodegeneration, and downstream to aberrant signaling of projecting neurons of the striatum. As previously reported, we observed that the administration of 7-NI prevented the loss of TH⁺ fibers in the striatum and neurons of the SNpc.

This could be explained by the fact that DA depletion in the striatum increased the oxidative stress exerted by peroxinitrite, which is recognized as an important mediator of neuronal degeneration in the DA pathway (Smith and Cass, 2007). Subsequently, NOS inhibitors, such as 7-NI, could protect against oxidation/nitration processes by reducing the levels of peroxynitrite (Denicola and Radi, 2005), and putatively attenuating 6-OHDA toxicity.

Another approximation that we have used in our work is the MPTP monkey model which is probably the most relevant model currently that exists for the clinical study of PD (Fox & Brotchie, 2010). This model not only replicates the death of dopaminergic neurons and the consequent depletion of striatal DA, but also shows most of the motor symptoms that are evident in PD. However, one major limitation of the MPTP model, lies in the well documented difficulty to reproduce the gradual loss of dopaminergic neurons in the SNpc and the corresponding progressive onset of motor symptoms, such as those seen in PD (Jakowec and Petzinger, 2004; Selikhova et al., 2009). In order to circumvent this problem we designed a chronic MPTP scheduled treatment, which induced progressive dopaminergic neuronal death. One aim of our study was to prove the effect of a 7-NI inhibitor in mitigating levodopa induced dyskinesias. Similarly to PD patients, carbidopa or benserazide were simultaneously administered with each dose of levodopa. This assumes that, initially, the inhibition of the activity of DOPA decarboxylase (DDC) activity occurs sufficiently rapidl to withstand being metabolised, with the effect of increased inhibition of peripheral levodopa overtime (Pinder et al., 1976).

Our work shows that 7-NI decreases LIDs in a non-human primate model of PD without affecting the anti-parkinsonian efficacy of levodopa. It has been described that 7-NI administered to rats causes a cataleptic stage (Padovan-Neto et al., 2009). However, the motor evaluation of monkeys did not show any cataleptic or lethargic effects. Moreover, although previous studies performed in baboons showed that 7-NI administration causes hyperactivity (Hantraye et al., 1996) we observed no evidence of these activity alterations in our 7-NI-treatedanimals. Analysis of the AUC, which encompasses both the intensity and duration of the total dyskinetic response (Fig. 11, panel D), demonstrates that the inhibition of NOS constantly and significantly reduces the dyskinetic profile (Fig. 11, panel B-C). A possible mechanism to explain this phenomenon could be the role of striatal nitrergic interneurons, localized exclusively in a subclass of spiny interneurons that colocalize with somatostatin, neuropeptide Y and GABA (Kubota et al., 1993; Kharazia et al., 1994), which are activated by both corticostriatal synaptic transmission (by direct synaptic contacts) and dopaminergic terminals (by D1/5 receptors) within striatal neural networks (West et al., 2002).

In fact, striatal NO plays a critical role in PD through several proposed mechanisms that include:

i) activation of cGMP in medium spiny neurons (MSNs)with the up-regulation of cAMP (Lin et al., 2010) and inhibition of glutamate release from corticostriatal pathways, (Calabresi et al., 1999) or ii) provoking long-term depression in MSNs (West and Tseng, 2011). A possible explanation for the reduction of LID in parkinsonian animal models is the cGMP pathway. In fact, the imbalance of the second messengers is involved in the alterations of levodopa/dopamine signal transduction. In dyskinetic animals chronic levodopa treatment led to a slight decrease in cAMP and cGMP levels

(when compared with parkinsonian state) in cortico-striatal-pallidal regions of both hemispheres (Giorgi et al., 2008).

Post-mortem studies of these monkeys compared with other dyskinetic and parkinsonian monkeys in our laboratory should shed more light on the pathophysiology of LIDs. Moreover, since 7-NI is able to reduce LIDs in parkinsonian monkeys and in the light of other recent promising results with dopaminergic agonists, different approaches could be evaluated using 7-NI co-administration. For example, D3/D2/D1-receptor agonist could be continuously delivered by the transdermal route, (Stockwell et al., 2009) or throughpartial dopamine agonist administration (Tayarani-Binazir et al., 2010).

In post-mortem analysis of these monkeys, we also confirmed in our work and extend previous studies that nigrostriatal degeneration induces a marked and significant decrease in the number of striatal TH-ir, DAT-ir fibers (Blesa et al., 2012; Fernagut et al., 2010) and dopaminergic cells in SNpc in non-human primates. We also demonstrate that this decrease is further mantained by chronic levodopa exposure and 7-NI co-treatment. In fact, we found that the striatum of parkinsonian monkeys chronically treated with MPTP + levodopa exhibited a small decrease in optical density of TH-ir and DAT-ir fibers compared to control animals, particularly in the posterior striatum (ac -4 mm). These results corroborate previous studies that had shown an increased number of striatal TH-ir fibers secondary to levodopa treatment that might be involved in the development of aberrant striatal circuits and the appearance of LIDs (Dicaudo et al., 2012).

Interestingly, this decrease was observed after a levodopa treatment period of 4 months. In contrast, chronic levodopa treatment does not alter the number of surviving SNpc cells, confirming the lack of toxicity of levodopa in the primate nigral cell
population (DiCaudo et al., 2012). One of the most interesting findings in this study is the demonstration that chronic levodopa administration induced by chronic exposure to MPTP in macaque primates seems to maintain already decreased number of TH-ir and DAT-ir fibers in the anterior and posterior striatum. In contrast, in other similar studies this was not observed (Huot and Parent, 2007; Huot et al., 2008; DiCaudo et al., 2012). Huot and colleagues (2008) in this work demonstrated that the striatal TH-positive neurons increase markedly in number in animal models of PD, where striatal DA concentrations are low, but this increase is abolished by levodopa treatment. However, in our study we did not observe this particular trend. DiCaudo and colleagues conclude that the dose of levodopa given in this study (~30 mg/day) was able to reverse parkinsonism in the majority of MPTP-monkeys without provoking dyskinesias (DiCaudo et al., 2012). For this reason, we chose a higher dose of levodopa (100 mg/day) to induce and maintain severe dyskinesias and therefore investigate the obsereveable antidyskinetic effect of 7NI.

Moreover, from current literature search, the effective dose of levodopa for LID (100mg/day) used in our study was the same order that was cited by by Di Paolo's group (Riahi et al., 2011; Grégoire et al., 2011; Ouattara et al., 2010).

Another finding was that, compared with values in untreated animals, monkeys that received MPTP treatment had very low levels of catecholamines and their deaminated metabolites (DA, NA, NMN and ratios) in heart tissue. Goldstein and colleagues observed that plasma levels of norepinephrine, epinephrine, dihydroxyphenylglycol, and dihydroxyphenylacetic acid were all much lower after MPTP treatment than in untreated monkeys (Goldstein et al., 2003). In contrast, in our study, after chronic treatment with levodopa, cardiac levels of these catecholamines (NA and NMN) measured by HPLC s were higher than in untreated animals especially in the left ventricle. A quite similar pattern of high phopho-Hsp27 and phospho-TH levels measure with western blot analysis (Fig. 16-17), show an imbalance in the homestasis of animals. Moreover, in our work, unexpectedly, chronic levodopa administration in MPTP-treated monkeys had a greater increase of measured cardiac tissue levels of catecholamines compared with untreated monkeys, particularly in the left ventricle (Fig. 19). After seven months, there was evidence of a very significant loss of cardiac sympathetic innervation in the chronic MPTP-treated monkeys. These findings therefore would mimic those found in PD patients, with high incidence of cardiac sympathetic nerve loss (Goldstein et al., 2000).

The field of neurotoxin-induced Parkinsonism, as a model of the clinical condition, would benefit from identification of a substance that destroys cardiac sympathetic noradrenergic nerves and also penetrates the blood-brain barrier to destroy nigrostriatal dopamine cells..

In conclusion, this study shows that:

In the rat model, a mild dorsolateral striatal 6-OHDA lesion, provokes a significant increase of nNOS which is correlated with a positive balance of phospho-Thr34-DARPP-32 expression in the neostriatum. Importantly, treatment with 7-NI, apart from providing a neuroprotective effect, restores the striatal levels of phosphorylation of DARPP-32 and increases the level of total DARPP-32.

In the non-human primates, 7-NI co-treatment is able to reduce the intensity and duration of LIDs without affecting antiparkinsonian benefits, and could represent a promising therapy to improve the quality of life of PD patients. Moreover, chronic levodopa treatment could produce a cardioprotective effect in parkinsonian monkeys due to an increase in the p-Hsp27 and COMT proteins. Both proteins are also significantly increased in Parkinsonian monkeys chronically treated with levodopa.

6. CONCLUSIONS

6.1 IN RATS

a) Unilateral dopamine denervation triggers increased expression of neuronal NOS and DARPP-32 phosphorylated with a decreased expression of non-phosphorylated DARPP-32.

b) Administration (i.p) with a specific inhibitor of neuronal NOS in the dorsal CPu caused a small non-significant increase in the expression of TH, and total DARPP-32, without modification of the phosphorylated protein.

c) 7-NI protects the nigrostriatal pathway in 6-OHDA-lesioned rats and reverses parkinsonian behavior.

d) 7-NI reduces values of phospho-DARPP-32 and increases total DARPP-32 in 6 OHDA-lesioned rats.

6.2 IN MONKEYS

a) Clinically, 7-NI decreases the severity (intensity and duration) of dyskinesias in levodopa-treated monkeys. Besides have an antidyskinetic effect, it does not reduce functionality in the anti-parkinsonian effect of levodopa.

b) As expected, the patterns of loss in dopaminergic neurons in the MPTP-treated monkeys were very similar to that found in human PD brains.

c) In the SNpc (A9) we observed a very significant loss in dopaminergic neurons similar to the parkinsonian monkeys treated with levodopa and 7-NI.

d) In the VTA (A10) we show an insignificant decrease in the loss of dopaminergic neurons in the parkinsonian monkeys treated with levodopa when compared to untreated animals.

e) In the striatum (caudate nucleus and putamen), we observed that nigrostriatal degeneration induces a marked and significant decrease in the number of striatal TH-ir and DAT-ir fibers in parkinsonian primates co-treated with levodopa and 7-NI.

f) In cardiac tissue, MPTP treatment decreases catecholamine levels of NA, NMN and dopamine and increases the expression of phospho-TH-40 resulting in possible toxicity tocardiac cells

g) Chronic levodopa treatment reverts the parkinsonian effects and increases protein levels of phospho-Hsp27, COMT, phospho-TH-40 and NMN/NA ratio. This could possibly produce a cardioprotective effect in parkinsonian monkeys due to an increase in the phosphorylated form of Hsp27.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abassi ZA, Binah O, Youdim MB. Cardiovascular activity of rasagiline, a selective and potent inhibitor of mitochondrial monoamine oxidase B: comparison with selegiline. Br J Pharmacol. 2004 Oct;143(3):371-378.
- Abbot RD., Petrovitch H., White LR et al. Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease. Neurology 2001; 57: 456-462.
- Abreu-González P, González-Hernández T, Afonso-Oramas D, Cruz-Muros I, Barroso-Chinea P, González MC. Tetrahydrobiopterin stimulates L-DOPA release from striatal tissue. Eur J Pharmacol. 2006 Jul 10;541(1-2):33-37.
- Acheson AL, Zigmond MJ, Stricker EM. Compensatory increase in tyrosyne hydroxylase activity in rat brain after intraventricular injection of 6-hydroxydopamine. Science 1980; 207: 537-540.
- Adams JD Jr., Klaidman LK. Acrolein-induced oxygen radical formation. Free Radic Biol Med 1993; 15: 187-193.
- Admani AK, Verma S, Cordingley GJ, Harris RI. Patient benefits of 1-dopa and a decarboxylase inhibitor in the treatment of Parkinson's disease in elderly patients. Pharmatherapeutica. 1985;4(2):132-140.
- Afonso-Oramas D, Cruz-Muros I, Alvarez de la Rosa D, Abreu P, Giráldez T, Castro-Hernández J, Salas-Hernández J, Lanciego JL, Rodríguez M, González-Hernández T. Dopamine transporter glycosylation correlates with the vulnerability of midbrain dopaminergic cells in Parkinson's disease. Neurobiol Dis. 2009 Dec;36(3):494-508.
- Aguiar LM, Macedo DS, de Freitas RM, de Albuquerque Oliveira A, Vasconcelos SM, de Sousa FC, de Barros Viana GS. Protective effects of N-acetylserotonin against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. Life Sci. 2005 Mar 25;76(19):2193-2202.
- Ahmed MR, Berthet A, Bychkov E, Porras G, Li Q, Bioulac BH, Carl YT, Bloch B, Kook S, Aubert I, Dovero S, Doudnikoff E, Gurevich VV, Gurevich EV, Bezard E. Lentiviral overexpression of GRK6 alleviates L-dopa-induced dyskinesia in experimental Parkinson's disease. Sci Transl Med. 2010 Apr 21;2(28):28ra28.
- Aita Y, Ishii KA, Saito Y, Ikeda T, Kawakami Y, Shimano H, Hara H, Takekoshi K. Sunitinib inhibits catecholamine synthesis and secretion in pheochromocytoma tumor cells by blocking VEGF receptor 2 via PLC-γ-related pathways. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2012 Oct 15;303(8):E1006-14.
- Alcacer C, Santini E, Valjent E, Gaven F, Girault JA, Hervé D. Gα(olf) mutation allows parsing the role of cAMP-dependent and extracelular signal-regulated kinasedependent signaling in L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. J Neurosci. 2012 Apr 25;32(17):5900-10.

- Alexander, G.E.; DeLong, M.R. Microstimulation of the primate neostriatum. II. Somatotopic organization of striatal microexcitable zones and their relation to neuronal response properties. *J.Neurophysiol.*, 1985, 53, 1417-1430.
- Ali SF, Itzhak Y. Effects of 7-nitroindazole, an NOS inhibitor on methamphetamineinduced dopaminergic and serotonergic neurotoxicity in mice. Ann N Y Acad Sci. 1998 May 30;844:122-130.
- Alvord,E.C., Jr., Forno,L.S., Kusske,J.A., Kauffman,R.J., Rhodes,J.S., and Goetowski,C.R. (1974). The pathology of Parkinsonism: a comparison of degenerations in cerebral cortex and brainstem. Adv. Neurol. 5:175-93., 175-193.
- Amino T., Orimo S., Takahashi A., Uchihara T., Mizusawa H. Profund cardiac sympathetic denervation occurs in Parkinson's disease. Brain Pathol 2005; 15: 29-34
- Anderson JM, Hughes JD, Rothi LJ, Crucian GP, Heilman KM. Developmental stuttering and Parkinson's disease: the effects of levodopa treatment. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1999 Jun;66(6):776-778.
- Anderson AH, Kuttab S, Castagnoli N Jr. Deuterium isotope effect studies on the MAO-B catalyzed oxidation of 4-benzyl-1-cyclopropyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Biochemistry. 1996 Mar 12;35(10):3335-40.
- Armentero MT, Levandis G, Nappi G, Bazzini E, Blandini F. Peripheral inflammation and neuroprotection: systemic pretreatment with complete Freund's adjuvant reduces 6-hydroxydopamine toxicity in a rodent model of Parkinson's disease. Neurobiol Dis. 2006 Dec;24(3):492-505.
- Aubert I, Guigoni C, Hakansson K, Li Q, Dovero S, Barthe N, Bioulac BH, Gross CE, Fisone G, Bloch B, Bezard E. Increase D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. Ann Neurol. 2005 Jan;57(1):17-26.
- Ballard PA, Tetrud JW, Langston JW. Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. Neurology. 1985 Jul;35(7):949-56.
- Baltag D, Ignat B, Manole OZ. Secondary effects of chronic treatment with levodopa in Parkinson disease. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. 2003 Jan-Mar;107(1):131-135.
- Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Evaluation of functional asymmetry in rats with dose-dependent lesions of dopaminergic nigrostriatal system using elevated body swing test. Physiol Behav. 2004 Sep 15;82(2-3):369-73.
- Bankiewicz KS, Oldfield EH, Chiueh CC, Doppman JL, Jacobowitz DM, Kopin IJ. Life Sci. 1986 Jul 7;39(1):7-16.

- Bankiewicz KS, Plunkett RJ, Jacobowitz DM, Kopin IJ, Oldfield EH. Fetal nondopaminergic neural implants in parkinsonian primates. Histochemical and behavioral studies. J Neurosurg. 1991 Jan;74(1):97-104.
- Barbeu A, Murphy GF, Sourkes TL. Excretion of dopamine in diseases of basal ganglia. Science 1961; 133:1706-1707.
- Barcia C, De Pablos V, Bautista-Hernández V, Sanchez-Bahillo A, Fernández-Barreiro A, Poza M, Herrero MT. Measurement of motor disability in MPTP-treated macaques using a telemetry system for estimating circadian motor activity. J Neurosci Methods. 2004 Mar 15;134(1):59-64.
- Baron MS, Vitek JL, Bakay RA, Green J, McDonald WM, Cole SA. Treatment of advanced Parkinson's disease by unilateral posterior Gpi pallidotomy: 4-year results of a pilot study. Mov Disord. 2000;15: 230-7.
- Baumbarten HG, Zimmermann B. Neurotoxic pheniylalkylamines and indolealkylamines. En: Selective neurotoxicity. H. Herken y F. Hucho editores. Springer verlag, Berlin, Heilderberg, 1992. Pag 225-291.
- Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White Iii CL, Akiyama H, Caviness JN, Shill HA, Sabbagh MN, Walker DG; Arizona Parkinson's Disease Consortium. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. Acta Neuropathol. 2010 Jun;119(6):689-702.
- Belforte JE, Magariños-Azcone C, Armando I, Buño W, Pazo JH. Pharmacological involvement of the calcium channel blocker flunarizine in dopamine transmission at the striatum. Parkinsonism Relat Disord. 2001 Sep;8(1):33-40.
- Benito-León J, Bermejo-Pareja F, Morales-González JM, Porta-Etessam J, Trincado R, Vega S, Louis ED; Incidence of Parkinson disease and parkinsonism in three elderly populations of central Spain. Neurology. 2004 Mar 9; 62(5):734-41.
- Bernal-Pacheco O, Limotai N, Go CL, Fernandez HH. Nonmotor manifestations in Parkinson disease. Neurologist. 2012 Jan;18(1):1-16.
- Bernard, V.; Laribi, O.; Levey, A.I.; Bloch, B. Subcellular redistribution of m2 muscarinic acetylcholine receptors in striatal interneurons *in vivo* after acute cholinergic stimulation. *J.Neurosci.*, 1998, *18*, 10207-10218.
- Bernstein HG, Bogerts B, Keilhoff G. The many faces of nitric oxide in schizophrenia. A review. Schizophr Res. 2005 Oct 1;78(1):69-86.
- Bezard E, Boraud T, Bioulac B, Gross CE. Involvement of the subthalamic nucleus in glutamatergic compensatory mechanisms. Eur J Neurosci 1999;11:2167-2170.
- Bezard E, Brotchie JM, Gross CE. Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies. Nat Rev Neurosci 2001b; 2:577-88.

- Bezard E, Dovero S, Bioulac B, Gross CE. Kinetics of nigral degeneration in a chronic model of MPTP-treated mice. Neurosci Lett. 1997 Sep 26;234(1):47-50.
- Bezard E., Dovero S., Prunier C., Ravenscroft P., Chalon S., Guilloteau D. Y cols. Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinelesioned macaque model of Parkinson's disease. J Neurosci 2001b; 21: 6853-6861.
- Bezard E, Gross CE, Brotchie JM. Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated. Trends Neurosci 2003;26:215-221.
- Bezard E, Imbert C, Deloire X, Bioulac B, Gross CE. A chronic MPTP model reproducing the slow evolution of Parkinson's disease: evolution of motor symptoms in the monkey. Brain Res. 1997 Aug 22;766(1-2):107-112.
- Bezard E., Jaber M., Gonon F., Boireau A., Bloch B., Gross CE. Adaptative changes in the nigrostriatal pathway in response to increased 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6tetrahydropyridine-induced neurodegeneration in the mouse. Eur J Neurosci 2000; 12: 2892-2900.
- Bido S, Marti M, Morari M. Amantadine attenuates levodopa-induced dyskinesia in mice and rats preventing the accompanying rise in nigral GABA levels. J Neurochem. 2011 Sep;118(6):1043-55. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07376.
- Bjorklund A, Lindvall O. Dopamine containig systems in the CNS. En:Bjorklund A y Kdkfelt T eds. Handbook of chemical neuroanatomy, vol 2, parte 1: Classical neurotransmitters in the CNS. Elsevier, Amsterdam, 1984.
- Blandini F, Garcia-Osuna M, Greenamyre JT. Subthalamic ablation reverses changes in basal ganglia oxidative metabolism and motor response to apomorphine induced by nigrostriatal lesion in rats. Eur J Neurosci. 1997 Jul;9(7):1407-1413.
- Blandini F, Levandis G, Bazzini E, Nappi G, Armentero MT. Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioral alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. Eur J Neurosci. 2007 Jan;25(2):397-405.
- Blesa J, Pifl C, Sánchez-González MA, Juri C, García-Cabezas MA, Adánez R, Iglesias E, Collantes M, Peñuelas I, Sánchez-Hernández JJ, Rodríguez-Oroz MC, Avendaño C, Hornykiewicz O, Cavada C, Obeso JA. The nigrostriatal system in the presymptomatic and symptomatic stages in the MPTP monkey model: a PET, histological and biochemical study. Neurobiol Dis. 2012 Oct;48(1):79-91.
- Bloem BR, van Vugt JP, Beckley DJ. Postural instability and falls in Parkinson's disease. Adv Neurol. 2001;87: 209-23.
- Bockelmann R, Wolf G, Ransmayr G, Riederer P. NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase containing neurons in normal and Parkinson's disease putamen. J Neural Transm. 1994 7:115-121.

- Boehning, D. y Snyder, S. (2003). Novel neural modulators. Annual Reviews in Neuroscience, 26, 105-131.
- Bolaños JP, Almeida A, Stewart V, Peuchen S, Land JM, Clerk JB, Heales SJR (1997) Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. J Neurochem 68:2227-2240.
- Borlongan CV, Sanberg PR. 1995. Elevated body swing test: a new behavioral parameter for rats with 6-hydroxydopamine-induced hemiparkinsonism. J Neurosci. 15(7 Pt 2):5372-5378.
- Borm PJ, Van Vliet C. Susceptibility in Parkinson's disease. 'Of mice and men'. Med Hypotheses. 1988 Nov;27(3):205-207.
- Bossers K, Meerhoff G, Balesar R, van Dongen JW, Kruse CG, Swaab DF, Verhaagen J. Analysis of gene expression in Parkinson's disease: possible involvement of neurotrophic support and axon guidance in dopaminergic cell death. Brain Pathol. 2009 Jan;19(1):91-107. Epub 2008 May 7.
- Boulet S, Mounayar S, Poupard A, Bertrand A, Jan C, Pessiglione M, Hirsch EC, Feuerstein C, François C, Féger J, Savasta M, Tremblay L. Behavioral recovery in MPTP-treated monkeys: neurochemical mechanisms studied by intrastriatal microdialysis. J Neurosci. 2008 Sep 17;28(38):9575-84.
- Braak, H. y Braak, E. (2000). Pathoanatomy of Parkinson's disease. *Journal Neurology*, 247, 3-10.
- Braak, H., Braak, E., Yilmazer, D., de Vos, R., Jansen, E. y Bohl, J. (1996). Pattern of Brain destruction in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Journal of Neural Transmission*, 103, 455-490.
- Braak, H., Braak, E., Yilmazer, D., Schultz, C., de Vos, R.A. y Jansen, E. (1995). Nigral and extranigral pathology in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, 46, 15-31.
- Braak H, de Vos RA, Bhol J, Del Tredici K. Gastric α-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexures in case staged for Parkinson's disease-related brain pathology. Neurosci Lett 2006; 396: 67-72.
- Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. Neurobiol Aging. 2003 Mar-Apr;24(2):197-211.
- Braak H., Ghebremedhin E., Rub U., Bratzke H., Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. Cell Tissue Res 2004; 318: 121-134.
- Bravi, D., Mouradian, M. y Roberts, J. (1993). End-of-dose dystonia in Parkinson's disease. *Neurology*, 43, 2130-2131.

- Bredt DS, Hwang PM, Glatt C, et al: Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. Nature 1991; 351: 714-718
- Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. Bredt DS, Snyder SH. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Jan;87(2):682-5.
- Breese GR, Duncan GE, Napier TC, Bondy SC, Iorio LC, Mueller RA. 6hydroxydopamine treatments enhance behavioral response to intracerebral microinjection of D1- and D2- dopamine agonists into nucleus accumbens and striatum without changing dopamine antagonist binding. J Pharmacol Exp Ther. 1987 Jan;240(1):167-76.
- Bronte-Stewart H, Yuriko Minn A, Rodrigues K, Buckley E, Nashner LM. Postural instability in idiopathic Parkinson's disease: the role of medication and unilateral pallidotomy. Brain. 2002;125: 2100-14.
- Brooks DJ, Ibanez V, Sawle GV, Quinn N, Lees AJ, Mathias CJ, Bannister R, Marsden CD, Frackowiak RS. Differing patterns of striatal 18F-dopa uptake in Parkinson's disease, multiple system atrophy, and progressive supranuclear palsy. Ann Neurol. 1990 Oct;28(4):547-55.
- Brown CA, Campbell MC, Karimi M, Tabbal SD, Loftin SK, Tian LL, Moerlein SM, Perlmutter JS. Dopamine pathway loss in nucleus accumbens and ventral tegmental area predicts apathetic behavior in MPTP-lesioned monkeys. Exp Neurol. 2012 Jul;236(1):190-7.
- Brown GC. Nitric oxide and neuronal death. Nitric Oxide. 2010 Nov 1;23(3):153-165.
- Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. Free Radic Biol Med. 2002 Dec 1;33(11):1440-50.
- Brück A, Aalto S, Rauhala E, Bergman J, Marttila R, Rinne JO. A follow-up study on 6-[18F]fluoro-L-dopa uptake in early Parkinson's disease shows nonlinear progression in the putamen. Mov Disord. 2009 May 15;24(7):1009-15. doi: 10.1002/mds.22484.
- Burnett M., Fujishiro H., Frigerio R., et al. Cardiac sympathetic denervation is early and progressive in Lewy body disease. Short communication at XVII World Congress on Parkinson's Disease & Related disorders; December 9-13th, 2007; Amsterdam (Netherlands).
- Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983 Jul;80(14):4546-4550.

- Cadet JL, Katz M, Jackson-Lewis V, Fahn S. Vitamin E attenuates the toxic effects of intraestriatal injection of 6- hydroxydopamine in rats: behavioural and biochemical evidence. Brain Res. 1991; 476: 10-15.
- Cadete VJ, Lin HB, Sawicka J, Wozniak M, Sawicki G. Proteomic analysis of right and left cardiac ventricles under aerobic conditions and after ischemia/reperfusion. Proteomics. 2012 Aug;12(14):2366-77.
- Cai J, Yang M, Poremsky E, Kidd S, Schneider JS, Iacovitti L. Dopaminergic neurons derived from human induced pluripotent stem cells survive and integrate into 6-OHDA-lesioned rats. Stem Cells Dev. 2010 Jul;19(7):1017-1023.
- Calabresi P, Centonze D, Pisani A, Bernardi G. Metabotropic glutamate receptors and cell-type-specific vulnerability in the striatum: implication for ischemia and Huntington's disease. Exp Neurol. 1999 Jul;158(1):97-108.
- Calabresi P, Di Filippo M, Ghiglieri V, Tambasco N, Picconi B. Levodopa-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease: filling the bench-to-bedside gap. Lancet Neurol. 2010 Nov;9(11):1106-1117.
- Campos V., Rebollo AC., Jimenez-Hoyuela JM. et al. Early alteration of adrenérgico cardiac function on Parkinson's disease. Rev Neurol 2004; 19: 53-58.
- Carella, F., Giovanninni, P., Girotti, F. (1993). Dystonia and Parkinson's disease". *Advances in Neurology*, 60, 558-561.
- Carpenter MB. Anatomical organization of the corpus striatum and related nuclei. Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis 1976a; 55: 1-36
- Carpenter MB. Anatomy of the basal ganglia and related nuclei: a review. Adv Neurol 1976b; 14: 7-48
- Carpenter MB., Peter P. Nigrostriatal and nigrothalamic fibers in the rhesus monkey. J Comp Neurol 1972; 144: 93-115
- Carpenter MG, Allum JHJ, Honegger F, Adkin AL, Bloe, BR. Postural abnormalities to multidirectional stance perturbations in Parkinson's disease. J Neurol Neurosurg Psychistry. 2004;75: 1245-54.
- Castro, A. (1998). La Enfermedad de Parkinson y la Vida Cotidiana. Madrid: Ed. Ergon.
- Castro-García A., Sesar-Ignacio A., Ares-Pensado B. Psychiatric complications of Parkinson's disease: their symptoms and treatment. Rev Neurol, 2004 Oct 1-15;39(7):646-50.
- Cavas, M. y Navarro, J.F. (2002). Óxido nítrico, vigilia y sueño. Vigilia-Sueño, 14, 15-28.

- Cenci MA, Lindgren HS. Advances in understanding L-DOPA-induced dyskinesia. Curr Opin Neurobiol. 2007 Dec;17(6):665-671
- Cenci, M.A.; Ohlin, K.E.; Rylander, D. Plastic effects of L-DOPA treatment in the basal ganglia and their relevance to the development of dyskinesia. Parkinsonism Relat. Disord., 2009, 15 (Suppl 3), S59-S63.
- Cenci MA, Whishaw IQ, Schallert T. Animal models of neurological deficits:how relevant is the rat? Nat Rev Neurosci. 2002 Jul;3(7):574-9.
- Centonze, D.; Bracci, E.; Pisani, A.; Gubellini, P.; Bernardi, G.; Calabresi, P. Activation of dopamine D1-like receptors excites LTS interneurons of the striatum. *Eur. J. Neurosci.*, 2002, *15*, 2049-2052.
- Chalimoniuk, M.; Langfort, J. The effect of subchronic, intermittent L-DOPA treatment on neuronal nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase expression and activity in the striatum and midbrain of normal and MPTP-treated mice. *Neurochem. Int.*, 2007, *50*, 821-833.
- Chalimoniuk, M.; Stepien, A. Influence of the therapy with pergolide mesylate plus L-DOPA and with L-DOPA alone on serum cGMP level in PD patients. *Pol. J. Pharmacol.*, 2004, *56*, 647-650.
- Chalimoniuk M, Strosznajder J. NMDR receptor-dependent nitric oxide and cGMP synthesis in brain hemisphere and cerebellum during reperfusion after transient forebrain ischemia in gerbils: effect of 7-nitroindazole. J Neuroci Res 1998; 54: 681-690.
- Charcot, J.M. (1882). *Lecciones sobre las enfermedades del Sistema Nervioso dadas en la Salpêtrière*. Coleccionadas y publicadas por Bouneville.Traducidas en 1882 por Flores M. Tomo I, Madrid: Imprenta de Pérez Dubrul.
- Chase TN. Striatal plasticity and extrapyramidal motor dysfunction. Parkinsonism Relat Disord. 2004 Jul;10(5):305-13.
- Chassain C, Eschalier A, Durif F. Assessment of motor behavior using a video system and a clinical rating scale in parkinsonian monkeys lesioned by MPTP. J Neurosci Methods. 2001 Oct 15;111(1):9-16.
- Chaudhuri KR. Autonomic dysfunction in movement disorders. Curr Opin Neurol. 2001 Aug;14(4):505-11.
- Chaudhuri KR, Yates L, Martinez-Martin P. The non-motor symptom complex of Parkinson's disease: a comprehensive assessment is essential. Curr Neurol Neurosci Rep. 2005 Jul;5(4):275-83.
- Chen, M.T.; Morales, M.; Woodward, D.J.; Hoffer, B.J.; Janak, P.H. *In vivo* extracellular recording of striatal neurons in the awake rat following unilateral 6-hydroxydopamine lesions. *Exp. Neurol.*, 2001, *171*, 72-83.

- Chiueh C. C. and Rauhala P. (1999) The redox pathway of S-nitrosoglutathione, glutathione and nitric oxide in cell to neuron communications. Free Rad. Res. 31, 641-650.
- Cho S, Volpe BT, Hwang O, Choi HJ, Park LC, Chu CK et al. Blockade of tetrahydrobiopterin synthesis protects neurons after transient forebrain ischemia in rat: a novel role for the cofactor. J Neurosci 1999; 19: 878-889.
- Chung S, Hedlund E, Hwang M, Kim DW, Shin BS, Hwang DY, Kang UJ, Isacson O, Kim KS. The homeodomain transcription factor Pitx3 facilitates differentiation of mouse embryonic stem cells into AHD2- expressing dopaminergic neurons. Mol Cell Neurosci. 2005 Feb;28(2):241-52.
- Chung YH, Shin CM, Joo KM, Kim MJ, Cha CI. Immunohistochemical study on the distribution of nitrotyrosine and neuronal nitric oxide synthase in aged rat cerebellum. Brain Res. 2002 Oct 4;951(2):316-321.
- Clarke CE, Davien P. Systematic review of acute levodopa and apomorphine challenge tests in the diagnosis of idiopathic Parkinson's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2000;69: 590-594.
- Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. Int Immunopharmacol. 2001 Aug;1(8):1397-1406.
- Collier TJ, Lipton J, Daley BF, Palfi S, Chu Y, Sortwell C, Bakay RA, Sladek JR Jr, Kordower JH. Aging-related changes in the nigrostriatal dopamine system and the response to MPTP in nonhuman primates: diminished compensatory mechanisms as a prelude to parkinsonism. Neurobiol Dis. 2007 Apr;26(1):56-65.
- Colosimo C, Albanese A, Hughes AJ, de Bruin VMS, Lees AJ. Some specific clinical features differentiate múltiple system atrophy (striatonigral variety) from Parkinson disease. Arch Neurol. 1995;52: 294-8.
- Corin MS, Elizan TS, Bender MB. Oculomotor function in patients with Parkinson's disease. J Neural Transm. 1995;45: 11-9.
- Costall B, Marsden CD, Naylor RJ, Pycock CJ. The relationship between striatal and mesolimbic dopamine dysfunction and the nature of circling responses following 6-hydroxydopamine and electrolytic lesions of the ascending dopamine systems of rat brain. Brain Res. 1976 Dec 10;118(1):87-113.
- Costall B, Naylor RJ. Neuropharmacological studies on D145 (1,3-dimethyl-5aminoadamantan). Psychopharmacologia. 1975 Jul 23;43(1):53-61.
- Cotzias, G.C.; Papavasiliou, P.S.; Gellene, R. L-dopa in parkinson's syndrome. *N. Engl. J. Med.*, **1969**, *281*, 272.

Creese Y. Dopamine receptors explained. TrendsNeurosci 1982; 5: 40-43.

- Creese Y, Burt DR, Snyder SH. Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induces behavioural supersensitivity. Science 1977; 197: 596-598.
- Crutcher, M.D.; DeLong, M.R. Single cell studies of the primate putamen. I. Functional organization. *Exp. Brain Res.*, 1984, 53,233-243.
- Cruz-Muros I, Afonso-Oramas D, Abreu P, Pérez-Delgado MM, Rodríguez M, González-Hernández T. Aging effects on the dopamine transporter expression and compensatory mechanisms. Neurobiol Aging. 2009 Jun;30(6):973-86.
- Cubo E, Martín PM, Martin-Gonzalez JA, Rodríguez-Blázquez C, Kulisevsky J; Motor laterality asymmetry and nonmotor symptoms in Parkinson's disease. Mov Disord. 2010 Jan 15;25(1):70-75.
- Cummings, J.L. (1988). Intellectual impairment in Parkinson's disease: clinical, pathological and biomedical correlates. *Journal Geriatric Psychiatry neurology*, *1*, 24-36.
- Cummings JL. Neurophyschiatric complications of drug treatment of Parkinson's disease. En: Huber SJ, Cummings JL editores. Parkinson's Disease: Neurobehabioral Aspects. New York: Oxford University Press; 1992. p. 313-27.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. Brain. 1999 Aug;122 (Pt 8):1437-48.
- Davis GC., Williams AC., Markey SP., Ebert MH., Caine ED., Reichert CM., y cols. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. Psychiatry Res 1979; 1: 249-254.
- Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Sep 1;88(17):7797-801.
- Dawson TM, Snyder SH. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. J Neurosci. 1994 Sep;14(9):5147-59.
- de Lau LM, Giesbergen PC, de Rijk MC, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. Incidence of parkinsonism and Parkinson disease in a general population: the Rotterdam Study. Neurology. 2004 Oct 12; 63(7):1240-4.
- Deckel AW. Nitric oxide and nitric oxide synthase in Huntington's disease. J Neurosci Res. 2001 Apr 15;64(2):99-107.
- Degryse AD, Colpaert FC. Symptoms and behavioral features induced by 1-methyl-4phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in an old Java monkey [Macaca cynomolgus fascicularis (Raffles)]. Brain Res Bull. 1986 May;16(5):561-571.

- Dehmer T, Lindenau J, Haid S, Dichgans J, Schulz JB (2000) Deficiency of inducible nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity in vivo. J Neurochem 74:2213-2216.
- Del Bel, E.A.; Souza, A.S.; Guimaraes, F.S.; da-Silva, C.A.; Nuccida-Silva, L.P. Motor effects of acute and chronic inhibition of nitric oxide synthesis in mice. *Psychopharmacology*, **2002**, *161*, 32-37.
- Del Zompo M., Piccardi MP., Ruiu S., Quatu M., Gessa GL., Vaccari A. Selective MPP+ uptake into synaptic dopamine vesicles: posible involvement in MPTP neurotoxicity. Br J Pharmacol 1993; 109: 411-414.
- DeLong M, Wichmann T. Changing views of basal ganglia circuits and circuit disorders. Clin EEG Neurosci. 2010 Apr;41(2):61-7.
- DeLong, M.R. Putamen: activity of single units during slow and rapid arm movements. *Science*, 1973, *179*, 1240-1242.
- Denicola A, Radi R. Peroxynitrite and drug-dependent toxicity. Toxicology. 2005 Mar 15;208(2):273-88.
- Devereaux MW, Mancall EL. Letter: Brown urine, bleach, and L-dopa. N Engl J Med. 1974 Nov 21;291(21):1142.
- Dexter, D.T., Wells, F.R., Lees, A.J., Agid, F., Agid, Y., Jenner, P., and Marsden, C.D. (1989) *J. Neurochem.* 52, 1830-1836.
- DiCaudo C, Riverol M, Mundiñano IC, Ordoñez C, Hernández M, Marcilla I, Luquin MR. Chronic levodopa administration followed by a washout period increased number and induced phenotypic changes in striatal dopaminergic cells in MPTP-monkeys. PLoS One. 2012;7(11):e50842.
- Di Domenico F, Sultana R, Tiu GF, Scheff NN, Perluigi M, Cini C, Butterfield DA. Protein levels of heat shock proteins 27, 32, 60, 70, 90 and thioredoxin-1 in amnestic mild cognitive impairment: an investigation on the role of cellular stress response in the progression of Alzheimer disease. Brain Res. 2010 May 28;1333:72-81.
- Dias RG, Negrão CE, Krieger MH. Nitric oxide and the cardiovascular system: cell activation, vascular reactivity and genetic variant. Arq Bras Cardiol. 2011 Jan;96(1):68-75.
- Dickson DW, Braak H, Duda JE, Duyckaerts C, Gasser T, Halliday GM, Hardy J, Leverenz JB, Del Tredici K, Wszoled ZK, Litvan I. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. Lancet Neurol. 2009 Dec;8(12):1150-7.
- DiFiglia M., Pasik P., Pasik T. A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. Brain Res 1976; 114: 245-256

- Di Matteo V, Pierucci M, Esposito E, Crescimanno G, Benigno A, Di Giovanni G. Serotonin modulation of the basal ganglia circuitry: therapeutic implication for Parkinson's disease and other motor disorders. Prog Brain Res. 2008;172:423-463.
- Di Monte DA, Royland JE, Anderson A, Castagnoli K, Castagnoli N Jr, Langston JW. Inhibition of monoamine oxidase contributes to the protective effect of 7nitroindazole against MPTP neurotoxicity. J Neurochem. 1997 Oct;69(4):1771-3.
- Ding F., Luan L., Ai Y., Walton A., Gerhardt GA., Gash DM., y cols. Development of a stable early stage unilateral model of Parkinson's disease in middle-aged rhesus monkeys. Exp Neurol 2008; 212: 431-439.
- Doan JB, Melvin KG, Whishaw IQ, Suchowersky O. Bilateral impairments of skilled reach-to-eat in early Parkinson's disease patients presenting with unilateral or asymmetrical symptoms. Behav Brain Res. 2008 Dec 12;194(2):207-213.
- Docherty MJ, Burn DJ. Parkinson's disease dementia. Curr Neurol Neurosci Rep. 2010 Jul;10(4):292-8.
- Dray A. The striatum and substantia nigra: a commentary on their relationships. Neuroscience 1979; 4: 1407-1439
- Druschky A., Hilz MJ., Platsch G. et al. Differentiation of Parkinson's disease and multiple system atrophy in early disease stages by means of I-123-MIBG-SPECT. J Neurol Sci 2000; 175: 3-12
- Dubow JS. Autonomic dysfunction in Parkinson's disease. Dis Mon. 2007 May;53(5):265-274.
- Duffy P, and Tennyson.VM. (1965). Phase and electron microscopic observations of Lewy bodies and melanin granules in the substatia nigra and locus caeruleus in Parkinson's disease. J Neuropathol. Exp Neurol. 24, 318-414, 318-314.
- Duncan, A.J.; Heales, S.J. Nitric oxide and neurological disorders. *Mol. Aspects Med.*, 2005, 26, 67-96.
- Eberling JL, Bankiewicz KS, Jordan S, Van Brocklin HF, Jaqust WJ. PET studies of functional compensation in a primate model of Parkinson's disease. Neuroreport. 1997 Aug 18;8(12):2727-33.
- Echeverry MB, Guimarães FS, Del Bel EA. 2004. Acute and delayed restraint stressinduced changes in nitric oxide producing neurons in limbic regions. Neuroscience. 2004;125(4):981-993.
- Ehrt U, Broich K, Larsen JP, Ballard C, Aarsland D. Use of drugs with anticholinergic effect and impact on cognition in Parkinson's disease: a cohort study. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2010 Feb;81(2):160-165.

- Eidelberg E, Brooks BA, Morgan WW, Walden JG, Kokemoor RH. Variability and functional recovery in the N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of parkinsonism in monkeys. Neuroscience. 1986 18(4):817-822.
- Eliasson MJ, Sampei K, Mandir AS, Hurn PD, Traystman RJ, Bao J, Pieper A, Wang ZQ, Dawson TM, Snyder SH, Dawson VL (1997) Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. Nat Med 3:1089-1095.
- Ellrichmann G, Russ H, Müller T. Dyskinesia in Parkinson's disease--major clinical features, aetiology, therapy. Fortschr Neurol Psychiatr. 2007 Jul;75(7):387-96.
- Elsworth JD, Brittan MS, Taylor JR, Sladek JR Jr, Redmond DE Jr, Innis RB, Zea-Ponce Y, Roth RH. Upregulation of striatal D2 receptors in the MPTP-treated vervet monkey is reversed by grafts of fetal ventral mesencephalon: an autoradiographic study. Brain Res. 1998 Jun 8;795(1-2):55-62.
- Elsworth JD, Deutch AY, Redmond DE Jr, Taylor JR, Sladek JR Jr, Roth RH. Symptomatic and asymptomatic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinetreated primates: biochemical changes in striatal regions. Neuroscience. 1989; 33(2):323-31.
- Elsworth JD., Taylor JR., Sladek JR Jr., Collier TJ., Redmond DE jr., Roth RH. Striatal dopaminergic correlates of stable parkinsonism and degree of recovery in old-world primates one year after MPTP treatment. Neuroscience 2000; 95; 399-408.
- Estévez AG, Spear N, Thompson JA, Cornwell TL, Radi R, Barbeito L, Beckman JS (1998) Nitric oxide-dependent production of cGMP supports the survival of rat embryonic motor neurons cultured with brain-derived neurotrophic factor. J Neurosci 18:3708-3714.
- Eve DJ, Nisbet AP, Kingsbury AE, Hewson EL, Daniel SE, Lees AJ, Marsden CD, Foster OJ. Basal ganglia neuronal nitric oxide synthase mRNA expression in Parkinson's disease. Brain Res Mol Brain Res. 1998 Dec 10;63(1):62-71.
- Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. Brain. 1991 Oct;114 (Pt 5):2283-301.
- Feldman PL, Griffith OW, Hong H, Stuerh DJ. Irreversible inactivation of macrophage and brain nitric oxide synthase by L-N^G-methylarginine requires NADPHdependent hydroxylation. J Med Chem 1993; 36: 491-496.
- Fenelon G., Francois C., Percheron G., Yelnik J. Topographic distribution of pallidal neurons projecting to the thalamus is macaques. Brain Res 1990; 520: 27-35
- Fernagut PO, Li Q, Dovero S, Chan P, Wu T, Ravenscroft P, Hill M, Chen Z, Bezard E. Dopamine transporter binding is unaffected by L-DOPA administration in normal and MPTP-treated monkeys. PLoS One. 2010 Nov 22;5(11):e14053.

- Ferrer I, Martinez A, Blanco R, Dalfó E, Carmona M. Neuropathology of sporadic Parkinson disease before the appearance of parkinsonism: preclinical Parkinson disease. J Neural Transm. 2011 May;118(5):821-39. Epub 2010 Sep 23.
- Forno LS., Langston JW., DeLanney LE., Irwin I., Ricaurte GA. Locus coeruleus lesions and eosnophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. Ann Neurol 1986; 20: 449-455.
- Forno,L.S., and Norville,R.L. (1981). Synaptic morphology in the human locus ceruleus. Acta Neuropathol. 53, 7-14.
- Fox SH, Brotchie JM. The MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. Past, present, and future. Prog Brain Res. 2010;184:133-157.
- Galati, S.; D'Angelo, V.; Scarnati, E.; Stanzione, P.; Martorana, A.; Procopio, T.; Sancesario, G.; Stefani, A. *In vivo* electrophysiology of dopamine-denervated striatum: focus on the nitric oxide/cGMP signaling pathway. *Synapse*, 2008, 62, 409-420.
- Garcia-Carmona JA, Almela P, Baroja-Mazo A, Milanes MV, Laorden ML. Restrited role of CRF1 receptor for the activity of brainstem catecholaminergic neurons in the negative state of morphine withdrawal. Psychopharmacology (Berl). 2012 Mar;220(2):379-93.
- Garrido-Gil P, Belzunequi S, San Sebastián W, Izal-Azcárate A, López B, Marcilla I, Luquin MR. 1-Methil-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure fails to produce delayed degeneration of substantia nigra neurons in monkeys. J Neurosci Res. 2009 Feb;87(2):586-97.
- Garthwaite, J., Garthwaite, G., Palmer, R.M.J. y Moncada, S. (1989). NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *European Journal of Pharmacology*, *172*, 413-416.
- Garvey EP, Oplinger JA, Tanoury GJ, Sherman PA, Rowler M, Marshall S, Harmon MF, Paith JE, Furfine ES. Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases: inhibition by non-amino acid isothioureas. J Biol Chem 1994; 269: 26669-26676.
- Gaspar P, Febvret A, Colombo J. Serotonergic sprouting in primate MTP-induced hemiparkinsonism. Exp Brain Res. 1993;96(1):100-106.
- Gerber R, Altar CA, Liebman JM. Rotational behavior induced by 8-hydroxy-DPAT, a putative 5HT-1 agonist, in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. Psychopharmacology (Berl). 1988;94(2):178-82.
- Giasson, B.I., Duda, J.E., Murray, I.V.J., Chen, Q., Souza, J.M., Hurtig, H.I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. (2000) Science 290, 985-989.

- Gibb WR, Lees AJ. Anatomy, pigmentation, ventral and dorsal subpopulations of the substantia nigra, and differential cell death in Parkinson's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1991 May;54(5):388-96.
- Giorgi, M.; D'Angelo, V.; Esposito, Z.; Nuccetelli, V.; Sorge, R.; Martorana, A.; Stefani, A.; Bernardi, G.; Sancesario, G. Lowered cAMP and cGMP signalling in the brain during levodopa-induced dyskinesias in hemiparkinsonian rats: new aspects in the pathogenetic mechanisms. *Eur. J. Neurosci.*, 2008, 28, 941-950.
- Girault JA. Integrating neurotransmission in striatal medium spiny neurons. Adv Exp Med Biol. 2012;970:407-29.
- Glinka Y, Youdim MHB. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6 hydroxydopamine. Eur. J. Pharmacol. 1995; 295:329-332.
- Goetz, C.G., Tanner, C.M. y Klawans, H.L. (1982). Pharmacology of hallucinations individual by long-term drug therapy. *Am J Psychiatry*, *139*, 494-497.
- Goldstein DS. Neuroscience and heart-brain medicine: the year in review. Cleve Clin J Med. 2010 Jul;77 Suppl 3:S34-39.
- Goldstein D, Eisenhofer G, Robertson D, Straus R., Esler M. Dysautonomias: clinical disorders of the autonomic nervous system. Ann Intern Med 2002; 137: 753-763.
- Goldstein DS., Holmes C., Canno RO III, Eisenhofer G., Kopin IJ. Simpathetic cardioneuropathy in dysautonomias. N Engl J Med 1997; 336: 696-702.
- Goldstein DS., Holmes C., Li ST., Bruce S., Metman LV., Cannon RO. Cardiac sympathetic denervation in Parkinson's disease. Ann Intern Med 2000; 133: 338-347
- Goldstein DS, Li ST, Holmes C, Bankiewicz K. Sympathetic innervation in the 1methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine primate model of Parkinson's disease. J Pharmacol Exp Ther. 2003 Sep;306(3):855-60.
- Goldstein DS, Sewell L, Sharabi Y. Autonomic dysfunction in PD: a window to early detection?. J Neurol Sci. 2011 Nov 15;310(1-2):118-22.
- Goldstein DS., Sharabi Y., Karp BI. Et al. Cardiac sympathetic denervation preceding motor signs in Parkinson's disease. Clin Auton Res 2007; 17: 118-121.
- Gomes MZ, Del Bel EA. Effects of electrolytic and 6-hydroxydopamine lesions of rat nigrostriatal pathway on nitric oxide synthase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase. Brain Res Bull. 2003 Dec 15;62(2):107-15.
- Gomes MZ, Raisman-Vozari R, Del Bel EA. A nitric oxide synthase inhibitor decreases 6-hydroxydopamine effects on tyrosine hydroxylase and neuronal nitric oxide synthase in the rat nigrostriatal pathway. Brain Res. 2008 Apr 8;1203:160-9.

- Gómez-Esteban JC, Tijero B, Somme J, Ciordia R, Berganzo K, Rouco I, Bustos JL, Valle MA, Lezcano E, Zarranz JJ. Impact of psychiatric symptoms and sleep disorders on the quality of life of patients with Parkinson's disease. J Neurol. 2011 Mar;258(3):494-499.
- González-Hernández T, Barroso-Chinea P, De La Cruz Muros I, Del Mar Pérez-Delgado M, Rodríguez M. Expression of dopamine and vesicular monoamine transporters and differential vulnerability of mesostriatal dopaminergic neurons. J Comp Neurol. 2004 Nov 8;479(2):198-215.
- Good, P.F., Hsu, A., Werner, P., Perl, D.P., and Olanow, C.W. (1998) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 338-342.
- Gottwald MD, Aminoff MJ. Therapies for dopaminergic-induced dyskinesias in Parkinson disease. Ann Neurol. 2011 Jun;69(6):919-27.
- Govers, R. y Oess, S. (2004). To NO or not to NO: 'where?' is the question. *Histology* and *Histopathology*, 19, 585-605.
- Gracy KN, Pickel VM. Ultrastructural localization and comparative distribution of nitric oxide synthase and N-methyl-D-aspartate receptors in the Shell of the rat nucleus accumbens. Brain Res. 1997 Feb 7;747(2):259-72.
- Grahmam DG. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and citotoxic quinones. Mol. Pharmacol. 1978; 14: 633-643.
- Graybiel AM., Ragsdale CW., Jr. Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. Proc Natl Acad Sci USA 1978; 75: 5723-5726
- Greene JG, Dingledine R, Greenamyre JT. Gene expression profiling of rat midbrain dopamine neurons: implications for selective vulnerability in parkinsonism. Neurobiol Dis. 2005 Feb;18(1):19-31.
- Grégoire L, Morin N, Ouattara B, Gasparini F, Bilbe G, Johns D, Vranesic I, Sahasranaman S, Gomez-Mancilla B, Di Paolo T. The acute antiparkinsonian and antidyskinetic effect of AFQ056, a novel metabotropic glutamate receptor type 5 antagonist, in L-Dopa-treated parkinsonian monkeys. Parkinsonism Relat Disord. 2011 May;17(4):270-6. doi: 10.1016/j.parkreldis.2011.01.008.
- Griscavage JM, Rogers NE, Sherman MP, Ignarro LJ. Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide. J Immnunol 1993; 151: 6329-6337.
- Gittis, A.H.; Nelson, A.B.; Thwin, M.T.; Palop, J.J.; Kreitzer, A.C. Distinct roles of GABAergic interneurons in the regulation of striatal output pathways. *J. Neurosci.*, 2010, *30*, 2223-2234.

- Gross BB, Jaffe EA, Levi R, Kilbourn RG. Cytokine activated endothelial cells express an isotype of nitric oxide synthase which is tetrahydrobiopterin-dependent, calmodulin-independent and inhibited by arginine analogs with a rank-order of potency characteristic of activated macrophages. Biochem Biophys Res Commun 1991; 170: 823-829.
- Guevara BH, Cespedes GC, Cubeddu LX. 2002. Treatment with 7-nitroindazole enhances kainic acid induced cholinergic neurotoxicity in the rat striatum: a neuroprotective role for neuronal nitric oxide. Cell Mol Neurobiol. 2002 Dec;22 (5-6): 827-34.
- Guevara-Guzmán R, Emson PC, Kendrick KM. Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. J Neurochem. 1994;62:807-810.
- Guigoni C, Dovero S, Aubert I, Li Q, Bioulac BH, Bloch B, Gurevich EV, Gross CE, Bezard E. Levodopa-induced dyskinesia in MPTP-treated macaques es not dependent on the extent and pattern of nigrostrial lesioning. Eur J Neurosci. 2005 Jul;22(1):283-7.
- Guix FX, Uribesalgo I, Coma M, Muñoz FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. Prog Neurobiol. 2005 Jun;76(2):126-152.
- Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. APMIS. 1988 Oct;96(10):857-881.
- Hadj Tahar A, Grégoire L, Darré A, Bélanger N, Meltzer L, Bédard PJ. Effect of a selective glutamate antagonist on L-DOPA-induced dyskinesias in drug-naive parkinsonian monkeys. Neurobiol Dis. 2004 Mar;15(2):171-176.
- Hagan G, Pepke-Zaba J. Pulmonary hypertension, nitric oxide and nitric oxide-releasing compounds. Expert Rev Respir Med. 2011 Apr;5(2):163-171.
- Hagan RM, Raxworthy MJ, Gulliver PA. Benserazide and carbidopa as substrates of catechol-O-methyltransferase: new mechanism of action in Parkinson's disease. Biochem Pharmacol. 1980 Dec 1;29(23):3123-3126.
- Halliday GM, Blumbergs PC, Cotton RG, Blessing WW, Geffen LB. Loss of brainstem serotonin- and substance P-containing neurons in Parkinson's disease. Brain Res. 1990 Feb 26;510(1):104-107.
- Halliday G, Herrero MT, Murphy K, McCann H, Ros-Bernal F, Barcia C, Mori H, Blesa FJ, Obeso JA. No Lewy pathology in monkeys with over 10 years of severe MPTP Parkinsonism. Mov Disord. 2009 Jul 30;24(10):1519-1523.
- Handy RLC, Moore PHK. A comparison of the effects of L-NAME, 7-NI and L-NIL on carrageenan-induced hindpaw oedema and NOS activity. Br J Pharmacol 1998; 123: 1119-1126.

- Hantraye P, Brouillet E, Ferrante R, Palfi S, Dolan R, Matthews RT, Beal MF. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons. Nat Med. 1996 Sep;2(9):1017-1021.
- Hantraye P., Varastet M., Peschansky M., Riche D., Cesareo P., Willer JC., y cols. Stable parkinsonian syndrome and uneven loss striatal dopamine fibres following chronic MPTP administration in baboons. Neuroscience 1993; 53: 169-178.
- Hara M, Fukui R, Hidea E, Kuroiwa M, Bateup HS, Kano T, Greengard P, Nishi A. Role of adrenoceptors in the regulation of dopamine/DARPP-32 signaling in neostriatal neurons. J Neurochem. 2010 May;113(4):1046-59.
- Hara MR, Snyder SH. Cell signaling and neuronal death. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2007;47:117-41.
- Harvey DC, Lacán G, Melegan WP. Regional heterogeneity of dopaminergic deficits in vervet monkey striatum and substantia nigra after methamphetamine exposure. Exp Brain Res. 2000 Aug;133(3):349-58.
- Harvey BK, Wang Y, Hoffer BJ. Transgenic rodent models of Parkinson's disease. Acta Neurochir Suppl. 2008;101:89-92.
- Hawkes CH. The prodromal phase of sporadic Parkinson's disease: does it exist and if so how long is it? Mov Disord. 2008 Oct 15;23(13):1799-807. doi: 10.1002/mds.22242. Review.
- Haycock JW, Haycock DA. Tyrosine hydroxylase in rat brain dopaminergic nerve terminals. Multiple-site phosphorylation in vivo and in synaptosomes. J Biol Chem. 1991 Mar 25;266(9):5650-7.
- Heeringa MJ, d'Agostini F, DeBoer P, DaPrada M, Damsma G. Effect of monoamine oxidase A and B and of catechol-O-methyltransferase inhibition on L-DOPA-induced circling behavior. J Neural Transm. 1997;104(6-7):593-603.
- Heikkila RE, Sonsalla PK. The MPTP-treated mouse as a model of parkinsonism:how good is it?. Neurochem Int. 1992 Mar;20 Suppl:299S-303S.
- Heinonen EH, Myllylä V. Safety of selegiline (deprenyl) in the treatment of Parkinson's disease. Drug Saf. 1998 Jul;19(1):11-22.
- Herrera-Marschitz M, Ungerstedt U. Evidence that apomorphine and pergolide induce rotation in rats by different actions on D1 and D2 receptor sites. Eur J Pharmacol. 1984 Feb 17;98(2):165-76.
- Herrero MT, Hirsch EC, Kastner A, Ruberg M, Luquin MR, Laguna J, Javoy-Agid F, Obeso JA, Agid Y. Does neuromelanin contribute to the vulnerability of catecholaminergic neurons in monkeys intoxicated with MPTP? Neuroscience. 1993 Sep; 56(2):499-511.

- Hill MP, Bezard E, McGuire SG, Crossman AR, Brotchie JM, Michel A, Grimée R, Klitgaard H. Novel antiepileptic drug levetiracetam decreases dyskinesia elicited by L-dopa and ropinirole in the MPTP-lesioned marmoset. Mov Disord. 2003 Nov;18(11):1301-1305.
- Hirsch EC. Nigrostriatal system plasticity in Parkinson's disease: effect of dopaminergic denervation and treatment. Ann Neurol 2000;47(Suppl. 1):115-121.
- Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. Neurology. 1967;17: 427-42.
- Holloway RG, Shoulson I, Fahn S. Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: a 4-year randomised controlled trial. Arch Neurol. 2004;61: 1044-1053.
- Horak FB, Nutt JG, Nashner LM. Postural inflexibility in parkinsonian subjects. J Neurol Sci. 1992;111(1): 46-58.
- Hornykiewicz O. A brief history of levodopa. J Neurol. 2010 Nov;257(Suppl 2):S249-52.
- Hornykiewicz O. L-DOPA: from a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent. Amino Acids 2002; 23:65-70.
- Hornykiewicz O, Kish SJ. Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. Adv Neurol. 1987;45:19-34.
- Hostetler ED, Eng W, Joshi AD, Sanabria-Bohórquez S, Kawamoto H, Ito S, O'Malley S, Krause S, Ryan C, Patel S, Williams M, Riffel K, Suzuki G, Ozaki S, Ohta H, Cook J, Burns HD, Hargreaves R. Synthesis, characterization, and monkey PET studies of [¹⁸F]MK-1312, a PET tracer for quantification of mGluR1 receptor occupancy by MK-5435. Synapse. 2011 Feb;65(2):125-135.
- Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ (1997) Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-XL during apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 94:3668
- Huang EP. Synaptic plasticity: a role for nitric oxide in LTP. Curr Biol. 1997 Mar 1;7(3):R141-143.
- Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. (1992). Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson'disease. A clínico-pathologycal study of 100 cases. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 55, 181-184.
- Hughes AJ, Daniel SE, Lees AJ. The clinical features of Parkinson's disease in 100 histologically proven cases. Adv Neurol. 1993;60: 595-99.
- Hunot, S.; Boissiere, F.; Faucheux, B.; Brugg, B.; Mouatt-Prigent, A.; Agid, Y.; Hirsch, E.C. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 1996, 72, 355-363.

- Hunot, S., Hartmann, A., and Hirsch, E.C. (2001) Clin. Neurosci. Res. 1, 434-443.
- Huot P, Lévesque M, Morissette M, Calon F, Dridi M, Di Paolo T, Parent A. L-Dopa treatment abolishes the numerical increase in striatal dopaminergic neurons in parkinsonian monkeys. J Chem Neuroanat. 2008 Jan;35(1):77-84.
- Huot P, Parent A. Dopaminergic neurons intrinsic to the striatum. J Neurochem. 2007 Jun;101(6):1441-7.
- Ignarro LJ. Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. Hypertension. 1990 Nov;16(5):477-83.
- Imbert C, Bezard E, Guitraud S, Boraud T, Gross CE. Comparison of eight clinical rating scales used for the assessment of MPTP-induced parkinsonism in the Macaque monkey. J Neurosci Methods. 2000 Mar 1;96(1):71-6.
- Iravani MM, Syed E, Jackson MJ, Johnston LC, Smith LA, Jenner P. A modified MPTP treatment regime produces reproducible partial nigrostriatal lesions in common marmosets. Eur J Neurosci. 2005 Feb;21(4):841-54.
- Itzhak Y, Ali SF. Role of nitrergic system in behavioral and neurotoxic effects of amphetamine analogs. Pharmacol Ther. 2006 Jan;109(1-2):246-262.
- Itzhak Y, Ali SF. The neuronal nitric oxide synthase inhibitor, 7-nitroindazole, protects against methamphetamine-induced neurotoxicity in vivo. J Neurochem. 1996 Oct;67(4):1770-1773.
- Iversen SD, Koob GF. Behavioral implications of dopaminergic neurons in the mesolimbic system. Adv Biochem Psychopharmacol. 1977;16:209-14.
- Iwanaga K, Wakabayashi K, Yoshimoto M, *et al.* Lewy body-type degeneration in cardiac plexus in Parkinson's and incidental Lewy body diseases. *Neurology* 1999; 2: 1269-1271.
- Jahanshahi, M. y Marsden, C.D. (1998) Enfermedad de Parkinson: Manual de consejos para la comunicación entre el equipo médico, paciente y sus cuidadores. Barcelona: Editores Médicos S.A. (Edimsa).
- Jain S, Goldstein DS. Cardiovascular dysautonomia in Parkinson disease: from pathophysiology to pathogenesis. Neurobiol Dis. 2012 Jun;46(3):572-80.
- Jakowec MW, Petzinger GM. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned model of parkinson's disease, with emphasis on mice and nonhuman primates. Comp Med. 2004 Oct;54(5):497-513.
- Jang J, Yoo JE, Lee JA, Lee DR, Kim JY, Huh YJ, Kim DS, Park CY, Hwang DY, Kim HS, Kang HC, Kim DW. Disease-specific induced pluripotent stem cells: a platform for human disease modeling and drug discovery. Exp Mol Med. 2012 Mar 31;44(3):202-213.

- Jankovic J, Stacy M. Medical management of levodopa-associated motor complications in patients with Parkinson's disease. CNS Drugs. 2007;21(8):677-92.
- Javitch J., Snyder SH. Uptake of MPP(+) by dopamine neurons explains selectivity of parkinsonism-inducing neurotoxin, MPTP. EurvJ Pharmacol 1984; 106: 455-456.
- Jellinger KA. Pathological substrate of dementia in Parkinson's disease--its relation to DLB and DLBD. Parkinsonism Relat Disord. 2006 Mar;12(2):119-20. Epub 2005 Dec 5.
- Jellinger, K. (1987). Neuropathological substrates of Alzheimer's disease and Parkinson's disease. J Neural Transm. Suppl. 24:109-29., 109-129.
- Jellinger, KA. (1991). Post mortem studies in Parkinson's disease-is it possible to detect brain areas for specify symptoms?. *Journal of Neural Transmission, 56*, 1-9.
- Jenner P. From the MPTP-treated primate to the treatment of motor complications in Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord. 2009 Dec;15 Suppl 4:S18-23.
- Jenner P. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. Nat Rev Neurosci. 2008 Sep;9(9):665-77.
- Jenner P, Rupniak NM, Rose S, Kelly E, Kilpatrick G, Lees A, Marsden CD. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in the common marmoset. Neurosci Lett. 1984 Sep 7;50(1-3):85-90.
- Jiang MH, Katu T, Hada J, Hayashi Y. 7-Nitroindazole reduces nitric oxide concentration in rat hippocampus after transient forebrain ischemia. Eur J Pharmacol 1999; 380: 117-121.
- Jonson G. Studies on the mechanism of 6-hydroxydopamine cytotoxicity. Med. Biol. 1976; 54: 406-420.
- Jonson G, Sachs Ch. Effects of 6-hydroxydopamine on the uptake and storage of noradrenaline in sympathetic adrenergic neurons. Eur. J. Pharmacol. 1970; 9: 141-145.
- Johnston TH, van der Meij A, Brotchie JM, Fox SH. Effect of histamine H2 receptor antagonism on levodopa-induced dyskinesia in the MPTP-macaque model of Parkinson's disease. Mov Disord. 2010 Jul 30;25(10):1379-1390.
- Joyce JN. Differential response of striatal dopamine and muscarinic cholinergic receptor subtypes to the loss of dopamine. I. Effects of intranigral or intracerebroventricular 6-hydroxydopamine lesions of the mesostriatal dopamine system. Exp Neurol. 1991 Sep;113(3):261-76.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H. y Jessell, T.M. (2001). Principios de Neurociencia. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.

- Kaufmann H, Nahm K, Purohit D, Wolfe D. Autonomic failure as the initial presentation of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. Neurology 2004; 63: 1093-1095.
- Kawaguchi, Y. Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. J. Neurosci., 1993, 13, 4908-4923.
- Kawaguchi, Y.; Aosaki, T.; Kubota, Y. Cholinergic and GABAergic interneurons in the striatum. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, 1997, *17*, 87-90.
- Kemp JM, Powell TP. The structure of the caudate nucleus of the cat: light and electron microscopy. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1971; 262: 383-401.
- Kharazia VN, Schmidt HH, Weinberg RJ. Type I nitric oxide synthase fully accounts for NADPH-diaphorase in rat striatum, but not cortex. Neuroscience. 1994 Oct;62(4):983-7.
- Khlebtovsky A, Rigbi A, Melamed E, Ziv I, Steiner I, Gad A, Djaldetti R. Patient and caregiver perceptions of the social impact of advanced Parkinson's disease and dyskinesias. J Neural Transm. 2012 Mar 22.
- Kimura, M.; Kato, M.; Shimazaki, H. Physiological properties of projection neurons in the monkey striatum to the globus pallidus. *Exp. Brain Res.*, 1990, 82, 672-676.
- Kimura, M.; Rajkowski, J.; Evarts, E. Tonically discharging putamen neurons exhibit set-dependent responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, *81*, 4998-5001.
- Kirik D, Rosenblad C, Björklund A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. Exp Neurol. 1998 152(2):259-277.
- Kish, L.J.; Palmer, M.R.; Gerhardt, G.A. Multiple single-unit recordings in the striatum of freely moving animals: effects of apomorphine and D-amphetamine in normal and unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Brain Res.*, 1999, *833*, 58-70.
- Kish SJ, Shannak K, Hornykiewicz O. Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. N Engl J Med. 1988 Apr 7;318(14):876-80.
- Kiss JP, Hennings EC, Zsilla G, Vizi ES. A possible role of nitric oxide in the regulation of dopamine transporter function in the striatum. Neurochem Int. 1999;34:345-350.
- Kiss JP, Vizi ES. Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. Trends Neurosci. 2001 Apr;24(4):211-5.

- Kiss JP, Zsilla G, Bici ES. Inhibitory effect of nitric oxide on dopamine transporters: interneuronal communication without receptors. Neurochem Int. 2004;45:485-489.
- Kitai, S.T.; Surmeier, D.J. Cholinergic and dopaminergic modulation of potassium conductances in neostriatal neurons. *Adv. Neurol.*, 1993, *60*, 40-52.
- Kleiner-Fisman G, Lozano A, Moro E, Poon YY, Lang AE. Long-term effect of unilateral pallidotomy on levodopa-induced dyskinesia. Mov Disord. 2010 Jul 30;25(10):1496-1468.
- Kluger BM, Klepitskaya O, Okun MS. Surgical treatment of movement disorders. Neurol Clin. 2009 Aug;27(3):633-77.
- Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S. Formation of nitric oxide from Larginine in the central nervous system: an induction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 89: 5159-5162.
- Kobylecki C, Cenci MA, Crossman AR, Ravenscroft P. Calcium-permeable AMPA receptors are involved in the induction and expression of 1-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. J Neurochem. 2010 Jul;114(2):499-511.
- Kolb JP, Roman V, Mentz F, Zhao H, Rouillard D, Dugas N, Dugas B, Sigaux F. Contribution of nitric oxide to the apoptotic process in human B cell chronic lymphocytic leukaemia. Leuk Lymphoma. 2001 Jan;40(3-4):243-257.
- Koob GF, Simon H, Herman JP, Le Moal M. Neuroleptic-like disruption of the conditioned avoidance response requires destruction of both the mesolimbic and nigrostriatal dopamine systems. Brain Res. 1984 Jun 15;303(2):319-29.
- Korten JJ, Keyser A, Joosten EM, Gabreëls FJ. Madopar versus sinemet. A clinical study on their effectiveness. Eur Neurol. 1975;13(2):65-71.
- Kowall NW., Hantraye P., Broullet E., Beal MF., McKee AC., Ferrante RJ., MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons. Neuroreport 2000; 11: 211-213.
- Kowara R, Moraleja KL, Chakravarthy B. Involvement of nitric oxide synthase and ROS-mediated activation of L-type voltage-gated Ca2+ channels in NMDA-induced DPYSL3 degradation. Brain Res. 2006 Nov 13;1119(1):40-49.
- Kubota Y, Mikawa S, Kawaguchi Y. Neostriatal GABAergic interneurones contain NOS, calretinin or parvalbumin. Neuroreport. 1993 Dec 13;5(3):205-258.
- Kumer SC, Vrana KE. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. J Neurochem. 1996 Aug;67(2):443-62.
- Kuzuhara S. Drug-induced psychotic symptoms in Parkinson's disease. Problems, management and dilemma. J Neurol. 2001 Sep;248 Suppl 3:III28-31.

- Landau WM. The fabulous neuroprotection of selegiline: memoir and prospectus. J Child Neurol. 2010 Oct;25(10):1302-1304.
- Langston JW. The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. Ann Neurol 2006; 59: 591-596.
- Langston JW, Ballard PA Jr. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. N Engl J Med. 1983 Aug 4;309(5):310.
- Langston JW., Ballard P., Tetrud JW., Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. Science 1983; 219: 979-980.
- Lawrence AJ, Jarrot B. Nitric oxide increases interstitial excitatory amino acid release in the rat dorsomedial medulla oblongata. Neurosci Lett. 1993;151:126-129.
- Lee CS, Sauer H, Bjorklund A. Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by instrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. Neuroscience. 1996 Jun;72(3):641-653.
- Lee EY, Lee JE, Park JH, Shin IC, Koh HC. Rosiglitazone, a PPAR-γ agonist, protects against striatal dopaminergic neurodegeneration induced by 6-OHDA lesions in the substantia nigra of rats. Toxicol Lett. 2012 Sep 18;213(3):332-44.
- Lee JM, Hwang DS, Kim HG, Lee CH, Oh MS. Dangguijakyak-san protects dopamine neurons against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity under postmenopausal conditions. J Ethnopharmacol. 2012 Feb 15;139(3):883-8.
- Lee UP, Kim DW, Kang HW, Hwang JH, Jeong HJ, Sohn EJ, Kim MJ, Ahn EH, Shin MJ, Kim DS, Kang TC, Kwon OS, Cho SW, Park J, Eum WS, Choi SY. PEP-1-heat shock protein 27 protects from neuronal damage in cells and in a Parkinson's disease mouse model. FEBS J. 2012 Jun;279(11):1929-42.
- Lees AJ, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease. Lancet. 2009 Jun 13;373(9680):2055-66.
- Lei D, Adachi N, Nagaro T, Arai T. Nitric oxide production in the CA1 field of the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. Effects of 7-nitroindazoles and N^G-nitro-L-arginine methyl ester. Stroke 1999; 30: 669-677.
- Lemke MR. Depressive symptoms in Parkinson's disease. Eur J Neurol. 2008 Apr;15 Suppl 1:21-5.
- Levine JE. New concepts of the neuroendocrine regulation of gonadotropin surges in rats. Biol Reprod. 1997 Feb;56(2):293-302.
- Li H, Förstermann U. Prevention of atherosclerosis by interference with the vascular nitric oxide system. Curr Pharm Des. 2009;15(27):3133-3145.

- Li ST., Dendi R., Holmes C., Goldstein DS. Progressive loss of cardiac sympathetic innervation in Parkinson's disease. Ann Neurol 2002; 52: 220-223
- Liberatore G. T., Jackson-Lewis V., Vukosavic S., Mandir A. S., Vila M., McAuliffe W. G., Dawson V. L., Dawson T. M. and Przedborski S. (1999) Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. Nature Med. 5, 1403-1409.
- Lieberman A, Goodgold A, Jonas S, Leibowitz M. Comparison of dopa decarboxylase inhibitor (carbidopa) combined with levodopa and levodopa alone in Parkinson's disease. Neurology. 1975 Oct;25(10):911-916.
- Lima MS, Martins EF, Delattre AM, Proença MB, Mori MA, Carabelli B, Ferraz AC. Motor and Non-Motor Features of Parkinson's Disease - a Review of Clinical and Experimental Studies. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2012 Apr 4.
- Lin, C.S. Phosphodiesterase type 5 regulation in the penile corpora cavernosa. J. Sex. Med., 2009, 6(Suppl 3), 203-209.
- Lin DT, Fretier P, Jiang C, Vincent SR. Nitric oxide signaling via cGMP-stimulated phosphodiesterase in striatal neurons. Synapse. 2010 Jun;64(6):460-6.
- Linazasoro G. Recent failures of new potential symptomatic treatments for Parkinson's disease: causes and solutions. Mov Disord. 2004 Jul;19(7):743-754.
- Liu Y., Peter D., Roghani A., Schuldiner S., Prive GG., Eisenberg D y cols. A cDNA that suppresses MPP+ toxicity encodes a vesicular amine transporter. Cell 1992; 70: 539-551
- Lonart G, Cassels KL, Johnson KM. Nitric oxide induces calcium-dependent [3H]dopamine release from striatal slices. J. Neurosci Res. 1993;35:192-198.
- Lonart G, Johnson KM. Inhibitory effects of nitric oxide on the uptake of [3H]dopamine and [3H] glutamate by striatal synaptosomes. J Neurochem. 1994;63:2108-2117.
- Louis ED, Klatka LA, Liu Y, Fahn S. Comparision of extrapyramidal features in 31 pathologically confirmed cases of diffuse Lewy disease and 34 pathological confirmed cases of Parkinson's disease. Neurology. 1997;48: 376-80.
- Lundblad M, af Bjerkén S, Cenci MA, Pomerleau F, Gerhardt GA, Strömberg I. Chronic intermittent L-DOPA treatment induces changes in dopamine release. J Neurochem. 2009 Feb;108(4):998-1008.
- Luquin, M.R., Scipioni, O., Vaamonde, J. y cols. (1992). Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: Clinical and pharmacological classification. *Movement Disorders*, 7, 117-124.
- Luthman J, Sundström E. No apparent difference in the effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on the sympathetic system in NMRI and C57 BL/6 mice. Toxicol Lett. 1990 Nov;54(1):83-92.

- Mallet, N.; Ballion, B.; Le Moine, C.; Gonon, F. Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of parkinsonian rats. *J. Neurosci.*, 2006, *26*, 3875-3884.
- Mathias CJ. Cardiovascular autonomic dysfunction in parkinsonian patients. Clin Neurosci 1998; 5: 153-166.
- Mathias CJ. The classification and mnomenclature of autonomic disorders: ending chaos, resolving conflict and hopefully achieving clarity. Clin Auton Res 1995; 5: 307-310.
- Marjama-Lyons J, Koller W. Tremor-predominant Parkinson's disease. Approaches to treatment. Drugs Aging. 2000 Apr;16(4):273-278.
- Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. Cell. 1994 Sep 23;78(6):927-30.
- Marsden, C.D. Parkinson's disease. Lancet, 1990, 335, 948-952.
- Marsden, C.D., Parkes, J.D. y Quinn, N. (1982). Fluctuations of disability in Parkinson's disease-clinical aspects. En: C.D. Marsden, S. Fahn (Eds), *Movement disorders* (pp96-122). London: Butter-word.
- Marsden CD, Parkes JD, Rees JE. A year's comparison of treatment of patients with parkinson's disease with levodopa combined with carbidopa versus treatment with levodopa alone. Lancet. 1973 Dec 29;2(7844):1459-1462.
- Marshall JF, Navarrete R, Joyce JN. Dereased striatal D1 binding density following mesotelencephalic 6-hydroxydopamine injections: an autoradiographic analysis. Brain Res. 1989 Jul 31;493(2):247-57.
- Martignoni E., Pacchetti C., Godi L., Micieli G., Nappi G. Autonomic disorders in Parkinson's disease. J Neural Transm Suppl 1995; 45:11-19.
- Martin WE, Loewenson RB, Resch JA, Baker AB. Parkinson's disease: clinical analysis of 100 patients. Neurology. 1973;23: 783-790.
- Maruyama W, Takahashi T, Youdim M, Naoi M. The anti-Parkinson drug, rasagiline, prevents apoptotic DNA damage induced by peroxynitrite in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. J Neural Transm. 2002 Apr;109(4):467-81.
- Masilamoni GJ, Bogenpohl JW, Alagille D, Delevich K, Tamagnan G, Votaw JR, Wichmann T, Smith Y. Metabotropic glutamate receptor 5 antagonist protects dopaminergic and noradrenergic neurons from degeneration in MPTP-treated monkeys. Brain. 2011 Jul;134(Pt 7):2057-2073.

- Mattingly BA, Rowlett JK, Graff JT, Hatton BJ. Effects of selective D1 and D2 dopamine antagonists on the development of behavioral sensitization to apomorphine. Psychopharmacology (Berl). 1991;105(4):501-7.
- McGeer PL, Itagaki S, Akiyama H, McGeer EG. Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. Ann Neurol. 1988 Oct;24(4):574-576.
- McInerney-Leo A, Gwinn-Hardy K, Nussbaum RL. Prevalence of Parkinson's disease in populations of African ancestry: a review. J Natl Med Assoc. 2004 Jul;96(7):974-9.
- Meffert MK, Calakos NC, Scheller RH, Schulman H. Nitric oxide modulates synaptic vesicle docking/fusion reactions. Neuron. 1996;16:1229-1236.
- Meffert MK, Premack BA, Schulman H. Nitric oxide stimulates Ca2+-independent synaptic vesicle release. Neuron. 1994;12:1235-1244.
- Meincke U, Kosinski CM. Treatment of mental disorders in patients with Parkinson's disease. Fortschr Neurol Psychiatr. 2010 May;78(5):279-87. Epub 2010 Apr 26.
- Meissner W., Prunier C., Guilloteaau D., Chalon S., GrossCE., Bezard E. Time-course of nigrostriatal degeneration in a progressive MPTP-lesioned macaque model of Parkinson's disease. Mol Neurobiol 2003; 28: 209-218.
- Melamed, E. (1979). Early-morning dystonia. A late side effect of long-term Levodopa therapy in Parkinson's disease. *Archives of Neurology*, *36*: 308-310.
- Mercury MG, Tschan W, Kehoe R, Kuechler A. The presence of depression and anxiety in Parkinson's disease. Dis Mon. 2007 May; 53(5):296-301.
- Meredith GE., Haalliday GM., Totterdell S. A critical review of the development and importance of proteinaceous aggregates in animal models of Parkinson's disease: new insghths into Lewy body formation. Parkinsonism Relat Disord 2004; 10: 191-202.
- Micieli G, Tosi P, Marcheselli S, Cavallini A. Autonomic dysfunction in Parkinson's disease. Neurol Sci. 2003 May;24 Suppl 1:S32-4.
- Miller GW, Staley JK, Heilman CJ, Perez JT, Mash DC, Rye DB, Levey Al. Immunochemical analysis of dopamine transporter protein in Parkinson's disease. Ann Neurol. 1997 Apr;41(4):530-9.
- Mohanakumar KP, Hanbauer I, Chiueh CC (1998) Neuroprotection by nitric oxide against hydroxyl radical-induced nigral neurotoxicity. J. Chem. Neuroanat. 14:195-205.
- Molina JA, Jiménez-Jiménez FJ, Navarro JA, Vargas C, Gómez P, Benito-León J, Ortí-Pareja M, Cisneros E, Arenas J. Cerebrospinal fluid nitrate levels in patients with Parkinson's disease. Acta Neurol Scand. 1996 Feb-Mar;93(2-3):123-6.

- Molina y Vedia L, McDonald B, Reep B, Brune B, Di Silvio M, Billiar TR, Lapetina EG (1992) Nitric oxide-induced S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADPribosylation. J Biol Chem 267:24929-24932.
- Möller MN, Li Q, Vitturi DA, Robinson JM, Lancaster JR Jr, Denicola A. Membrane "lens" effect: focusing the formation of reactive nitrogen oxides from the NO/O₂ reaction. Chem Res Toxicol. 2007 Apr;20(4):709-714.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev. 1991 Jun;43(2):109-42.
- Montague PR, Gancayco CD, Winn MJ, Marchase RB, Friedlander MJ. Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. Science. 1994 Feb 18;263(5149):973-937.
- Moore PK, Al-Swayeh OA, Chong NSW, Evans R, Gibson A. L-N^G-nitro-arginine, a novel L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilation in vitro. Br J Pharmacol 1989; 99: 408-412.
- Moore RY., Bloom FE. Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the dopamine systems. Annu Rev Neurosci 1978; 1: 129-169.
- Moratalla R, Quinn B, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW, Graybiel AM. Differential vulnerability of primate caudate-putamen and striosome-matrix dopamine systems to the neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 May 1;89(9):3859-63.
- Morin N, Grégoire L, Morissette M, Desrayaud S, Gomez-Mancilla B, Gasparini F, Di Paolo T. MPEP, an mGlu5 receptor antagonist, reduces the development of l-DOPA-induced motor complications in de novo parkinsonian monkeys: Biochemical correlates. Neuropharmacology. 2013 Mar;66:355-64. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.07.036.
- Moroz IA, Peciña S, Schallert T, Stewart J. Sparing of behavior and basal extracellular dopamine after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal pathway in rats exposed to a prelesion sensitizing regimen of amphetamine. Exp Neurol. 2004 Sep;189(1):78-93
- Morrow BA, Roth RH, Redmond DE Jr, Diano S, Elsworth JD. Susceptibility to a parkinsonian toxin varies during primate development. Exp Neurol. 2012 May;235(1):273-81.
- Mosharov EV, Larsen KE, Kanter E, Phillips KA, Wilson K, Schmitz Y, Krantz DE, Kobayashi K, Edwards RH, Sulzer D. Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and alpha-synuclein causes selective death of substantia nigra neurons. Neuron. 2009 Apr 30;62(2):218-29.

- Mounayar S, Boulet S, Tandé D, Jan C, Pessiglione M, Hirsch EC, Féger J, Savasta M, François C, Tremblay L. A new model to study compensatory mechanisms in MPTP-treated monkeys exhibiting recovery. Brain. 2007 Nov;130(Pt 11):2898-2914.
- Muangpaisan W, Hori H, Brayne C. Systematic review of the prevalence and incidence of Parkinson's disease in Asia. J Epidemiol. 2009;19(6):281-93. Epub 2009 Oct 3.
- Muangpaisan W, Mathews A, Hori H, Seidel D. A systematic review of the worldwide prevalence and incidence of Parkinson's disease. J Med Assoc Thai. 2011 Jun; 94(6):749-55.
- Mufson EJ, Brandabur MM (1994) Sparing of NADPH-diaphorase striatal neurons in Parkinson's and Alzheimer's diseases. NeuroReport 5:705-708.
- Müller T. Motor complications, levodopa metabolism and progression of Parkinson's disease. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2011 Jul;7(7):847-855.
- Müller T, Russ H. Levodopa, motor fluctuations and dyskinesia in Parkinson's disease. Expert Opin Pharmacother. 2006 Sep;7(13):1715-1730.
- Murphy MP (1999) Nitric oxide and cell death. BBA 1411: 401-414. Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell 88:323
- Murphy S, Simmons ML, Agullo L, Garcia A, Feinstein DL, Galea E, Reis DJ, Minc-Golomb D, Schwartz JP. Trends Neurosci. 1993 Aug;16(8):323-8.
- Nadjar A, Gerfen CR, Bezard E. Priming for 1-dopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a feature inherent to the treatment or the disease? Prog Neurobiol. 2009 Jan 12;87(1):1-9.
- Nakane M, Schmidt HHHW, Pollock JS, et al: Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. FEBS Lett 1993; 316: 175-180
- Nallegowda M, Singh U, Handa G, Khanna M, Wadhka S, Yadav S, Kumar G, Behari M. Role of Sensory Input and Muscle Strength in Maintenance of Balance, Gait, and Posture in Parkinson's Disease. A Pilot Study. Am J Phys Med Rehabilit. 2004;83(12): 898-908.
- Nicklas WJ., Vyas I., Heikkila RE. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phnyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phnyl-1,2,5,6.tetrahydropyridine. Life Sci 1985; 36: 2503-2508.
- Nirenberg MJ., Chan J., Liu Y., Edwards RH., Pickel VM. Ultrastructural localization of the vesicular monoamine transporter-2 in midbrain dopaminergic neurons: potential sites for somatodendritic storage and release of dopamine. J Neurosci 1996; 16: 4135-4145.
- Nisenbaum, E.S.; Orr, W.B.; Berger, T.W. Evidence for two functionally distinct subpopulations of neurons within the rat striatum. *J. Neurosci.*, 1988, 8, 4138-4150.
- Novaretti, N.; Padovan-Neto, F.E.; Tumas, V.; da-Silva, C.A.; Del Bel, E.A. Lack of tolerance for the anti-dyskinetic effects of 7-nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, in rats.*Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2010, *43*, 1047-1053.
- Nutt, J.G., Holdorf, N.H. (1996). The response of levodopa in Parkinson's disease: Imposing pharmacological law and order. *Annals of Neurology 39*, 561-573.
- Nutt JG, Wooten GF. Clinical practice. Diagnosis and initial management of Parkinson's disease. N Engl J Med. 2005 Sep 8;353(10):1021-1027.
- Obeso, J.A., Grandas, F., Vaamonde, J. y col. (1989). Motor complications associated with chronic Levodopa therapy in Parkinson's disease. *Neurology*, *39*, 11-19.
- Oka H., Mochio S., Yoshioka M., Morita M., Onuchi K., Inoue K. Cardiovascular dysautonomia in Parkinson's disease and multiple systems atrophy. Acta Neurol Scand 2006: 113: 221-227
- Oka H, Yoshioka M, Onouchi K, Morita M, Mochio S, Suzuki M, Hirai T, Ito Y, Inoue K. Characteristics of orthostatic hypotension in Parkinson's disease. Brain. 2007 Sep;130(Pt 9):2425-432.
- Olanow CW, Lees A, Obeso J. Levodopa therapy for Parkinson's disease: challenges and future prospects. Mov Disord. 2008;23 Suppl 3:S495-6.
- Olds ME, Jacques DB, Kopyov O. Subthalamic responses to amphetamine and apomorphine in the behaving rat with a unilateral 6-OHDA lesion in the substantia nigra. Synapse. 1999 Dec;34(3):228-40.
- Onofrj M, Thomas A, Vingerhoets F, Martin W, Giménez-Roldán S, Azulay JP, Bernhard G, Schmidt W, Markabi S. Combining entacapone with levodopa/DDCI improves clinical status and quality of life in Parkinson's Disease (PD) patients experiencing wearing-off, regardless of the dosing frequency: results of a large multicentre open-label study. J Neural Transm. 2004 Aug;111(8):1053-1063.
- Orimo S., Amino T., Itoh Y. et al. Cardiac sympathetic denervation precedes neuronal loss in the sympathetic ganglia in Lewy body disease. Acta Neuropathol 2005; 109: 583-588.
- Orimo S., Knazawa T., Nakamura A. et al. Degeneration of cardiac sympathetic nerve can occur in multiple system atrophy. Acta Neuropathol 2007; 113: 81-86
- Orimo S, Ozawa E, Nakade S, Hattori H, Tsuchiya K, Taki K, Takahashi A. [123I] meta-iodobenzylguanidine myocardial scintigraphy differentiates corticobasal degeneration from Parkinson's disease. Intern Med. 2003 Jan;42(1):127-128.

- Orimo S., Ozawa E., Nakade S., Sugimoto T., Mizusawa H. 123Imetaiodobenzylguanidine myocardial scintigraphy in Parkinson's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1999 Aug;67(2):189-194.
- Orimo S, Suzuki M, Inaba A, Mizusawa H. 1231-MIBG myocardial scintigraphy for differentiating Parkinson's disease from other neurodegenerative parkinsonism: a systematic review and meta-analysis. Parkinsonism Relat Disord. 2012 Jun;18(5):494-500.
- Orimo S., Takahashi A., Uchihara T. et al. Degeneration of cardiac sympathetic nerve begins in the early disease process of Parkinson's disease. Brain Pathol 2007; 17: 24-30.
- Orimo S, Uchihara T, Nakamura A, Mori F, Kakita A, Wakabayashi K, Takahashi H. Axonal alpha-synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease. Brain. 2008 Mar;131(Pt 3):642-50.
- Orth M., Tabrizi SJ., Tomlinson C., Messmer K., Korlipara LV., Schapira AH., y cols. G209A mutant alpha synuclein expression specifically enhaces dopamine induced oxidative damge. Neurochem Int 2004; 45: 669-676.
- Ouattara B, Hoyer D, Grégoire L, Morissette M, Gasparini F, Gomez-Mancilla B, Di Paolo T. Changes of AMPA receptors in MPTP monkeys with levodopa-induced dyskinesias. Neuroscience. 2010 Jun 2;167(4):1160-1167.
- Ouimet CC, Langley-Gullion KC, Greengard P. Quantitative immunocytochemistry of DARPP-32-expressing neurons in the rat caudatoputamen. Brain Res. 1998 12; 808 (1): 8-12.
- Ouimet CC, Miller PE, Hemmings HC Jr, Walaas SI, Greengard P. DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. III. Immunocytochemical localization. J Neurosci. 1984 Jan;4(1):111-24.
- Ovadia A, Zhang Z, Gash DM. Increased susceptibility to MPTP toxicity in middleaged rhesus monkeys. Neurobiol Aging. 1995 Nov-Dec;16(6):931-937.
- Padovan-Neto, F.E.; Echeverry, M.B.; Tumas, V.; Del-Bel, E.A. Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 2009, 159, 927-935.
- Padovan-Neto, F.E.; Echeverry, M.B.d.; Chiavegatto, S.; Del Bel, E. Nitric oxide synthase inhibitor improves de novo and long-term L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian rats. *Front. Syst. Neurosci.*, 2011, *5*,
- Paille V., Henry V., Lescaudron L., Brachet P., Damier P. Rat model of Parkinson's disease with bilateral motor abnormalities, reversible with levodopa, and dyskinesias. Mov Disord 2007; 22: 533-539.

- Parent A., Hazrati LN. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. Brain Res Brain Res Rev 1995; 20: 91-127
- Parent A, Lavoie B. The heterogeneity of the mesostriatal dopaminergic system as revealed in normal and parkinsonian monkeys. Adv. Neurol. 1993;60:25-33.
- Parent A., Levesque M., Parent M. A re-evaluation of the current model of the basal ganglia. Parkinsonism Realt Disord 2001; 7: 193-198.
- Pascual A., Hidalgo-Figueroa M., Piruat JI., Pintado CO., Gomez-Diaz R., Lopez-Barneo J. Absolute requirement of GDNF for adult catecholaminergic neuron survival. Nat Neurosci 2008; 11: 755-761.
- Pavon, N.; Martin, A.B.; Mendialdua, A.; Moratalla, R. ERK phosphorylation and FosB expression are associated with LDOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. *Biol. Psychiatry*, 2006, *59*, 64-74.
- Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates, 4th edition. New York: Academic Press.
- Pearce RK, Heikkilä M, Lindén IB, Jenner P. L-dopa induces dyskinesia in normal monkeys: behavioural and pharmacokinetic observations. Psychopharmacology (Berl). 2001 Aug;156(4):402-409.
- Pedraza, C., Navarro, J.F. y Arias, J.L. (2002). Effects of L-NOARG, a nitric oxide synthase inhibitor, on Ag-NOR activity in striatum of mice. *Psicothema*, 14, 605-607.
- Pennathur S, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Heinecke JW (1999) Mass spectrometric quantification of 3-nitrotyrosine, ortho-tyrosine, and o,o'-dityrosine in brain tissue of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine-treated mice, a model of oxidative stress in Parkinson's disease. J Biol Chem 274: 34621-34628.
- Pérez-Otaño I, Herrero MT, Luquin MR, Obeso JA, Del Río J. Chronic MPTP treatment reduces substance P and met-enkephalin content in the basal ganglia of the marmoset. Brain Res. 1992 Jul 10;585(1-2):156-60.
- Pérez-Otaño I, Oset C, Luquin MR, Herrero MT, Obeso JA, Del Río J. MPTP-induced parkinsonism in primates: pattern of striatal dopamine loss following acute and chronic administration. Neurosci Lett. 1994 Jul 4;175(1-2):121-125.
- Perlmutter JS, Tempel LW, Black KJ, Parkinson D, Todd RD. MPTP induces dystonia and parkinsonism. Clues to the pathophysiology of dystonia. Neurology. 1997 Nov;49(5):1432-1438.
- Perry TL, Godin DV, Hansen S (1982) Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency? Neurosci Lett 33:305-310.

- Pessiglione M, Guehl D, Hirsch EC, Féger J, Tremblay L. Disruption of self-organized actions in monkeys with progressive MPTP-induced parkinsonism. I. Effects of task complexity. Eur J Neurosci. 2004 Jan;19(2):426-36.
- Picconi, B.; Bagetta, V.; Ghiglieri, V.; Paille, V.; Di Filippo, M.; Pendolino, V.; Tozzi, A.; Giampa, C.; Fusco, F.R.; Sgobio, C.; Calabresi, P. Inhibition of phosphodiesterases rescues striatal longterm depression and reduces levodopainduced dyskinesia. *Brain*, 2011, *134*, 375-387.
- Pifl C, Giros B, Caron MG. Dopamine transporter expression confers citotoxicity to low doses of the parkinsonism-inducing neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium. J. Neurosci. 1993; 13: 4246-4253.
- Pinder RM, Brogden RN, Sawyer PR, Speight TM, Avery GS. Levodopa and decarboxylase inhibitors: a review of their clinical pharmacology and use in the treatment of parkinsonism. Drugs. 1976;11(5):329-377.
- Pioli EY., Meissner W., Sohr R., Gross CE., Bezard E., Bioulac BH. Differential behavioural effects of partial bilateral lesions of ventral tegmental area or substantia nigra pars compacta in rats. Neuroscience 2008; 153: 1213-1224.
- Poewe W. When a Parkinson's disease patient starts to hallucinate. Pract Neurol. 2008 Aug;8(4):238-41.
- Poewe, W.H., Lees, A.J. y Stern, G.M. (1989). Dystonia in Parkinson's disease: Clinical and pharmacological features. *Annals of Neurology*, 23,73-78.
- Pogun S, Baumann MH, Kuhar MJ. Nitric oxide inhibits [3H]dopamine uptake. Brain Res. 1994;641:83-91.
- Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HHHW, Nakane RT. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 10480-10484.
- Pou S, Pou W, Bredt DS Snyder SH, Rosen GM: Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. J Biol Chem 1992: 267: 24173-24176
- Power JH, Blumbergs PC. Cellular glutathione peroxidase in human brain: cellular distribution, and its potential role in the degradation of Lewy bodies in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. Acta Neuropathol. 2009 Jan;117(1):63-73.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Naini AB, Jakowec M, Petzinger G, Miller R, Akram M. The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. J Neurochem. 2001 Mar;76(5):1265-1274.

- Przedborski S, Levivier M, Jiang H, Ferreira M, Jaĉkson-Lewis V, Donaldson D, Togasaki DM. Dose dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastiatal injection of 6-hydroxydopamine. Neuroscience 1995; 67: 631-647.
- Quattrone, A., Zappia, M. (1993). Oral pulse Levodopa therapy in mild Parkinson's disease. *Neurology*, 43,1161-1666.
- Quinn, N., Critchley, P., Marsden, C.D. (1987). Young onset Parkinson's disease. Movement Disorders 2, 73-91.
- Qureshi, G.A.; Baig, S.; Bednar, I.; Sodersten, P.; Forsberg, G.; Siden, A. Increased cerebrospinal fluid concentration of nitrite in Parkinson's disease. *Neuroreport*, 1995, *6*, 1642-1644.
- Raiput AH, Rozdilsky B, Raiput A, Ang L. Levodopa efficacy and pathological basis of Parkinson syndrome. Clin Neuropharmacol. 1990;13: 553-558.
- Ramsay RR., Singer TP. Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinum, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. J Biol Chem 1986; 261: 7587-7587.
- Rascol O, Brooks DJ, Korczyn AD, De Denyn PP, Clarke CE, Lang AE. A fiveyear study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropirinole or levodopa. N Engl J Med. 2000;342: 1484-1491.
- Rauhala P, Lin AM-Y, Chiueh CC (1998) Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurons from oxidative stress. FASEB J 12:165-173.
- Rauhala P, Mohanakumar KP, Sziraki I, Lin AM, Chiueh CC (1996) S-nitrosothiols and nitric oxide, but not sodium nitroprusside, protect nigrostriatal dopamine neurons against iron-induced oxidative stress in vivo. Synapse 23:58-60.
- Reinhard JF Jr., Diliberto EJ Jr., Viveros OH., Daniels AJ. Subcellular comparmentalization of 1-methyl-4-phenylpyridinium with catecholamines in adrenal medullary chromaffon vesicles may explain the lack of toxicity to adrenal chromaffin cells. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 8160-8164.
- Repaske, D.R.; Corbin, J.G.; Conti, M.; Goy, M.F. A cyclic GMPstimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase gene is highly expressed in the limbic system of the rat brain. *Neuroscience*, 1993,*56*, 673-686.
- Reyes S, Fu Y, Double K, Thompson L, Kirik D, Paxinos G, Halliday GM. GIRK2 expression in dopamine neurons of the substantia nigra and ventral tegmental area. J Comp Neurol. 2012 Aug 15;520(12):2591-607.
- Riahi G, Morissette M, Parent M, Di Paolo T. Brain 5-HT(2A) receptors in MPTP monkeys and levodopa-induced dyskinesias. Eur J Neurosci. 2011 May;33(10):1823-31. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07675.x.

- Riederer P, Sofic E, Rausch W-D, Schmidt B, Reynolds GP, Jellinger K, Youdim MBH (1989) Transition metals, ferritin, glutathione and ascorbic acid in parkinsonian brains. J Neurochem 52:515-520.
- Robertson GS, Robertson HA. Synergistic effects of D1 and D2 dopamine agonists on turning behaviour in rats. Brain Res. 1986 Oct 8;384(2):387-90.
- Robottom BJ, Weiner WJ. Dementia in Parkinson's disease. Int Rev Neurobiol. 2009;84:229-44.
- Rodriguez Diaz M., Abdala P., Barroso-Chinea P., Obeso J., Gonzalez-Hernandez T. Motor behavioural changes after intracerebroventricular injection of 6-OHDA in the rat: an animal model of Parkinson disease. Behav Brain Res 2001; 122: 79-92.
- Rodriguez M., Barroso-Chinea P., Abdala P., Obeso J., Gonzalez-Hernandez T. Dopamine cell degeneration induced by intraventricular administration of 6hydroxydopamine in the rat: similarities with cell loss in parkinson's disease. Exp Neurol 2001; 169: 163-181
- Rodriguez-Oroz MC, Jahanshahi M, Krack P, Litvan I, Macias R, Bezard E, Obeso JA. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. Lancet Neurol. 2009 Dec;8(12):1128-39.
- Roedter A, Winkler C, Samii M, Walter GF, Brandis A, Nikkhah G. Comparison of unilateral and bilateral intrastriatal 6-hydroxydopamine-induced axon terminal lesions: evidence for interhemispheric functional coupling of the two nigrostriatal pathways. J Comp Neurol. 2001 Apr 2;432(2):217-229.
- Roghani M, Behzadi G, Baluchnejadmojarad T. Efficacy of elevated body swing test in the early model of Parkinson's disease in rat. Physiol Behav. 2002 Aug;76(4-5):507-10.
- Royland JE, Delfani K, Langston JW, Janson AM, Di Monte DA. 7-Nitroindazole prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced ATP loss in the mouse striatum. Brain Res. 1999 Aug 21;839(1):41-8.
- Rozas G, Guerra MJ, Labandeira-García JL. An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of parkinsonism. Brain Res Brain Res Protoc. 1997 Dec 1;2(1):75-84.
- Ryan, L.J.; Young, S.J.; Segal, D.S.; Groves, P.M. Antidromically identified striatonigral projection neurons in the chronically implanted behaving rat: relations of cell firing to amphetamineinduced behaviors. *Behav. Neurosci.*, 1989, 103, 3-14.
- Sage JI, Mark MH. Pharmacokinetics of continuous-release carbidopa/levodopa. Clin Neuropharmacol. 1994;17 Suppl 2:S1-6.

- Saini R, Patel S, Saluja R, Sahasrabuddhe AA, Singh MP, Habib S, Bajpai VK, Dikshit M. Nitric oxide synthase localization in the rat neutrophils: immunocytochemical, molecular, and biochemical studies. J Leukoc Biol. 2006 Mar;79(3):519-528.
- Salonen I, Huttunen K, Hirvonen MR, Dufva J, Groundstroem K, Dufva H, Salonen RO. Exhaled nitric oxide and atherosclerosis. Eur J Clin Invest. 2012 Feb 15.
- Salvatore MF, Pruett BS. Dichotomy of tyrosine hydroxylase and dopamine regulation between somatodendritic and terminal field areas of nigrostriatal and mesoaccumbens pathways. PLoS One. 2012;7(1):e29867.
- Samadi P, Grégoire L, Morissette M, Calon F, Hadj Tahar A, Bélanger N, Dridi M, Bédard PJ, Di Paolo T. Basal ganglia group II metabotropic glutamate receptors specific blinding in non-human primate model of L-Dopa-induced dyskinesias. Neuropharmacology. 2008 Feb;54(2):258-68.
- Sammut S, Park DJ, West AR. Frontal cortical afferents facilitate striatal nitric oxide transmission in vivo via a NMDA receptor and neuronal NOS-dependent mechanism. J Neurochem. 2007 Nov;103(3):1145-1156.
- Sanchez JJ, Abreu P, Gonzalez MC. Sodium nitroprusside stimulates L-DOPA release from striatal tissue through nitric oxide and cGMP. Eur J Pharmacol. 2002 Mar 1;438(1-2): 79-83.
- Santini E, Valjent E, Fisone G. Parkinson's disease: levodopa-induced dyskinesia and signal transduction. FEBS J. 2008 Apr;275(7):1392-9.
- Savola JM, Hill M, Engstrom M, Merivuori H, Wurster S, McGuire SG, Fox SH, Crossman AR, Brotchie JM. Fipamezole (JP-1730) is a potent alpha2 adrenergic receptor antagonist that reduces levodopa-induced dyskinesia in the MPTPlesioned primate model of Parkinson's disease. Mov Disord. 2003 Aug;18(8):872-883.
- Sawada H, Oeda T, Kuno S, Nomoto M, Yamamoto K, Yamamoto M, Hisanaga K, Kawamura T. Amantadine for dyskinesias in Parkinson's disease: a randomized controlled trial. PLoS One. 2010 Dec 31;5(12):e15298.
- Scatton B, Javoy-Agid F, Rouquier L, Dubois B, Agid Y. Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. Brain Res. 1983 Sep 26;275(2):321-8.
- Schintu N, Frau L, Ibba M, Garau A, Carboni E, Carta AR. Progressive dopaminergic degeneration in the chronic MPTPp mouse model of Parkinson's disease. Neurotox Res. 2009 Aug;16(2):127-139.
- Schmith Y., Schmauss C., Sulzer D. Altered dopamine release and uptake kinetics in mice lacking D2 receptors. J Neurosci 2002; 22: 8002-8009

- Schneider JS., Kovelowski CJ. 2nd. Chronic exposure to low doses of MPTP. I. Cognitive deficits in motor asymptomatic monkeys. Brain Res 1990; 519: 122-128.
- Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinso's disease: 6-OHDA and MPTP. Cell Tissue Res 2004; 318: 215-224.
- Scholz B, Svensson M, Alm H, Sköld K, Fälth M, Kultima K, Guigoni C, Doudnikoff E, Li Q, Crossman AR, Bezard E, Andrén PE. Striatal proteomic analysis suggests that first L-dopa dose equates to chronic exposure. PLoS One. 2008 Feb 13;3(2):e1589.
- Schrag A. Psychiatric aspects of Parkinson's disease-an update. J Neurol. 2004 Jul;251(7):795-804.
- Schulman H. Nitric oxide: a spatial second messenger. Mol Psychiatry. 1997 Jul;2(4):296-269.
- Schulz JB, Matthews RT, Muqit MMK, Browne SE, Flint Beal M (1995) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. J Neurochem 64:936-939.
- Schwarting RK, Huston JP. 1996. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. Prog Neurobiol. 50(2-3): 275-331.
- Schwarting RK, Huston JP. Behavioral and neurochemical dynamics of neurotoxic meso-striatal dopamine lesions. Neurotoxicology. 1997;18(3):689-708.
- Selby G. The Graeme Robertson memorial lecture. 1983: the long-term prognosis of Parkinson's disease. Clin Exp Neurol. 1984;20: 1-25.
- Selikhova M, Williams DR, Kempster PA, Holton JL, Revesz T, Lees AJ. A clinicopathological study of subtypes in Parkinson's disease. Brain. 2009 Nov;132(Pt 11):2947-2957.
- Sheppard SJ, Khalil RA. Risk factors and mediators of the vascular dysfunction associated with hypertension in pregnancy. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. 2010 Mar;10(1):33-52.
- Shergill J. K., Cammack R., Cooper C. E., Cooper J. M., Mann V. M. and Schapira A. H. (1996) Detection of nitrosyl complexes in human substantia nigra, in relation to Parkinson's disease. Biochem. Biophys. Res. Commun. 228, 298-305.
- Shih MC, Franco de Andrade LA, Amaro E Jr, Felicio AC, Ferraz HB, Wagner J, Hoexter MQ, Lin LF, Fu YK, Mari JJ, Tufik S, Bressan RA. Higher nigrostriatal dopamine neuron loss in early tan late onset Parkinson's disease?—a[99mTc]-TRODAT-1 SPECT study. Mov. Disord. 2007 Apr 30;22(6):863-6.

- Shoulson I. DATATOP: a decade of neuroprotective inquiry. Parkinson Study Group. Deprenyl And Tocopherol Antioxidative Therapy Of Parkinsonism. Ann Neurol. 1998 Sep;44(3 Suppl 1):S160-6.
- Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel SE, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P, Marsden CD (1994) Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. Ann Neurol 36:348-355.
- Singer TP., Castagnoli N Jr., Ramsay RR., Trevor AJ. Biochemical events in the development of parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. J Neurochem 1987; 49: 1-8.
- Skirboll S, Wang J, Mefford I, Hsiao J, Bankiewicz KS. In vivo changes of catecholamines in hemiparkinsonian monkeys measured by microdialysis. Exp Neurol. 1990 Nov;110(2):187-93.
- Smith MP, Cass WA. Oxidative stress and dopamine depletion in an intrastriatal 6hydroxydopamine model of Parkinson's disease. Neuroscience. 2007 Feb 9;144(3):1057-66.
- Sofic, E., Pavón, N., Jellinger, K., Riederer, P., and Youdim, M.B.H. (1991) J. Neurochem. 56, 978-982.
- Sonsalla PK, Manzino L, Heikkila RE. Interactions of D1 and D2 dopamine receptor son the ipsilateral vs. contralateral side in rats with unilateral lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway. J Pharmacol Exp Ther. 1988 Oct;247(1):180-5.
- Spillantini,M.G., Crowther,R.A., Jakes,R., Hasegawa,M., and Goedert,M. (1998). alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. Proc Natl Acad Sci U. S. A. 95, 6469-6473.
- Spillantini,M.G., Schmidt,M.L., Lee,V.M., Trojanowski,J.Q., Jakes,R., and Goedert,M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. Nature. *388*, 839-840.
- Stamler JS, Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. Physiol Rev. 2001 Jan;81(1):209-237.
- Stefani, A.; Pierantozzi, M.; Koch, G.; Galati, S.; Stanzione, P. Therapy for Dyskinesias in Parkinson's Disease Patients. *Future Neurol.*, 2010, 5, 277-299.
- Stephenson DT, Childs MA, Li Q, Carvajal-Gonzalez S, Opsahl A, Tengowski M, Meglasson MD, Merchant K, Emborg ME. Differential loss of presynaptic dopaminergic markers in Parkinsonian monkeys. Cell Transplant. 2007;16(3):229-244.

Stern, G. (1989). En: Stern G. Ed. Parkinson's disease. Londres Chapman 12-18.

- Stocchi F, Jenner P, Obeso JA. When do levodopa motor fluctuations first appear in Parkinson's disease? Eur Neurol. 2010;63(5):257-266. Epub 2010 Mar 24.
- Stockwell KA, Scheller D, Rose S, Jackson MJ, Tayarani-Binazir K, Iravani MM, Smith LA, Olanow CW, Jenner P. Continuous administration of rotigotine to MPTP-treated common marmosets enhances anti-parkinsonian activity and reduces dyskinesia induction. Exp Neurol. 2009 Oct;219(2):533-42.
- Stuehr DJ, Fasehun OA, Kwon NS, Gross SS, Gonzales JA, Levi R et al. Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs. FASEB J 1991; 5: 98-103.
- Stuehr DJ, Griffith OW. Mammalian nitric oxide synthases. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 1992; 65: 287-346.
- Sulzer D., Bogulavsky J., Larsen KE., Bher G., Karatekin E., Kleinman MH., y cols. Neuromelatonin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 11869-11874.
- Szabo C, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL (1996) DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. Proc Natl Acad Sci USA 93:1753-1758.
- Szot P, Knight L, Franklin A, Sikkema C, Foster S, Wilkinson CW, White SS, Raskind MA. Lesioning noradrenergic neurons of the locus coeruleus in C57Bl/6 mice with unilateral 6-hydroxydopamine injection, to assess molecular, electrophysiological and biochemical changes in noradrenergic signaling. Neuroscience. 2012 Apr 25.
- Tabbal SD, Mink JW, Antenor JA, Carl JL, Moerlein SM, Perlmutter JS. 1-Methyl-4phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced acute transient dystonia in monkeys associated with low striatal dopamine. Neuroscience. 2006 Sep 1;141(3):1281-1287.
- Takahashi A. Autonomic nervous system disorders in Parkinson's disease. Eur Neurol. 1991;31 Suppl 1:41-7.
- Takeuchi Y, Sawada T, Blunt S, Jenner P, Marsden CD. Effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal pathway on striatal serotonin innervation in adult rats. Brain Res. 1991 Oct 25;562(2):301-5.
- Taki J., Nakajima K., Hwang E., et al. Peripheral sympathetic dysfunction in patients with Parkinson's disease without autonomic failure is heart selective and disease specific. Eur J Nucl Med 2000. 27: 566-573.

- Tayarani-Binazir KA, Jackson MJ, Fisher R, Zoubiane G, Rose S, Jenner P. The timing of administration, dose dependence and efficacy of dopa decarboxylase inhibitors on the reversal of motor disability produced by L-DOPA in the MPTP-treated common marmoset. Eur J Pharmacol. 2010 Jun 10;635(1-3):109-116.
- Taylor H, Minger SL. Regenerative medicine in Parkinson's disease: generation of mesencephalic dopaminergic cells from embryonic stem cells. Curr Opin Biotechnol. 2005 Oct;16(5):487-492.
- Taylor JR, Elsworth JD, Roth RH, Sladek JR Jr, Redmond DE Jr. Severe long-term 1methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in the vervet monkey (Cercopithecus aethiops sabaeus). Neuroscience. 1997 Dec;81(3):745-755.
- Temlett JA, Thompson PD. Reasons for admission to hospital for Parkinson's disease. Intern Med J. 2006;36(8): 524-526.
- Tepper JM, Abercrombie ED, Bolam JP. Basal ganglia macrocircuits. Prog Brain Res. 2007;160:3-7.
- Tetrud JW, Langston JW, Garbe PL, Ruttenber AJ. Mild parkinsonism in persons exposed to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Neurology. 1989 Nov;39(11):1483-1487.
- Thippeswamy T, Morris R (1997) Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate-mediated neuroprotection by nitric oxide in dissociated cultures of rat dorsal root ganglion neurones. Brain Res 774:116-122.
- Timmermann L, Volkmann J. Deep brain stimulation for treatment of dystonia and tremor. Nervenarzt. 2010 Jun;81(6):680-7.
- Tinsley RB., Bye CR., Parish CL., Tziotis-Vais A., George S., Culvenor JG y cols. Dopamine D2 receptor knockout mice develop features of Parkinson disease. Ann Neurol 2009; 66: 472-484.
- Tolosa, E., Martín, W.E., Cohen, H.P. y cols. (1975). Patterns of clinical response and plasma dopa levels in Parkinson's disease. *Neurology*; 25: 177-183.
- Trabace L, Cassano T, Tucci P, Steardo L, Kendrick KM, Cuomo V. The effects of nitric oxide on striatal serotoninergic transmission involve multiple targets: an in vivo microdialysis study in the awake rat. Brain Res. 2004 May 22;1008(2):293-298.
- Trujillo M, Ferrer-Sueta G, Radi R. Peroxynitrite detoxification and its biologic implications. Antioxid Redox Signal. 2008 Sep;10(9):1607-1620.
- Twelves, D., Perkins, K.S., and Counsell, C. (2003). Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. Mov Disord. 18, 19-31.

- Tyler, K. L. (1992). A history of Parkinson's disease. En Koller, (Ed), *Handbook of Parkinson's* disease (pp.1-34). New York: Decker
- Ungerstedt U. 6-Hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons. Eur. J. Pharmacol. 1968; 5: 107-110.
- Ungerstedt U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal system. Acta Physiol. Scand. Suppl. 1971; 367: 69-93.
- Ungerstedt U. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. Acta Physiol Scand Suppl 1971; 367: 1-48.
- Vallance P, Leone A, Calver J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. Lancet 1992; 339: 572-575.
- Van Camp G, Flamez A, Cosyns B. Treatment of Parkinson's disease with pergolide and relation to restrictive valvular heart disease. Lancet. 2004;363: 1179-83.
- Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA, Nelson LM. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. Am J Epidemiol. 2003 Jun 1;157(11):1015-22.
- Van Staveren, W.C.; Steinbusch, H.W.; Markerink-Van Ittersum, M.; Repaske, D.R.; Goy, M.F.; Kotera, J.; Omori, K.; Beavo, J.A.; De Vente, J. mRNA expression patterns of the cGMP-hydrolyzing phosphodiesterases types 2, 5, and 9 during development of the rat brain. J. Comp. Neurol., 2003, 467, 566-580.
- Verbaan D, van Rooden SM, Visser M, Marinus J, van Hilten JJ. Nighttime sleep problems and daytime sleepiness in Parkinson's disease. Mov Disord. 2008 Jan;23(1):35-41.
- Vidailhet M, Rivaud S, Gouider-Khouja N. Eye movements in parkinsonian syndromes. Ann Neurol. 1994;35: 420-426.
- Vila M, Przedborski S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. Nat Rev Neurosci. 2003 May;4(5):365-75. Review.
- Villalba RM, Lee H, Smith Y. Dopaminergic denervation and spine loss in the striatum of MPTP-treated monkeys. Exp Neurol. 2009 Feb;215(2):220-227.
- Vincent SR, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. Neuroscience. 1992;46(4):755-84.
- Von Bohlen Und Halbach O. Synucleins and their relationship to Parkinson's disease. Cell Tissue Res. 2004 Oct;318(1):163-74.

- Von Campenhausen S, Bornschein B, Wick R, Bötzel K, Sampaio C, Poewe W, Oertel W, Siebert U, Berger K, Dodel R. Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. Eur Neuropsychopharmacol. 2005 Aug;15(4):473-490. Review.
- Wakabayashi,K., Matsumoto,K., Takayama,K., Yoshimoto,M., and Takahashi,H. (1997). NACP, a presynaptic protein, immunoreactivity in Lewy bodies in Parkinson's disease. Neurosci. Lett. 239, 45-48.
- Wakabayashi K, Takahashi H. Neuropathology of autonomic nervous system in Parkinson's disease. *Eur Neurol* 1997; 8 (Suppl 2): 2-7.
- Wakeman DR, Dodiya HB, Kordower JH. Cell transplantation and gene therapy in Parkinson's disease. Mt Sinai J Med. 2011 Jan-Feb;78(1):126-58. doi: 10.1002/msj.20233.
- Walker RH, Davies G, Koch RJ, Haack AK, Moore C, Meshul CK. Effects of zona incerta lesions on striatal neurochemistry and behavioral asymmetry in 6 hydroxydopamine-lesioned rats. J Neurosci Res. 2010 Oct;88(13):2964-2975.
- Walker RH, Moore C, Davies G, Dirling LB, Koch RJ, Meshul CK. Effects of subthalamic nucleus lesions and stimulation upon corticostriatal afferents in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat. PLoS One. 2012;7(3):e32919. doi: 10.1371/journal.pone.0032919.
- Weintraub D, Stern MB. Disorders of mood and affect in Parkinson's disease. Handb Clin Neurol. 2007;83C:421-433.
- West, A.R.; Grace, A.A. Opposite influences of endogenous dopamine D1 and D2 receptor activation on activity states and electrophysiological properties of striatal neurons: studies combining *in vivo* intracellular recordings and reverse microdialysis. J. Neurosci., 2002, 22, 294-304.
- West AR, Galloway MP. Endogenous nitric oxide facilitates striatal dopamine and glutamate efflux in vivo: role of ionotropic glutamate receptor-dependent mechanisms. Neuropharmacol. 1997;36:1571-1581.
- West AR, Galloway MP. Intrastriatal infusion of (±)-S-nitroso-N-acetylpenicillamine releases vesicular dopamine via an ionotropic glutamate receptor-mediated mechanism: an in vivo microdialysis study in chloral hydrate-anesthetized rats. J Neurochem. 1996;66:1971-1980.
- West AR, Galloway MP. Nitric oxide and potassium chloridefacilitated striatal dopamine efflux in vivo: role of calciumdependent release mechanisms. Neurochem Int. 1998;33:493-501.
- West, A.R., Galloway, M.P. y Grace, A.A. (2002). Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide: effector pathways and signaling mechanisms. *Synapse*, 44, 227-245.

- West AR, Grace AA. The nitric oxide-guanylyl cyclase signaling pathway modulates membrane activity States and electrophysiological properties of striatal medium spiny neurons recorded in vivo. J Neurosci. 2004 Feb 25;24(8):1924-35.
- West AR, Tseng KY. Nitric Oxide-Soluble Guanylyl Cyclase-Cyclic GMP Signaling in the Striatum: New Targets for the Treatment of Parkinson's Disease? Front Syst Neurosci. 2011; 5:55.
- Westin JE, Lindgren HS, Gardi J, Nyengaard JR, Brundin P, Mohapel P, Cenci MA. Endothelial proliferation and increased blood-brain barrier permeability in the basal ganglia in a rat model of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine-induced dyskinesia. J Neurosci. 2006 Sep 13;26(37):9448-61.
- Wiechelman KJ, Braund RD, Fitzpatrick JD. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for colour formation. Anal Biochem 1988; 175:231–237.
- Wilson, C.J.; Chang, H.T.; Kitai, S.T. Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum. J. Neurosci., 1990, 10, 508-519.
- Wilson, C.J.; Groves, P.M. Spontaneous firing patterns of identified spiny neurons in the rat neostriatum. *Brain Res.*, 1981, 220, 67-80.
- Wink D. A., Cook J. A., Pacelli R., DeGraff W., Gamson J., Liebmann J., Krishna M. C. and Mitchell J. B. (1996) The effect of various nitric oxide-donor agents on hydrogen peroxide-mediated toxicity: a direct correlation between nitric oxide formation and protection. Arc. Biochem. Biophys. 331, 241-248.
- Witjas T, Kaphan E, Azulay JP, Blin O, Ceccaldi M, Pouget J, Poncet M, Chérif AA. Nonmotor fluctuations in Parkinson's disease: frequent and disabling. Neurology. 2002 Aug 13; 59(3):408-413.
- Wong KK, Raffel DM, Koeppe RA, Frey KA, Bohnen NI, Gilman S. Pattern of cardiac sympathetic denervation in idiopathic Parkinson disease studied with 11C hydroxyephedrine PET. Radiology. 2012 Oct;265(1):240-247.
- Wood BH, Bilclough JA, Bowron A, Walker RW. Incidence and prediction of falls in Parkinson's disease: a prospective multidisciplinary study. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2002;72(6): 721-725.
- Yañez-Baña, R.M. (2004). Bases fisiológicas de los trastornos psiquiátricos en la enfermedad de Parkinson. *Revista de neurología*, 29 (7), 636-639.
- Yoshita M. Differentiation of idiopathic Parkinson's disease from striatonigral degeneration and progressive supranuclear palsy using iodine-123 metaiodobenzylguanidine myocardial scintigraphy. J Neurol Sci. 1998 Feb 18;155(1):60-7.

- Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hökfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 15769-15774.
- Yuan H, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. J Neurosci Methods. 2005 May 15;144(1):35-45.
- Yuste JE, Echeverry MB, Ros-Bernal F, Gomez A, Ros CM, Campuzano CM, Fernandez-Villalba E, Herrero MT. 7-Nitroindazole down-regulates dopamine/DARPP-32 signaling in neostriatal neurons in a rat model of Parkinson's disease. Neuropharmacology. 2012 Dec;63(7):1258-1267.
- Zappia M, Nicoletti A. The role of the long-duration response to levodopa in Parkinson's disease. J Neurol. 2010 Nov;257(Suppl 2):S284-287.
- Zhang Z, Andersen AH, Ai Y, Loveland A, Hardy PA, Gerhardt GA, Gash DM. Assessing nigrostriatal dysfunctions by pharmacological MRI in parkinsonian rhesus macaques. Neuroimage. 2006 Nov 1;33(2):636-43.
- Zheng H, Blat D, Fridkin M. Novel neuroprotective neurotrophic NAP analogs targeting metal toxicity and oxidative stress: potential candidates for the control of neurodegenerative diseases. J Neural Transm Suppl. 2006;(71):163-172.
- Zhou FC, Bledsoe S, Murphy J. Serotonergic sprouting is induced by dopamine-lesion in substantia nigra of adult rat brain. Brain Res. 1991 Aug 9; 556(1):108-116.
- Zigmond MJ, Abercrombie ED, Berger TW, Grace AA, Stricker EM. Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. Trends Neurosci. 1990 Jul;13(7):290-6. Review.
- Zuch CL, Nordstroem VK, Briedrick LA, Hoernig GR, Granholm AC, Bickford PC. Time course of degenerative alterations in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion. J Comp Neurol. 2000 Nov 20;427(3):440-454.