

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BROMATOLOGÍA,
TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL.**

FACULTAD DE FARMACIA

**IMPLICACIÓN DE LA DOPAMINA EN LOS PROCESOS
DEGENERATIVOS DEL SISTEMA NIGROESTRIADO**

ROCÍO MARTÍNEZ DE PABLOS

TESIS DOCTORAL, 2005.

ALBERTO MACHADO DE LA QUINTANA, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BROMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

CERTIFICA: Que la tesis doctoral titulada “**Implicación de la dopamina en los procesos degenerativos del sistema nigroestriado**“, presentada por la Lda. Rocío Martínez de Pablos para optar al grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Sevilla, 16 de noviembre de 2004.

Fdo: Alberto Machado de la Quintana.

JOSEFINA CANO GARCÍA, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BROMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

CERTIFICA: Que la tesis doctoral titulada “**Implicación de la dopamina en los procesos degenerativos del sistema nigroestriado**”, presentada por la Lda. Rocío Martínez de Pablos para optar al título de Doctor en Farmacia, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla, bajo mi dirección y reuniendo los requisitos exigidos, dando conformidad a su presentación.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Sevilla, 16 de noviembre de 2004.

Fdo: Josefina Cano García.

Parte de los resultados presentados en esta tesis han sido aceptados para su publicación en el *FASEB Journal*.

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todos los que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar a los doctores Alberto Machado y Josefina Cano, mi directora de tesis, por haberme dado la oportunidad de entrar en este grupo, por apoyarme desde el principio y sobre todo, por contagiarme su enorme pasión por la ciencia.

También quería dar las gracias a los doctores José Luis Venero, Antonio Ayala y Martiniano Santiago, y a Juan Pedro, por ser mis “hermanos mayores” en el laboratorio, por enseñarme, guiarme y aguantarme siempre con una sonrisa y la mejor de las maneras. Y sobre todo, al doctor Antonio J. Herrera, por tener tantísima paciencia conmigo y aportar tanta calma y buen ambiente al laboratorio.

Y como no, quería agradecer a todos mis compañeros becarios, los que ya no están y los que siguen (Inma, Ruth, Sandro, Isita, Mayka, Sonia, Mariam, Miguel Ángel, Jimena, Tedy...) por tantos buenos momentos juntos, dentro y fuera del laboratorio. Por las cenas en casa de Isita, los Sol y Sombra con Mayka, los “cánticos” y bailecillos de Inma, los chistes almonteños, la comida colombiana y, en definitiva, por ser mucho más que compañeros de trabajo, buenos amigos de los que hacen que no cueste nada ir a trabajar.

También quería dar las gracias al personal de administración por ayudarme en la tediosa tarea del papeleo.

Y a mis amigos, los de siempre, por estar cerca hasta cuando casi no nos vemos y celebrar conmigo las becas conseguidas, las publicaciones y cada cosa lograda, grande o pequeña.

Y por último, quería dar las gracias más sinceras a mi familia, por apoyarme en esta tesis como en todo lo demás, por darme todo el cariño y comprensión del mundo, por ser siempre mi referencia y por hacer que mi casa sea el mejor lugar donde se puede estar. Y a Javi, por escucharme siempre y poner tanto interés en mi trabajo, por empujarme a ser cada día mejor en lo profesional y en lo personal y por ser mi gran apoyo y confiar tan ciegamente en mis posibilidades.

Y en definitiva a todos aquellos que de una u otra manera me han ayudado durante estos cuatro años en el laboratorio. A todos vosotros, de corazón, gracias, gracias, gracias.

A mis padres

6-OHDA	6-hidroxidopamina
A	Adrenalina
Ach	Acetilcolina
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
BH ₂	Dihidrobiopterina
BH ₄	Factor pterínico reducido (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopteridina
BHE	Barrera hematoencefálica
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
COX	Ciclooxigenasa
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DBH	Dopamina β-monooxigenasa
DE	Desviación estándar
DHFA	3, 4-dihidroxifenilacetaldehido
DOPA	Dihidroxifenilalanina
DOPAC	3,4-dihidroxifenil acético
ECSIT	Intermediario evolutivo conservado de señales en la vía Toll
EP	Enfermedad de Parkinson
ERK	Kinasas reguladas por señales extracelulares
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GAD	Ácido glutámico descarboxilasa
GFAP	Proteína ácida fibrilar de glía
Glu	Glutamato
GP	Globo pálido
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HPM	Haz prosencefálico medial
HVA	Ácido homovanílico
i.p.	Intraperitoneal
IL	Interleukina
INF	Interferón

iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IRAK	Kinasa asociada al IL-1R
IκB	Proteína de inhibición del NF-κB
JNK	Proteinkinasa del factor de transcripción c-jun
KDO	Ácido 2-ceto-3-desoxioctanoico
L-AADC	L-aminoácido aromático descarboxilasa
LB	Medio de crecimiento Luri
LBP	Proteína de unión al LPS
L-DOPA	L-hidroxifenilalanina
L-NOARG	N ^ω -nitro- L-arginina.
LPS	Lipopolisacárido
MAO	Monoamino oxidasa
MAPK	Proteínas kinasas activadas por mitógenos
MHFA	3-metoxi-4-hidroxifenilacetaldehído
MPP ⁺	1-metil-4-fenil-piridinio
MPTP	1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina
NA	Noradrenalina
NF-κB	Factor nuclear κB
NMDA	N-metil-D-aspartato
NST	Núcleos subtalámicos
PBS	Tampón fosfato salino
PET	Tomografía por emisión de positrones
PK	Proteinkinasa
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PLC	Fosfolipasa C
PNMT	Feniletanolamina-N-metil transferasa
PPT	Proteínfosfatasas
RLO	Radicales libres de oxígeno
SAM	S-adenosilmetionina
s.c.	Subcutáneo.
SM	Esfingomielasa
SN	Sustancia negra

SNC	Sistema nervioso central
SNc	Sustancia negra compacta
SNr	Sustancia negra reticulada
T6BP	Proteína de unión a TRAF6
TAB	Proteínas de unión a TAK-1
TAK	Kinasa activada por el factor de crecimiento transformante β
TBS	Tampón Tris salino
TH	Tirosina hidroxilasa
TK	Tirosinkinásas
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPH	Triptófano hidroxilasa
TRAF-6	Factor 6 asociado al receptor de TNF
TRLs	Receptores Toll
Tyr	L-tirosina
VTA	Área ventral tegmental
α -MPT	α -metilparatirosina

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Ganglios basales.	1
2. Aspectos anatómico-funcionales de los ganglios basales.	2
3. Neurotransmisores y neuromoduladores.	4
4. Principales conexiones de los ganglios basales.	6
5. Neuroquímica de la sustancia negra.	12
6. Funciones de los ganglios basales.	14
6.1. Inhibición del tono motor por los ganglios basales.	14
6.2. Función del núcleo caudado y putamen.	14
6.3. Función del globo pálido.	15
7. Metabolismo de catecolaminas.	16
7.1. Tirosina hidroxilasa.	20
7.2. Transportador de dopamina.	27
7.3. Control de la dopamina sináptica.	29
8. Síndromes clínicos resultantes del daño a los ganglios basales.	33
8.1. Corea y enfermedad de Huntington.	34
8.2. Atenosis.	35
8.3. Hemisbalismo.	35
8.4. Enfermedad de Parkinson.	36
8.5. Tratamiento de la enfermedad de Parkinson.	40
9. Teorías y modelos de neurodegeneración.	42
10. Modelos de Parkinson por inflamación.	44
11. Lipopolisacárido.	48
11.1. Estructura del LPS.	49
11.2. Interacción entre el LPS y proteínas solubles de membrana.	50
11. 3. Transducción de señal inducida por el LPS.	52
11.4. El LPS como modelo de la enfermedad de Parkinson.	56

OBJETIVOS	75
MATERIALES Y MÉTODOS	78
1. Animales.	78
2. Operaciones quirúrgicas.	78
3. Tratamientos.	79
3.1. Controles.	79
3.2. Tratamiento con LPS.	79
3.3. Tratamiento con α -MPT.	79
3.4. Tratamiento con L-DOPA/benserazida.	80
3.5. Tratamiento con sulpiride.	80
3.6. Tratamiento con ácido kinurénico.	82
4. Medida de la temperatura corporal.	82
5. Perfusión de los animales.	83
6. Inmunocitoquímica.	83
6.1. Inmunocitoquímica frente a TH, OX-6 y GFAP.	83
6.2. Análisis de los datos obtenidos por inmunocitoquímica.	84
7. Hibridación in situ.	85
7.1. Obtención de la sonda.	85
7.2. Reacción de hibridación.	87
7.3. Análisis y cuantificación de la señal de hibridación.	88
8. Deshidratación y montaje de las secciones.	90
9. Estadística.	90
10. Reactivos.	90
RESULTADOS	67
	93
1. Medida de la temperatura corporal bajo los distintos tratamientos.	93
2. Efecto de los distintos tratamientos sobre las neuronas dopaminérgicas.	94

2.1. Efecto de la inyección de vehículo.	94
2.2. Efecto de la inyección de LPS.	95
2.3. Efecto del tratamiento con LPS y α -MPT.	97
2.4. Efecto del tratamiento con LPS, α -MPT y L-DOPA/benserazida.	100
2.5. Efecto del tratamiento con LPS y sulpiride.	101
2.6. Efecto del tratamiento con LPS y ácido kinurénico.	101
3. Efecto de los distintos tratamientos sobre las neuronas GABAérgicas.	109
4. Efecto de los distintos tratamientos sobre la astrogliá.	111
4.1. Efecto de la inyección de vehículo.	111
4.2. Efecto de la inyección de LPS.	111
4.3. Efecto del tratamiento con LPS y α -MPT.	113
4.4. Efecto del tratamiento con LPS, α -MPT y L-DOPA/benserazida.	116
4.5. Efecto del tratamiento con LPS y sulpiride.	117
4.6. Efecto del tratamiento con LPS y ácido kinurénico.	117
5. Efecto de los distintos tratamientos sobre la microglía.	120
4.1. Efecto de la inyección de vehículo.	120
4.2. Efecto de la inyección de LPS.	120
4.3. Efecto del tratamiento con LPS y α -MPT.	121
4.4. Efecto del tratamiento con LPS, α -MPT y L-DOPA/benserazida.	125
4.5. Efecto del tratamiento con LPS y sulpiride.	125
4.6. Efecto del tratamiento con LPS y ácido kinurénico.	125
6. Efecto de los distintos tratamientos sobre la producción de BDNF.	128
6.1. Efecto de la inyección de LPS.	128
6.2. Efecto del tratamiento con LPS y α -MPT.	129
6.3. Efecto del tratamiento con α -MPT y L-DOPA/benserazida.	129

DISCUSIÓN	133
1. Efecto de la inhibición de la enzima TH a través de la α -MPT en las características inflamatorias inducidas por la inyección intranigral del LPS.	134
2. Efecto de la restauración de los niveles de DA, disminuidos por el tratamiento con α -MPT, mediante el tratamiento simultáneo con L-DOPA/benserazida sobre la acción de la inyección intranigral de LPS.	138
3. Efecto de los tratamientos con sulpiride y ácido kinurénico.	140
3.1. Tratamiento con sulpiride.	140
3.2. Tratamiento con ácido kinurénico.	143
4. La dopamina endógena y el LPS pueden ejercer un efecto sinérgico en la degeneración neuronal.	145
5. Efectos secundarios descritos en el tratamiento con L-DOPA.	153
CONCLUSIONES	155
BIBLIOGRAFÍA	157

INTRODUCCIÓN

1. GANGLIOS BASALES.

En el siglo XVII el anatómico inglés Thomas Willis fue el primero en realizar una clara identificación de las distintas estructuras subcorticales (1664). Lo que ahora se conoce funcionalmente como ganglios basales entonces se denominaba *corpus striatum*. Ocupaba una posición central, conectada con una gran variedad de fibras corticales y del tronco cerebral, que en aquel tiempo se creyó que era el “*sensorium commune*” definido por Aristóteles. Se pensaba que esta estructura recibía todas las modalidades sensoriales e iniciaba todos los actos motores. Esta idea parecía estar reforzada anatómicamente por su posición ventral y por los sistemas de fibras ascendentes y descendentes claramente visibles.

Dos hechos contribuyeron a relegar al *corpus striatum* a una posición oscura y menos definida: la atractiva organización histológica de la corteza, y la posibilidad de localizar funciones mentales superiores en la misma, lo que llevó a muchos neurólogos de los siglos XVIII y XIX al estudio de la corteza. Aquellos que continuaron estudiando el *corpus striatum*, descubrieron de pronto que muchas de las funciones asignadas originalmente a esta estructura eran, de hecho, propiedad de las rutas corticoespinales vecinas. Como describía Wilson en 1914, el *corpus striatum* “se ha depreciado en su significación fisiológica”.

A principios del siglo XX hubo serios intentos de proporcionar una descripción comparativa y detallada del *corpus striatum* (Ramón y Cajal en 1911; Vogt en 1911; Wilson en 1914). De nuevo ganó importancia con el descubrimiento de que las lesiones de estas áreas en los seres humanos

resultaban con frecuencia en desórdenes de las funciones motoras. El *corpus striatum* se convirtió en el componente principal del sistema motor extrapiramidal. Este término, de una forma un tanto indefinida, agrupa al *corpus striatum* con una serie de núcleos del tronco cerebral, y refleja la presunción de que esta agrupación constituía una unidad motora completa e independiente. El término “ganglios basales” se ha usado generalmente para referirse a estos núcleos anatómicos telencefálicos subcorticales en la base del cerebro anterior. Más formalmente, esta definición agrupa al *corpus striatum*, integrado por el estriado y el globo pálido (GP) con la sustancia negra (SN) y los núcleos subtalámicos (NST).

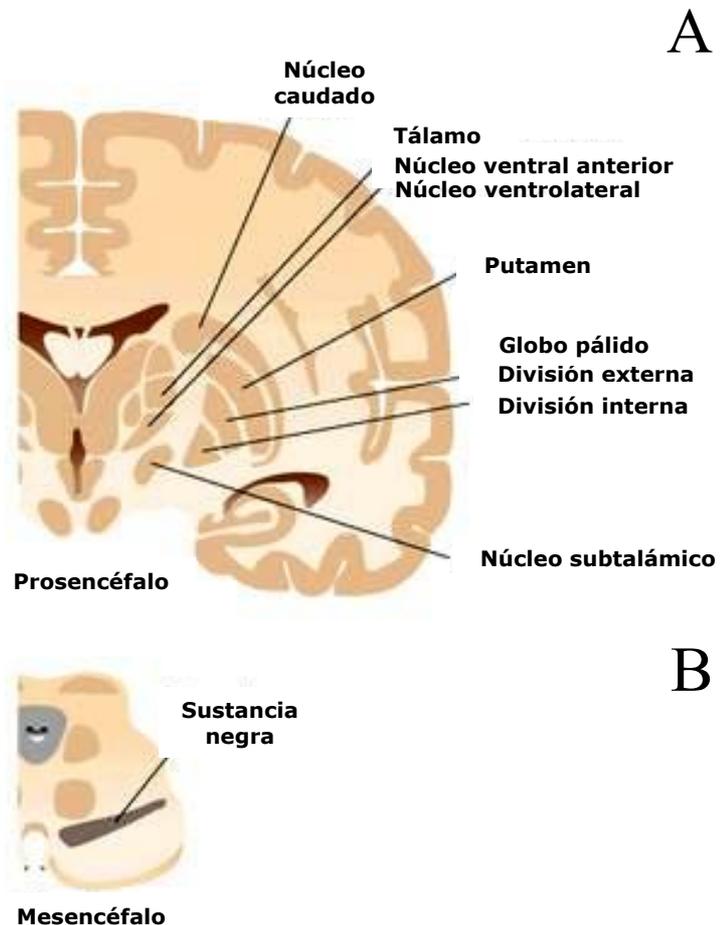
2. ASPECTOS ANATÓMICO-FUNCIONALES DE LOS GANGLIOS BASALES.

En sentido estricto, el término ganglios basales agrupa a los núcleos telencefálicos subcorticales; estos núcleos son el cuerpo estriado y el núcleo amigdalóide. Sin embargo, la SN, los NST e importantes partes del tálamo, como la formación reticular, operan en estrecha asociación con aquellos y, en consecuencia, se consideran parte del sistema de los ganglios basales para el control motor (para revisión, ver Gerfen, 1992).

Así pues, se considera que forman parte de los ganglios basales el caudado, el putamen, el GP, los NST, la SN y el área ventral tegmental (VTA) (Fig. 1; Gerfen 1992). El caudado y el putamen provienen de la misma estructura telencefálica, por lo que están formados por el mismo tipo de células,

fusionándose además por la parte anterior; al conjunto se le conoce como cuerpo estriado, nombre que se le da también en la rata, una especie anatómicamente menos diferenciada, donde ambas estructuras constituyen un núcleo único. El globo pálido se divide en dos segmentos, el externo (GPe) y el interno (GPi); en la rata este último se denomina núcleo entopeduncular. La SN se divide en tres zonas: la parte lateral, la parte reticulada (SNr), que citológicamente se parece al globo pálido, y la parte compacta (SNc), que es dorsal y está más pigmentada, lo que da nombre a esta región.

Fig.1. Distribución anatómica de los ganglios basales. **(A)** Representación esquemática de los distintos núcleos de los ganglios basales incluidos en el prosencéfalo. **(B)** Esquema representativo de la situación de la sustancia negra ubicada en el mesencéfalo.



Al contrario que la mayoría de los componentes del sistema motor, estos núcleos subcorticales no reciben ni envían ninguna conexión directa con la médula espinal. Su aferencia principal proviene de la corteza cerebral y su

Referencia se dirige, a través del tálamo, de vuelta a la corteza, concretamente a las regiones prefrontal, premotora y motora. Por tanto, los ganglios basales, junto con el cerebelo, constituyen el más importante bucle subcortical del sistema motor. La diferencia entre ambos estriba en que, si bien el cerebelo regula directamente la ejecución del movimiento, los ganglios basales están implicados en aspectos cognitivos y de orden superior del control motor. Además, debido a las extensas conexiones de la corteza asociativa y estructuras límbicas, los ganglios basales participan en aspectos no relacionados con el movimiento, como las funciones afectiva y cognitiva.

3. NEUROTRANSMISORES Y NEUROMODULADORES.

En los diversos núcleos de los ganglios basales se encuentran presentes muchos de los neurotransmisores clásicos que tienen acciones post-sinápticas rápidas (Fig. 2), incluido el glutamato (Glu) actuando en receptores no NMDA (N-metil-D-aspartato) y el ácido γ -aminobutírico (GABA). Además, se encuentran muchas sustancias neuromoduladoras con acciones sinápticas lentas, como la dopamina (DA), el glutamato (cuando actúa en receptores del tipo NMDA) y la acetilcolina (ACh).

El glutamato, un neurotransmisor excitatorio, se encuentra en las neuronas piramidales siendo la principal aferencia al estriado (el principal núcleo de entrada a los ganglios basales), las terminales de las neuronas talámicas y las neuronas de proyección de los núcleos subtalámicos. El principal neurotransmisor de los ganglios basales es el GABA, que tiene acción

inhibidora. En el estriado, el GABA se halla en las neuronas de proyección, las neuronas espinosas de tipo medio. Estas neuronas, que poseen abundantes espinas dendríticas, proyectan sus axones a los dos segmentos del globo pálido y a la SNr. Además del GABA, las neuronas espinosas medias contienen encefalinas o sustancia P y dinorfinas. Las neuronas de proyección de los segmentos interno y externo del globo pálido y de la parte reticulada de la sustancia negra contienen también GABA. En consecuencia, el núcleo de salida de los ganglios basales es inhibitor.

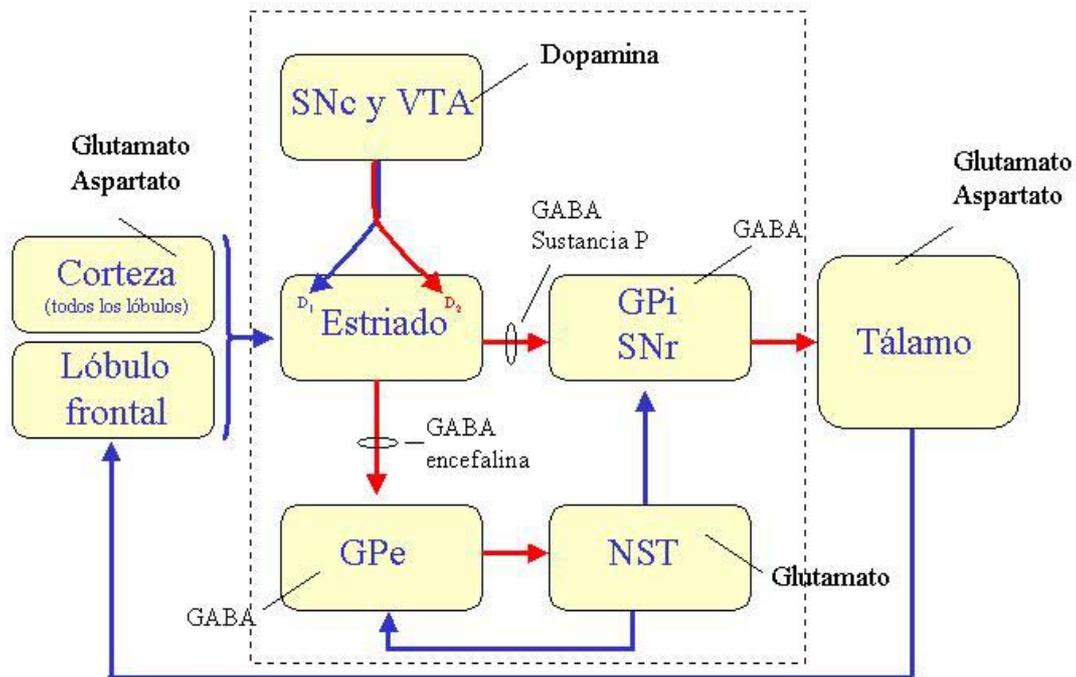


Fig.2. Ilustración de los neurotransmisores de los ganglios basales (en negro) en relación con la organización de los circuitos de estos ganglios. Las flechas azules indican conexión de tipo excitador mediada por glutamato, y las flechas rojas indican conexión de tipo inhibitor mediada por GABA. La conexión entre la SNc y el estriado, que está mediada por dopamina, puede ser excitadora (si actúa sobre receptores D1) o inhibitor (si actúa sobre receptores D2). GABA, ácido γ -aminobutírico; GPi, segmento interno del globo pálido; GPe, segmento externo del globo pálido; SNr, parte reticulada de la sustancia negra; SNc, parte compacta de la sustancia negra; VTA, área ventral tegmental; NST, núcleos subtalámicos. (Adaptado de Haber, S.N. 1968. Neurotransmitters in the human and nonhuman primate basal ganglia. *Human Neurobiol.* 5:159-168).

Las neuronas de la parte compacta de la sustancia negra y del área ventral tegmental son dopaminérgicas. La Ach es también un neurotransmisor habitual en los ganglios basales, encontrándose presente en las interneuronas del estriado, en las que es un neurotransmisor importante para la función de los circuitos neuronales.

4. PRINCIPALES CONEXIONES DE LOS GANGLIOS BASALES.

La proyección más importante que reciben los ganglios basales es la aferencia excitatoria que llega de la corteza cerebral al estriado (Fig. 3). En condiciones de reposo, las neuronas del estriado están en estado quiescente y su actividad es generada por esta aferencia excitadora. La gran mayoría de las neuronas del estriado (90-95%) son las denominadas neuronas espinosas de proyección de tamaño medio. Para estas neuronas se distinguen dos subpoblaciones con, aproximadamente, igual número de células que alcanzan la SN a través de vías diferentes. Se distingue, por un lado, la que proyecta directamente a la SNr (en menor medida a la SNc) y al segmento interno del globo pálido (vía estriadonigral), y por otro, la que alcanza a la SNr mediante conexiones polisinápticas (vía estriadopalidal), proyectando primero al segmento externo del globo pálido, el cual proyecta por una parte a la SN y, por otra, a los núcleos subtalámicos. Todas estas conexiones son inhibitoras, utilizando GABA como neurotransmisor. Los núcleos subtalámicos, por su parte, envían aferencias excitadoras a la SNr. Estas dos vías se diferencian por presentar distinta expresión peptidérgica y de receptores dopaminérgicos. La

vía estriadopalidal, así como la palidonigral, contienen encefalina y expresan el receptor D2 (efecto inhibitor sobre la adenilato ciclasa), mientras que la vía estriadonigral expresa el receptor D1 (activador), sustancia P y dinorfina (Vicent y col., 1982; Gerfen, 1992).

En la parte compacta de la SN y en dos zonas asociadas a ésta, como son la parte lateral de la SN y el área retrorrubral, así como el área ventral tegmental, se sitúan los cuerpos celulares dopaminérgicos. El estriado es innervado principalmente por la SNc, mientras que el VTA inerva estructuras más ventrales como el núcleo accumbens y el tubérculo olfatorio. Las proyecciones dopaminérgicas de la amígdala provienen del VTA y de la parte lateral de la SN. Algunas zonas corticales son también innervadas por estos núcleos dopaminérgicos. Las neuronas dopaminérgicas ejercen un papel importante en la modulación de las aferencias estriatales, así como en las de los ganglios basales en general.

Tanto las proyecciones corticoestriatales, como las estriadopalidales y las estriadonigrales están organizadas topográficamente, lo que significa que partes específicas de la corteza actúan a través de zonas concretas del estriado en localizaciones específicas del GP y la SN, considerándose así todo el complejo como una extensión de la organización laminar de la corteza. Esto es posible, en parte, gracias a la segregación de las neuronas espinosas de tamaño medio en dos compartimientos distintos con áreas de proyección diferenciadas: el de los estriosomas y el de la matriz, los cuales difieren en el patrón de inmunorreactividad de neuropéptidos estriatales tales como encefalinas, sustancia P y dinorfina (Reinier, 1986; Reinier y Anderson, 1990).

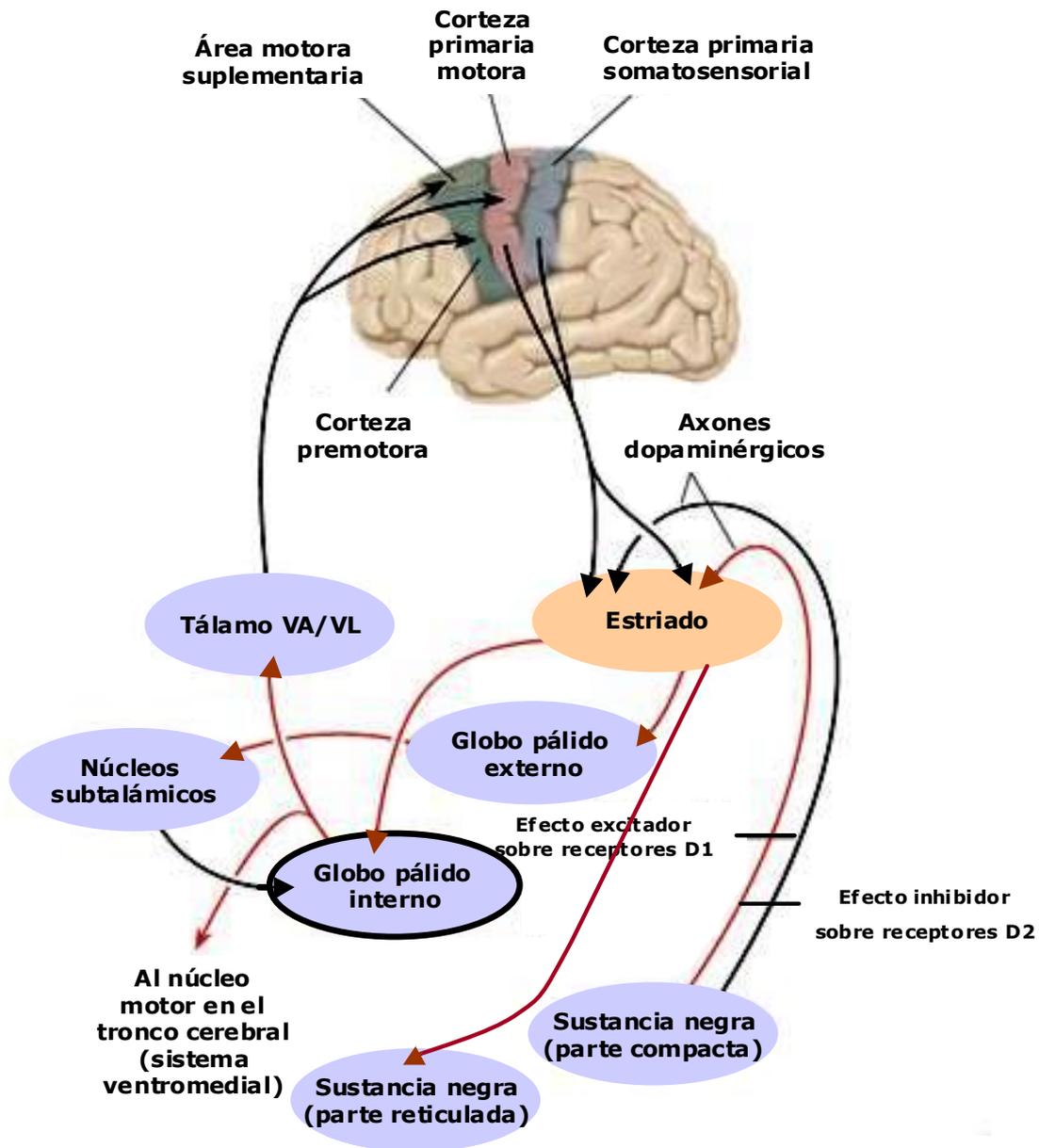


Fig. 3. Representación esquemática de las principales conexiones de los ganglios basales. El principal componente de los ganglios basales, el estriado, recibe aferencias de la corteza. Dos vías de salida principales se dirigen al globo pálido y al complejo de la parte reticulada de la sustancia negra. Las neuronas de dopamina de la parte compacta de la sustancia negra mandan proyecciones al estriado y proporcionan una retroalimentación a través de la vía nigroestriada.

El circuito que comienza en la corteza inervando el estriado y que llega a la SN, bien a través de la vía estriadonigral o de la estriadopalidal, se cierra mediante las neuronas GABAérgicas (y por tanto inhibitoras) de la SNr y del segmento internodal del GP que constituyen la mayor aferencia de los ganglios basales, inervando los núcleos talámicos mediodorsal y ventromedial (los cuales proyectan a la corteza frontal) e intralaminar (el cual proyecta al estriado), el colículo superior y el núcleo pedúnculo-pontino. Estas neuronas son tónicamente activas y producirán, por tanto, la inhibición de las células talámicas que devuelven la proyección a las zonas de la corteza implicadas en el control motor. El movimiento, a nivel de los ganglios basales, se origina cuando las neuronas talámicas son liberadas de esta inhibición tónica con la consiguiente actividad motora de la corteza. Esta inhibición de las neuronas talámicas puede ocurrir a través de las dos vías que conectan el estriado y la SN, la estriadonigral (directa) y la estriadopalidal (indirecta).

Las neuronas de proyección del estriado pertenecientes a la vía directa sinaptan con las neuronas del pálido interno, las cuales a su vez, proyectan a los núcleos lateral ventral y anterior ventral del tálamo (Fig. 4). Este circuito contiene dos neuronas inhibitoras, en el estriado y el globo pálido. Así, la excitación cortical del estriado se transforma en primer lugar en mensaje inhibitor que llega al segmento interno del globo pálido. Sin embargo, el *output* del pálido interno es también inhibitor. En consecuencia, la inhibición del estriado reduce la inhibición del tálamo a partir del segmento palidal interno. A la inhibición de una señal inhibitor se le denomina desinhibición; funcionalmente este “doble negativo” es equivalente a excitación.

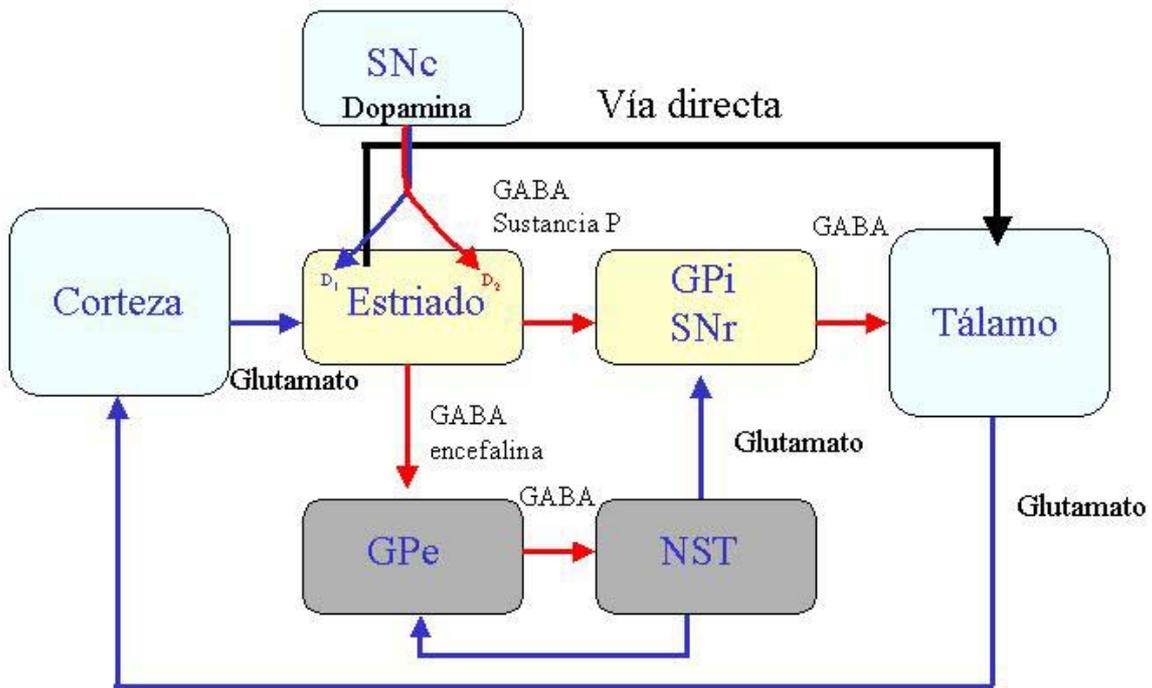


Fig.4. Esquema representativo de la conexión directa de los ganglios basales. Las flechas azules indican conexión de tipo excitador, y las flechas rojas indican conexión de tipo inhibitor. GABA, ácido γ -aminobutírico; GPi, segmento interno del globo pálido; GPe, segmento externo del globo pálido; SNr, parte reticulada de la sustancia negra; SNc, parte compacta de la sustancia negra; NST, núcleos subtalámicos.

La vía indirecta tiene en el tálamo y la corteza un efecto opuesto al de la directa (Fig. 5). La clave para entender la vía indirecta consiste en que el núcleo subtalámico es excitador. Las neuronas del estriado de la vía indirecta, que son inhibitoras, proyectan al segmento palidal externo, cuyo *output* es igualmente inhibitor. Dado que el globo pálido externo proyecta al núcleo subtalámico, el putamen desinhibe al núcleo subtalámico. Esta desinhibición excitará el *output* del núcleo subtalámico, el globo pálido interno y la sustancia

negra reticulada, aumentando así la fuerza de la señal inhibitoria de *output* que se dirige al tálamo.

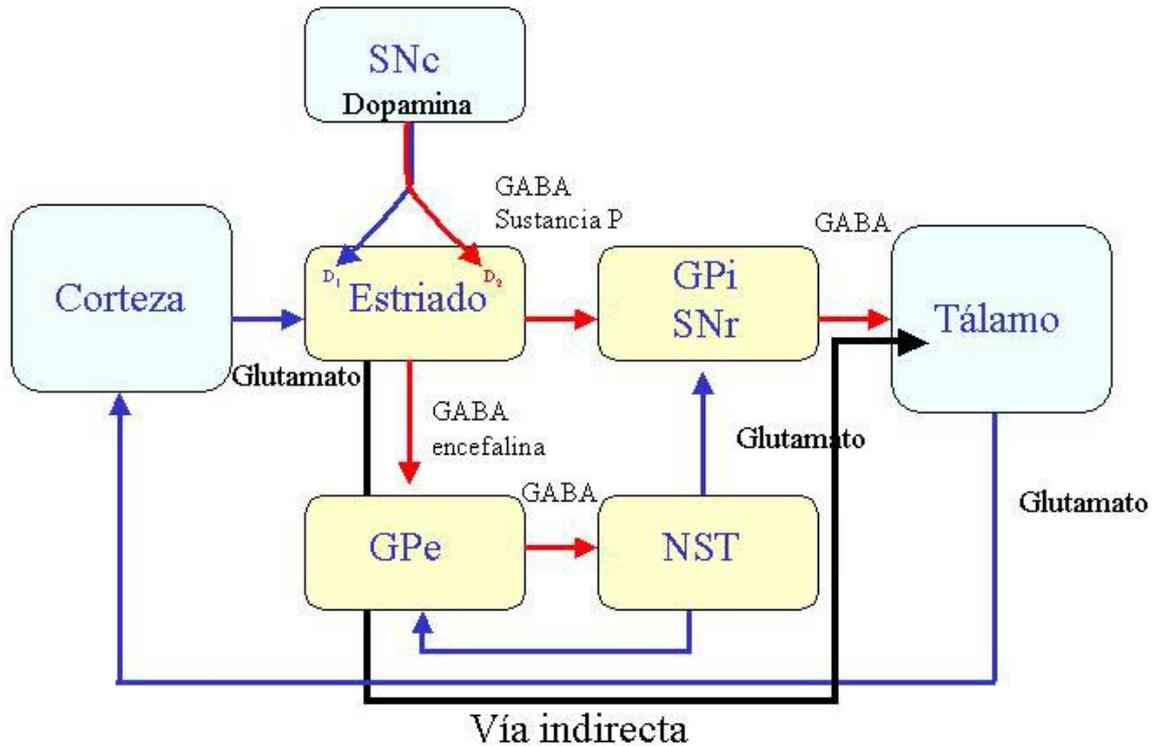


Fig.5. Esquema representativo de la conexión indirecta de los ganglios basales. Las flechas azules indican conexión de tipo excitador, y las flechas rojas indican conexión de tipo inhibitorio. GABA, ácido γ -aminobutírico; GPi, segmento interno del globo pálido; GPe, segmento externo del globo pálido; SNr, parte reticulada de la sustancia negra; Snc, parte compacta de la sustancia negra; NST, núcleos subtalámicos.

En la actualidad este modelo nos está permitiendo entender los mecanismos de algunos signos hipocinéticos e hiperkinéticos que se observan en la patología de los ganglios basales.

Así, en la enfermedad de Parkinson, hay una deficiencia de la dopamina, lo que produce signos hipocinéticos. Se piensa que este neurotransmisor excita

a las neuronas de la vía directa e inhibe a las neuronas estriadas de la vía indirecta.

Estudios recientes sugieren que en la enfermedad de Huntington se produce una pérdida en el estriado de encefalinas, una sustancia neuroactiva localizada en las neuronas de la vía indirecta. Por lo tanto, esta enfermedad provocaría un mayor flujo de *output* talámico hacia la corteza, pero en este caso por disminución de la inhibición estriada del globo pálido externo.

5. NEUROQUÍMICA DE LA SUSTANCIA NEGRA

La sustancia negra se divide fundamentalmente en parte compacta de la sustancia negra (SNc) y parte reticulada de la sustancia negra (SNr).

La SNc está formada principalmente por neuronas de proyección dopaminérgicas. Dentro de la zona que ocupa la SNr también pueden encontrarse algunas neuronas dopaminérgicas, pero se consideran neuronas de la SNc ventralmente desplazadas (Faull y Mehler, 1978; Beckstead y col., 1979; Deutch y col., 1986). La mayor parte de las neuronas dopaminérgicas de la SNc también contienen el neuropéptido colescistoquinina (Fallon y col., 1983; Fallon y Seroogy, 1985; Seroogy y col., 1989) (Ver tabla 1).

La principal eferencia de la SNc se dirige al estriado a lo largo de la parte lateral del haz prosencefálico medial (HPM), aunque también hay proyecciones desde la SNc a la corteza, a la amígdala y al núcleo accumbens (Fallon, 1981; Loughlin y Fallon, 1983, 1984).

Las neuronas de la SNr son principalmente GABAérgicas (Oertel y col., 1982) y muchas de ellas contienen también la proteína fijadora de calcio parvalbúmina (Gerfen y col., 1985; Celio, 1990; Hontanilla y col., 1997; McRitchie y col., 1998). Las principales áreas de proyección de la SNr son el tálamo, el tegmento y el tecto (Faull y Mehler, 1978; Beckstead y col., 1979). La SNr recibe su principal aferencia desde el estriado, formándose por tanto un bucle cerrado entre la SN y el estriado, ya que las neuronas de la SNc proyectan sobre el estriado, y a su vez las neuronas del estriado mandan sus aferencias a la SNr (Szabo, 1962).

En toda la SN (tanto en la SNc como en la SNr) existe una pequeña población de neuronas cuyo neurotransmisor es desconocido que proyectan sobre el estriado (van der Kooy y col., 1981)

Tipo de neurona	Tejido diana	Neurotransmisor	Fenotipo
Neuronas de proyección			
SNPC	CPu,Corteza,AMI,NAc	DA	CCQ,calretinina,(calbindina)
SNPC,SNPR	CPu	No DA ^b	?
SNPR	Tal,Teg,Tecto	GABA	(Parvalbúmina)
SNPR	CPu	DA ^c	Calretinina
Interneuronas			
SNPC	-----	No DA ^b	?

Tabla 1. Resumen de los principales fenotipos neuronales de la sustancia negra. Las subpoblaciones no necesariamente se excluyen mutuamente, pero a no ser que sea indicado de otra manera, la mayoría de las células de cada grupo expresa los fenotipos indicados. Los paréntesis indican pequeñas subpoblaciones.

^bNeurotransmisor desconocido.

^cUn pequeño número de neuronas dopaminérgicas se encuentran “ventralmente desplazadas” en la SNr.

AMI: amígdala; CCK: colescistoquinina; Cpu: caudado-putamen; DA: dopamina; GABA: ácido γ -aminobutírico; Nac: núcleo accumbens; SNc: parte compacta de la sustancia negra; SNr: parte reticulada de la sustancia negra; Tal: tálamo; Teg: tegmento.

6. FUNCIONES DE LOS GANGLIOS BASALES.

Para poder definir las funciones de los ganglios basales, describiremos las funciones de ciertas porciones del sistema de ganglios basales, teniendo en cuenta que el sistema realmente opera junto con la corteza motora y el cerebelo, como unidad total, y que no pueden asignarse funciones particulares a las diferentes partes individuales de los ganglios basales.

6.1. Inhibición del tono motor por los ganglios basales.

Uno de los efectos generales de la excitación difusa de los ganglios basales es inhibir el tono muscular en todo el cuerpo. Este efecto es el resultado de señales inhibitoras transmitidas desde los ganglios basales tanto hacia la corteza motora como hacia la parte inferior del tronco encefálico. En consecuencia, cuando se produce una destrucción extensa de los ganglios basales se provoca una rigidez muscular en todo el cuerpo.

No obstante, la estimulación de ciertas áreas específicas dentro de estos ganglios puede desencadenar contracciones musculares y a veces patrones complejos de movimientos.

6.2. Función del núcleo caudado y putamen.

Parecen funcionar juntos para iniciar y regular movimientos corporales intencionales y toscos que normalmente llevamos a cabo de forma inconsciente, comprometiendo también a la corteza motora. Para llevar a cabo esta función, se transmiten impulsos a través de dos vías diferentes: 1) hacia

el globo pálido, pasando desde allí al tálamo hacia la corteza cerebral y finalmente hacia abajo en dirección a la médula espinal por la vía corticoespinal; 2) hacia abajo a través del globo pálido y la sustancia negra por medio de axones cortos hacia la formación reticular y finalmente hacia la médula espinal principalmente a través de los tractos reticuloespinales.

6.3. Función del globo pálido.

Prácticamente todo el flujo de salida de señales proveniente de los ganglios basales es canalizado a través del globo pálido en su regreso hacia la corteza o en su vía hacia centros cerebrales inferiores. También tiene otra función que opera en estrecha relación con el subtálamo y el tronco encefálico para ayudar a controlar los movimientos corporales axiales y de las cinturas, así como las funciones motoras de las manos y de los pies. Las lesiones del globo pálido interfieren seriamente en los movimientos relacionados con la actitud que es necesaria para la ubicación de la mano y, por ello, hacen difícil o imposible la utilización de la mano para actividades definidas.

La estimulación eléctrica del globo pálido mientras se está llevando a cabo un movimiento corporal grosero detendrá a menudo el movimiento en una posición estática, sosteniendo esa posición durante unos segundos mientras la estimulación continua. Por tanto el globo pálido está implicado en algún tipo de sistema servo de control motor por retroalimentación que es capaz de bloquear las diferentes partes del cuerpo en posiciones específicas.

7. METABOLISMO DE CATECOLAMINAS.

Químicamente, las catecolaminas son compuestos que poseen un grupo catecol (anillo bencénico con dos sustituyentes hidroxilos adyacentes) y un grupo amino. La biosíntesis de las catecolaminas está determinada por cuatro enzimas: Tirosina hidroxilasa (Tirosina-3-monooxigenasa; TH) (EC.1.14.16.2); L-aminoácido aromático descarboxilasa (L-AADC) (EC.4.1.1.28); dopamina β -hidroxilasa (dopamina β -monooxigenasa, DBH) (EC.1.14.17.1) y feniletanolamina-N-metil transferasa (PNMT) (EC.2.1.1.28).

Las neuronas adrenérgicas son las únicas que poseen las cuatro enzimas mencionadas. En neuronas noradrenérgicas la DA es sólo un metabolito intermedio que aparece a muy baja concentración. Estas células carecen de PNMT y el producto final es la noradrenalina (NA). Las neuronas dopaminérgicas carecen de DBH y PNMT, siendo la DA el producto final.

La síntesis de catecolaminas (Fig. 6) se inicia a partir del aminoácido L-tirosina (Tyr). Éste se encuentra disponible en los depósitos tisulares y llega al cerebro con el flujo sanguíneo. Atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE) mediante el sistema transportador de grandes aminoácidos neutros. En las neuronas catecolaminérgicas se transforma en 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) por hidroxilación en la posición 3 del anillo fenilo. Esta reacción está catalizada por la enzima TH. Para llevarse a cabo se requiere el cofactor pterínico reducido (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopteridina (BH_4) y oxígeno molecular. La tasa de hidroxilación *in vivo* de la Tyr depende de la concentración y de la disponibilidad en sustratos específicos e inhibidores

endógenos. Bajo condiciones fisiológicas, la concentración de Tyr parece saturar totalmente a la enzima y, por tanto, no parece ser un factor limitante en la síntesis de DA (Murrin y col., 1976).

El segundo paso de esta ruta es la conversión de L-DOPA en DA mediante descarboxilación, reacción catalizada por la enzima L-AADC. Esta enzima es piridoxal fosfato-dependiente pero no es específica ni con respecto a los sustratos que utiliza ni con respecto a su localización, ya que también puede encontrarse en neuronas serotoninérgicas y en otros órganos como el riñón y el hígado. La actividad de esta enzima es bastante superior a la de la TH, por lo que señala al paso de la hidroxilación del aminoácido como el limitante de la síntesis del neurotransmisor.

La síntesis de NA se realiza a partir de DA en neuronas noradrenérgicas, en nervios simpáticos periféricos y en células de la médula adrenal. La reacción está catalizada por la enzima DBH, la cual hidroxila la cadena etilamina de la DA, usando para ello oxígeno molecular, así como ácido ascórbico como donador de electrones. Esta enzima depende de cobre, por lo que puede ser inhibida por agentes quelantes de este metal.

La adrenalina (A) se sintetiza a partir de NA en células de la médula adrenal y en neuronas adrenérgicas centrales, mediante la enzima PNMT. Esta enzima cataliza la metilación de la NA utilizando S-adenosilmetionina (SAM).

Una vez sintetizados, los neurotransmisores se almacenan en vesículas sinápticas quedando protegidos de la degradación intraneuronal, siendo posteriormente liberados en respuesta a un potencial de acción. Una vez que el neurotransmisor actúa sobre los receptores correspondientes es recaptado por

la propia neurona presináptica o por la célula glial para ser degradado. El proceso de recaptación lo llevan a cabo proteínas que se agrupan en la familia de los transportadores Na⁺/ Cl⁻ dependientes. Este mecanismo no es selectivo para un único neurotransmisor, pudiendo diferenciarse la recaptación de DA de la de NA en la distinta especificidad con que pueden ser inhibidas por antidepresivos tricíclicos.

Tanto DA como NA pueden degradarse por dos rutas diferentes (Fig. 7). En cada una de estas dos vías participan las mismas enzimas, la monoamino oxidasa (MAO) (EC. 1.4.3.4.) y las catecol-O-metiltransferasa (COMT) (EC. 2.1.1.6.), aunque en orden diferente.

En el caso de la DA, la MAO cataliza su desaminación oxidativa dando lugar al 3,4-dihidroxiifenilacetaldehído (DHFA) mediante la siguiente reacción:



En dicha reacción se observa como el metabolismo de DA está estequiométricamente ligado a la formación de peróxido de hidrógeno, el cual puede generar radicales hidroxilos. La Fig. 7 muestra un esquema de la síntesis y degradación de la DA.

Se distinguen dos isoenzimas de la MAO, A y B. Identificadas por Johnston en 1968, se diferencian en base a la preferencia por el sustrato, especificidad del inhibidor, distribución tisular y celular, propiedades inmunológicas y las secuencias aminoacídica y la correspondiente nucleotídica (Westlund y col., 1985). Esta enzima se encuentra unida a la membrana externa de la mitocondria. La DA puede ser metabolizada por ambos tipos de MAO. El DHFA formado por acción de la MAO es muy inestable y es oxidado a

ácido por la aldehído deshidrogenasa dando lugar al ácido 3,4-dihidroxifenil acético (DOPAC), el cual a continuación sale de la neurona y es tomado por la glía actuando sobre él la COMT. Esta enzima cataliza la transferencia de grupos metilos a grupos catecoles a partir de S-adenosilmetionina, para lo que requiere cationes divalentes. Se han caracterizado dos formas distintas de la COMT: una soluble (S-COMT) y otra unida a membranas (MB-COMT), apuntándose la posibilidad de que la S-COMT se localice principalmente en células gliales. La acción de esta enzima sobre el DOPAC genera ácido homovanílico (HVA).

La DA, además de ser recaptada por la neurona, puede ser tomada directamente por la glía, con lo que actuará sobre ella la COMT formando 3-metoxitiramina (3-MT), la cual es metabolizada por la MAO dando lugar al 3-metoxi-4-hidroxifenilacetaldehído (MHFA) que es rápidamente oxidado hasta ácido homovanílico por la aldehído deshidrogenasa.

En el cerebro humano, el 70% de la actividad total de la MAO es del tipo B, mientras que en rata ésta sólo es de un 5% (Riederer y col., 1978; Oreland y col., 1983). La MAO-A está localizada intraneuronal y la MAO-B se encuentra mayoritariamente en la glía (Jarrot e Iversen, 1971; Yu, 1986). Así, en el cuerpo estriado de humanos la desaminación oxidativa de la DA ocurre mayoritariamente a través de la isoforma B de forma extraneuronal (Glover y col., 1980; Oreland y col., 1983), mientras que en la rata tiene lugar principalmente por la isoforma A de manera intraneuronal (Azzaro y col., 1985; Butcher y col., 1990).

7.1. Tirosina hidroxilasa.

En 1953 Udenfriend y Wyngaarden proponen que la tirosina es convertida en L-DOPA por una reacción enzimática, pero la demostración directa de la hidroxilación de la tirosina a L-DOPA no se vio hasta 10 años más tarde, gracias al grupo de Nagatsu (1964).

La tirosina hidroxilasa es una monooxigenasa que cataliza la formación de L-DOPA a partir de L-tirosina en neuronas catecolaminérgicas centrales y periféricas, en ganglios sinápticos, en células cromafines de la médula adrenal y en células PC12 de feocromocitoma de rata (Nagatsu y col., 1964) mediante la siguiente reacción:



La enzima tirosina utilizada como sustrato, requiere oxígeno molecular para su actividad y el cofactor pterínico reducido (BH_4). En la reacción el cofactor es oxidado a dihidrobiopterina (BH_2), la cual es de nuevo reducida a tetrahydrobiopterina por la enzima dihydropteridina reductasa (Kaufman, 1977). En la oxidación del cofactor se forma un producto intermedio, 4- α -hidroxitetrahydrobiopterina, el cual se deshidrata espontáneamente para formar BH_2 (Dix y col., 1987; Haavick y Flatmark, 1987). Además de los sustratos mencionados la enzima necesita el ión ferroso (Fe^{2+}) para su actividad (Haavik y col., 1991). Recientes estudios de mutagénesis han identificado a la His^{331} e His^{336} como los residuos monoacídicos que coordinan al hierro (Ramsey y col., 1995). La actividad máxima se da a pH 6,0.

La enzima está presente en todas las células que sintetizan catecolaminas, siendo la médula adrenal el tejido con mayor contenido de TH.

Por esta razón, la glándula adrenal o tumores derivados de ella han sido frecuentemente utilizados para la purificación de la enzima.

Los trabajos dirigidos a estudiar la localización subcelular de las enzimas sugieren que éstas se encuentran en el citoplasma y también unidas a membranas (Kuczenski y Mandell, 1972). Estas formas muestran diferente afinidad por el cofactor pterínico y diferente sensibilidad a la inhibición por dopamina. En el estriado la forma unida a membrana tiene valores de K_m y K_i menores que la forma soluble. En estudios de enzima purificada a partir de células PC12 de rata, la mayor actividad TH se encuentra en la forma soluble (Andersson y col., 1992). La funcionalidad de la forma unida a membrana no está clara. Se piensa que pueda estar asociada a vesículas sinápticas o a la membrana plasmática en los sitios de liberación de neurotransmisores (Stephens y col., 1981; Morita y col., 1987).

En cuanto a las propiedades moleculares de la enzima, se ha visto por centrifugación en gradiente de sacarosa que la forma nativa es un tetrámero de subunidades idénticas (Vrana y col., 1981), cada una de ellas de peso molecular alrededor de 60.000 daltons. No se sabe claramente si las especies activas de TH son tetraméricas y si las formas monoméricas o diméricas poseen o no actividad catalítica. En base a la secuencia del ADNc, el peso molecular del monómero de la TH de rata es de 55.903 daltons (Andersson y col., 1992) y mediante técnicas de electroforesis bidimensional estiman su pI en aproximadamente 6,3.

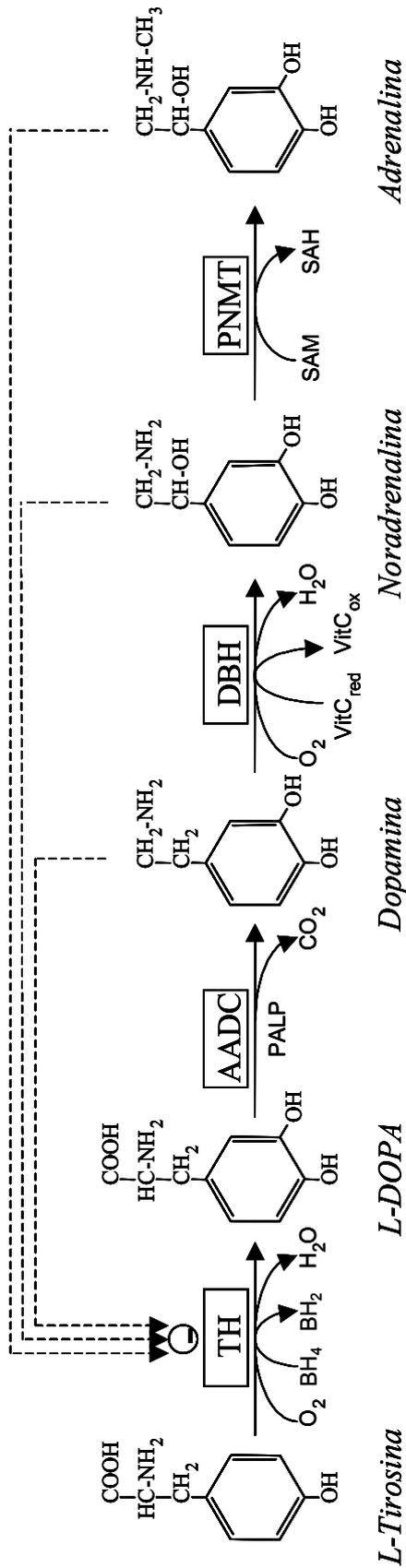
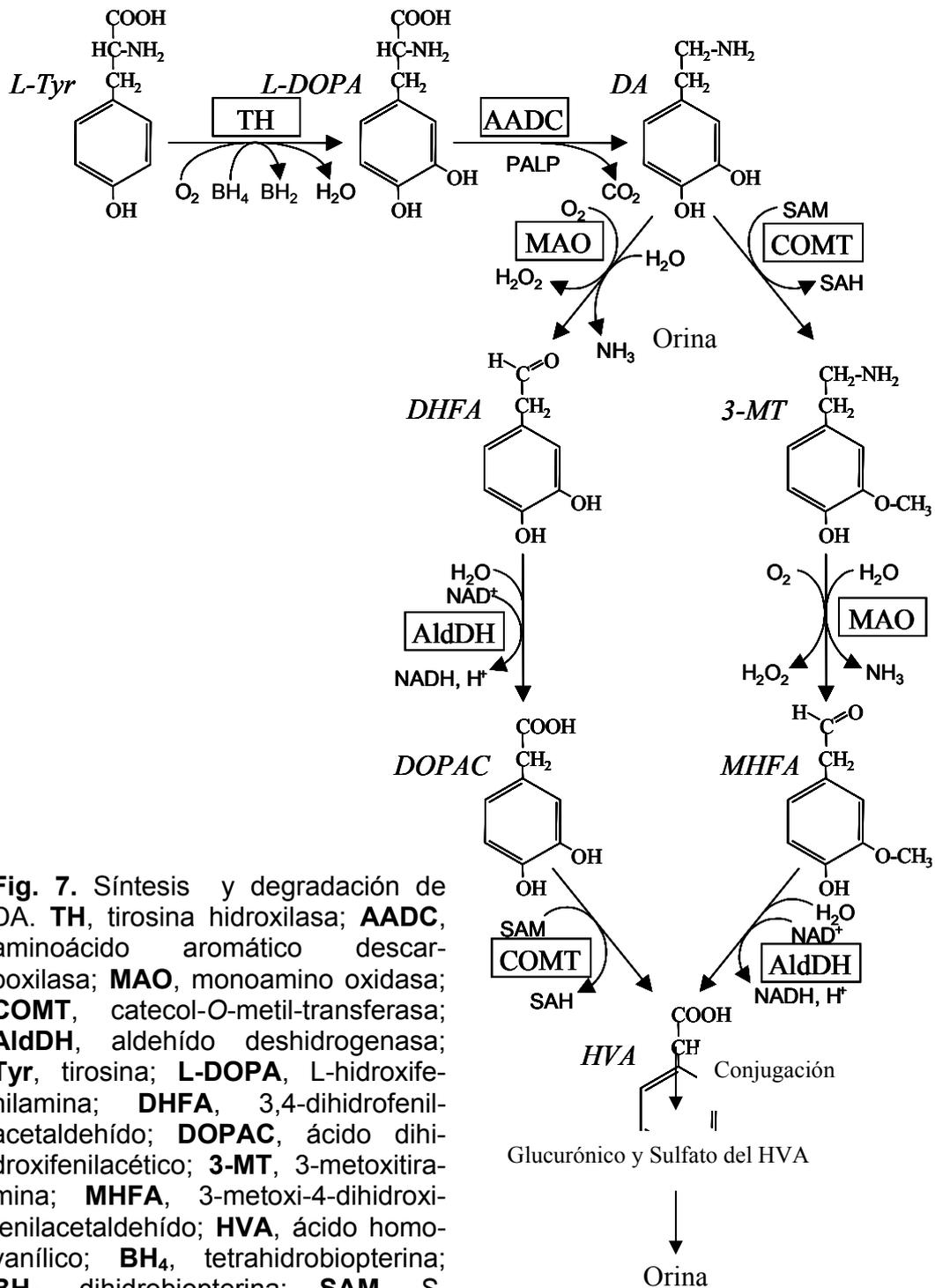


Fig. 6. Síntesis de catecolaminas. Abreviaturas: **L-DOPA**, L-hidroxitifenilalanina; **TH**, tirosina hidroxilasa; **AADC**, aminoácido aromático descarboxilasa; **DBH**, dopamina- β -hidroxilasa; **PNMT**, feniletanolamina-*N*-metiltransferasa; **BH₄**, tetrahidrobiopterina; **BH₂**, dihidrobiopterina; **SAM**, S-adenosilmetionina; **SAH**, S-adenosilhomocisteína; **PALP**, piridoxalfosfato.



Cada una de las subunidades está compuesta por un dominio regulatorio N-terminal y un dominio catalítico C-terminal. Varios hallazgos apoyan este modelo. Por un lado, Grenett y col. (1987) dieron cuenta de que la TH es miembro de una superfamilia genética con la función aminoácido aromático hidroxilasa, entre las que se encuentran la fenilalanina hidroxilasa y la triptófano hiroxilasa (TPH). La caracterización molecular de los genes sugirió que estas enzimas, que llevan a cabo reacciones similares, tenían altamente conservada la secuencia de aminoácidos en la región C-terminal, sugiriendo así que en dicho dominio reside la función catalítica. Se estableció también que la fosforilación de la TH ocurría en los 40 primeros aminoácidos del extremo N-terminal (Campbell y col., 1986; Haycock, 1990).

Los niveles de actividad y cantidad de la enzima TH se controlan por casi todos los mecanismos regulatorios fisiológicos que existen con la excepción de la activación por zimógeno. Se dividen en dos amplias categorías: 1) regulación a corto plazo de la actividad enzimática, y 2) regulación a medio-largo plazo de la expresión génica (para revisión ver Kumer y col., 1996).

1)Regulación a corto plazo:

1.1. Inhibición por retroalimentación negativa.

La actividad TH puede ser inhibida por catecolaminas, las cuales se unen a la enzima libre en el mismo punto en el que se une el cofactor pterínico, evitando así la unión de éste. La inhibición por dopamina es competitiva con respecto a tirosina. Así, aumentando el sustrato pterínico disminuye la

inhibición por catecolaminas. Otro mecanismo inhibitorio en el que participan las catecolaminas implica la formación de un complejo con el ión férrico (Fe^{3+}) en el sitio activo de la enzima, el cual además estabiliza la enzima.

1.2. Regulación alostérica.

Los efectos alostéricos de la TH no parecen estar relacionados con la reacción de hidroxilación de la tirosina ni con los productos formados. Se ha implicado a la heparina, a los fosfolípidos y a los polianiones en la interacción con la TH de manera que aumenta la actividad enzimática. Parece ser que este efecto se lleva a cabo disminuyendo la K_m de la enzima por el cosustrato pterínico.

1.3. Mecanismos de fosforilación-desfosforilación.

1.3.1. Fosforilación.

Éste parece ser el principal mecanismo que controla la actividad TH a corto plazo, estando implicados siete sistemas distintos de proteínas kinasas. Debido a que estos sistemas de mensajero/kinasa comparten algunos de sus efectores es factible que la estimulación de una vía conduzca a la activación (o inhibición) de otra paralela, dándose un fenómeno de “cross-talking”.

Entre los sistemas de proteína kinasas responsables de la activación de la TH destacaríamos: la proteína kinasa dependiente de AMPc, la proteína kinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina y la proteína kinasa dependiente de Ca^{2+} /fosfolípido.

1.3.2. Desfosforilación.

La TH fosforilada es sustrato de la fosfoproteína fosfatasa tipo 2A, la cual es sensible al ácido okadaico, inhibidor de ésta. Así, la fosforilación del

residuo de Ser⁸ de la TH en las terminales dopaminérgicas se intensifica por tratamiento con ácido okadaico.

2) Regulación a medio-largo plazo:

2.1. Control de la actividad traductora.

Hay importantes evidencias de que la expresión génica de la TH puede ser regulada en el paso de traducción de la información del ARNm a la proteína. Los cambios en los niveles de ARNm de la enzima no necesariamente tienen que implicar variaciones en la cantidad o en la actividad de ésta y viceversa.

2.2. Estabilidad de la enzima.

La presencia de tirosina y oxígeno o inhibidores como las catecolaminas estabilizan la enzima. Esta última observación puede ser directamente atribuible al fenómeno de estabilización por catecolaminas descrito anteriormente. El papel de la estabilidad de la enzima en el esquema general de regulación de la biosíntesis de catecolaminas es desconocido.

2.3. Regulación de la transcripción.

Cambios en el estado fisiológico del animal, la administración de glucocorticoides o el estrés producido por inmovilización o frío, así como la administración de drogas activas sobre los sistemas catecolaminérgicos, se han mostrado como fenómenos capaces de modificar los niveles de ARNm de TH.

2.4. Regulación de la estabilidad del ARNm.

Aunque se asume generalmente que los cambios en la cantidad de ARNm vienen motivados por cambios en la transcripción, ésta se puede ver

también modificada postranscripcionalmente por variaciones en la estabilidad de la molécula. Fossom y col. (1992) han demostrado que las condiciones estimulantes de la transcripción génica aumentan la vida media del ARNm.

2.5. Procesamiento alternativo del ARNm.

En tejido humano se han encontrado cuatro formas diferentes de ARNm y sus correspondientes proteínas, en base a las diferentes posibilidades a la hora de transcribir la información del ADN al ARN según los distintos puntos de corte entre intrones y exones. Denominados como hTH-1, 2, 3 y 4, la forma 1 es la más semejante a la única encontrada en rata. Los puntos de corte y empalme se encuentran en el dominio regulatorio amino terminal, con lo cual las proteínas difieren de modo notorio en sus posibilidades de regulación y levemente en sus propiedades catalíticas.

7.2. Transportador de DA.

El gen del transportador de DA se ha clonado en rata (Shimada y col., 1991), vaca (Usdin y col., 1991) y humano (Giros y col., 1992), habiéndose determinado que es una proteína con 12 dominios transmembrana. Pertenece a la familia de transportadores Na^+/Cl^- -dependientes en la que se encuentra también el de noradrenalina (67% de homología de secuencia), serotonina (49%), GABA (45%), glicina (41%) y prolina (44%) entre otros (Miller y col., 1997). Posee un peso molecular de 69.000 daltons con cuatro sitios posibles de N-glicosilación; si bien no se tiene aún absoluta certeza sobre el papel de estos carbohidratos, parecen estar implicados en la regulación de su actividad (Meiergerd y Schenk, 1994).

Mediante estudios de analogía con receptores de catecolaminas, se ha examinado el papel de los residuos aminoacídicos de aspartato y serina que se mantienen conservados en el primer dominio transmembrana de los transportadores de monoaminas. Así, análogamente a los primeros, el aspartato interacciona con el grupo amino de la DA, mientras que la serina lo hace con el grupo catecol (Kitayama y col., 1992).

Asociado al proceso de neurotransmisión dopaminérgica, el ARNm del transportador de DA se expresa de manera intensa en las neuronas mesencefálicas de la SNc y en menor medida en VTA, regiones donde se encuentran densidades apreciables de unión al transportador, así como las respectivas áreas de proyección, el estriado y el núcleo accumbens (Giros y col., 1991; Usdin y col., 1991). En el hipotálamo se ha hallado también expresión en las neuronas dopaminérgicas de la región dorsomedial del núcleo arcuato (Meister y Elde, 1993), localizándose la proteína tanto aquí como en el área de proyección situada en la eminencia media.

El mantenimiento del equilibrio iónico entre el espacio intra- y extracelular juega un papel determinante en el proceso de transporte. En una primera etapa el sodio es cotransportado con la DA al interior de la célula; a continuación el sodio y la DA se disocian y al transportarlo se une al potasio que es liberado al exterior produciéndose a la vez la reorientación de la proteína (White y Patton, 1972; Krueger, 1990). El restablecimiento de los gradientes iónicos lo lleva a cabo la bomba de Na^+/K^+ (Holz y col., 1977).

Dependiendo de las condiciones celulares, el transportador puede funcionar como mediador de la entrada de DA en la célula (recaptación), o bien

produciendo de manera reversa la liberación de ésta. Esta salida del neurotransmisor se produce a partir de la DA que se encuentra libre en el citosol sin mediar impulso nervioso (Westerink y col., 1987).

7.3. Control de la DA sináptica.

La concentración de DA presente en la sinapsis depende de varios factores, como son: su contenido intracelular, su liberación al espacio sináptico, su recaptación y su liberación (Fig. 8).

A) Contenido de la DA intracelular:

El nivel de DA sináptica es regulado indirectamente por su contenido vesicular en el interior de la neurona, el cual se afecta por su síntesis, almacenamiento y metabolismo (Keller y col., 1988). Justice y col. (1988) fue el primero en sugerir la existencia de tres “pools” intraneuronales de DA, los cuales se encuentran en equilibrio. De estos, dos son vesiculares; en uno se encuentra la DA que acaba de ser sintetizada y en el otro se encuentra a modo de reserva. El primero corresponde a la DA que se libera por el proceso de exocitosis a consecuencia del potencial de acción, mostrando ser calcio- y sodio-dependiente. Si la tasa de liberación excede a la capacidad de síntesis se acude a la DA que se encuentra en las vesículas de reserva. El tercer “pool” corresponde a la DA que se encuentra libre en el citoplasma que parece ser la que se libera a través del sistema de transporte reverso (Butcher y col., 1988).

B) Liberación de DA:

La liberación de DA está regulada por una variedad de factores como la cantidad de terminales activadas, la tasa del impulso nervioso y la actividad de

los autorreceptores. La regulación de la liberación de DA es llevada a cabo principalmente por la propia DA. Se acepta que altas concentraciones de DA extracelular inhiben la liberación y bajas concentraciones la aumentan. Esto se apoya en la acción de los autorreceptores presinápticos localizados tanto en el cuerpo celular como en las terminales (Cheramy y col., 1981; Roth y Elsworth, 1995). Los autorreceptores situados en el cuerpo son estimulados por la DA; ésta aumenta la conductancia de potasio y disminuye la frecuencia de disparo, con lo que decrece la liberación y el metabolismo de DA en la terminal. Se ha demostrado que la cantidad de DA liberada depende de la tasa y del patrón de disparo (Bean y Roth, 1991). Estos cambios en el metabolismo de DA llevan asociados cambios en la actividad de TH (Masserano y Weiner, 1983). Los autorreceptores localizados en la región terminal también juegan un papel importante sobre los niveles de DA extracelulares, ya que su estimulación provoca la inhibición de la liberación y/o síntesis del neurotransmisor (Banon y Roth, 1983; Wolf y Roth, 1990). Mediante la perfusión local de los agonistas dopaminérgicos del receptor D2 se ha demostrado la implicación directa de este subtipo de receptor en el mecanismo regulatorio descrito. Se pudo observar la disminución de la concentración extracelular de DA en el estriado (Timmerman y col., 1989a, b; Santiago y Westerink, 1991) y en la sustancia negra (Santiago y Westerink, 1991).

Los agonistas D2 inhiben la liberación de DA por dos mecanismos aditivos y similares: autorreceptores que controlan el impulso nervioso en el cuerpo celular y autorreceptores que controlan la síntesis y/o liberación de DA en la terminal.

C) Recaptación de DA:

El principal mecanismo de inactivación fisiológica de la DA junto con la difusión es la eliminación de ésta del espacio sináptico a través de transportadores localizados pre- y post-sinápticamente, así como en las células gliales que rodean la sinapsis. La mayoría de la DA estriatal es recaptada por la neurona, donde principalmente se reincorpora en las vesículas a través del transportador vesicular de monoaminas (Nissbrandt y col., 1991), siendo el resto catabolizada por la MAO. La que es tomada por la glía se degrada a través de la COMT.

La recaptación de la DA tiene lugar tanto en el área terminal como en la región somatodendrítica, aunque en ambas no parece ocurrir a la misma velocidad, ya que en preparaciones somatodendríticas la recaptación de [³H]-DA es más lenta que en la terminal (Chen y col., 1996), pudiéndose decir que la dinámica de liberación-recaptación es más lenta en el cuerpo que en la terminal. La regulación del proceso de recaptación es diferente en las distintas regiones del cerebro. Se ha mostrado cómo en el sistema de los ganglios basales la liberación y recaptación de DA provocada eléctricamente exhibe heterogeneidad en la sustancia negra, el estriado y el área ventral tegmental (Cragg y col., 1997).

Como base de las diferencias funcionales del transportador se han encontrado cambios en la composición química de éste en el estriado y en el núcleo accumbens. Aunque la porción polipeptídica mostró ser la misma en las dos regiones, el transportador en el núcleo accumbens tenía un peso molecular mayor que en el estriado debido a un mayor grado de glucosilación (Lew y col.,

1992). Esta porción no peptidérgica parece ser importante para su función, ya que se ha observado que su eliminación disminuye la tasa de recaptación en sinaptosomas (Meiegerd y col., 1994). Los modelos heterogéneos de recaptación de DA en la sustancia negra y en el área ventral tegmental resultaron acordes con el patrón de degeneración neuronal en la enfermedad de Parkinson; algunos autores postulan que esta enfermedad es producida por alguna toxina medioambiental (Barbeau, 1985; Tanner, 1989), ya que las células de esta última región resultan ser menos vulnerables por tener una menor capacidad de recaptación de la supuesta neurotoxina que la de la parte compacta de la sustancia negra.

Como factores causales de la enfermedad de Parkinson se han propuesto algunos compuestos neurotóxicos del medio ambiente (Barbeau, 1985; Tanner, 1989). El papel de estos se ve apoyado por el hecho de que el compuesto con el que se consigue uno de los modelos de parkinsonismo existentes hoy día, el MPTP (1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina) y su metabolito MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridina), comparte analogía estructural con algunas de las posibles toxinas ambientales. El MPP⁺ ejerce su mecanismo de acción siendo activamente acumulado en las neuronas dopaminérgicas a través del transportador de DA (Javitch y col., 1985), habiéndose demostrado que inhibidores del sistema de recaptación de DA protegen tanto el cuerpo celular como la terminal de la acción neurotóxica del MPTP/MPP⁺ (Jonsson y col., 1986; Sziráki y col., 1994).

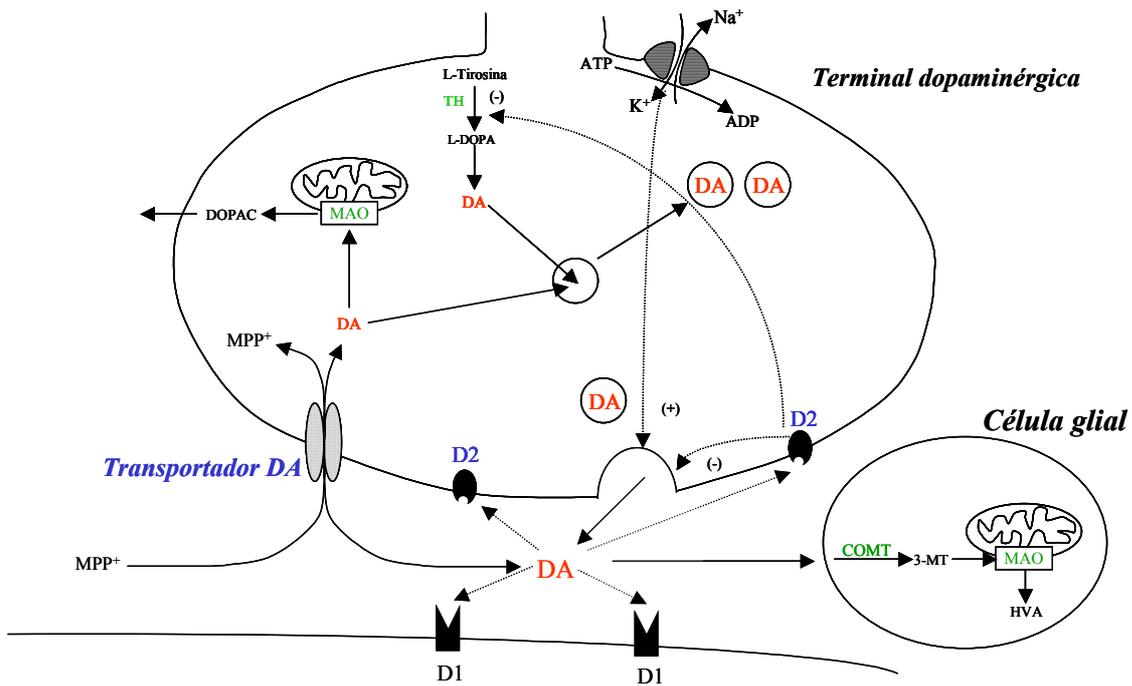


Fig. 8. Representación esquemática de la dinámica del proceso de neurotransmisión dopaminérgico. Abreviaturas: COMT, catecol-o-metiltransferasa; DA, dopamina; MAO, monoamino oxidasa; TH, tirosina hidroxilasa.

8. SÍNDROMES CLÍNICOS RESULTANTES DEL DAÑO A LOS GANGLIOS BASALES.

Como ya hemos comentado existe una notable variedad de disfunciones conductuales que van asociadas a la patología de los ganglios basales. Entre ellas se encuentran la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la atenosis y el hemibalismo.

8.1. Corea y enfermedad de Huntington.

La corea es una enfermedad en la que se producen movimientos incontrolados al azar de tipo “espasmódico” uno después de otro. Es imposible la progresión normal de los movimientos; en lugar de ello, la persona puede llevar a cabo un patrón de movimiento por unos pocos segundos, y luego, repentinamente, otro.

Un tipo particularmente importante de corea es la *Corea de Huntington*, desorden hereditario que comienza generalmente a manifestarse en la tercera o cuarta década de vida. Se caracteriza al principio por movimientos espasmódicos pero luego por movimientos más severamente distorsionantes del cuerpo a medida que la perturbación se torna más seria. Además, se desarrolla demencia grave junto con las disfunciones motoras.

En este tipo de corea existe una degeneración difusa y extensa de neuronas tanto en el núcleo caudado como en el putamen. Las neuronas más comprometidas son las que liberan el transmisor inhibitor GABA, pero también degeneran algunas de las neuronas que liberan Ach. La falta de las neuronas que liberan GABA elimina la inhibición de la vía estriado-nigral y permite que las neuronas secretoras de dopamina de la sustancia negra se tornen sumamente hiperactivas. Esto a su vez permite la liberación excesiva de DA por las fibras nigroestriadas que vuelven al núcleo caudado y putamen, inhibiendo de forma importante a ambos núcleos. Además, la degeneración de neuronas que liberan Ach produce depresión adicional en estos núcleos, pudiendo interrumpir alguno de los haces de retroalimentación desde la corteza hacia los ganglios

basales y nuevamente hacia la corteza a través del tálamo, causando así los movimientos anormales.

8.2. Atenosis.

En esta enfermedad, se producen continuamente movimientos lentos de retorcimiento de la mano, cuello, cara, lengua o de alguna parte del cuerpo. Los movimientos son vermiformes, primero con la extensión excesiva de las manos y dedos, luego flexión, más tarde torsión rotatoria hacia el costado, todos seguidos, en un patrón contorsivo lento, rítmico y repetitivo. Los músculos que se contraen presentan un alto grado de espasmo, y los movimientos son estimulados por las emociones o por señales excesivas provenientes de los órganos sensitivos.

El daño se encuentra habitualmente en la porción lateral del globo pálido o en este área y también en el núcleo caudado y putamen. Generalmente es atribuida a la interrupción de los circuitos de retroalimentación entre los ganglios basales, el tálamo y la corteza cerebral. Al estar bloqueados los circuitos de retroalimentación, los impulsos desviados pueden tomar rutas tortuosas a través de los ganglios basales, tálamo y corteza motora, provocando una sucesión de movimientos anormales.

8.3. Hemibalismo.

Es una sucesión incontrolable de movimientos violentos de grandes áreas del cuerpo. Pueden producirse cada pocos segundos o a veces cada

pocos minutos. El hemibalismo de las piernas o del tronco hace que la persona caiga al suelo si está caminando, e incluso si está en la cama; la persona se sacude violentamente cuando es afectada por estos potentes e intensos movimientos intermitentes.

El hemibalismo en un lado del cuerpo es el resultado de una gran lesión en los núcleos subtalámicos contralaterales. Los movimientos uniformes, progresivos o rítmicos de los miembros u otras partes del cuerpo que se integran normalmente en este área no pueden realizarse más, pero los impulsos excitadores que intentan provocar tales movimientos desencadenan, en cambio, movimientos balísticos incontrolables.

8.4. Enfermedad de Parkinson.

En la enfermedad de Parkinson (EP) se produce una severa patología de los ganglios basales, con especial predilección por la zona ventrolateral de la SNc (Tretiakoff, 1919). La aparición de ciertos rasgos clínicos, como la ataxia, reflejan degeneración en otras áreas cerebrales. Estas regiones incluyen al núcleo periamigdalóide, al *locus ceruleus*, al núcleo motor del vago dorsal, a la sustancia innominada, a los núcleos del rafe y al hipotálamo. El síndrome es normalmente asimétrico con patología de los ganglios basales en el hemisferio contralateral.

El término *substantia nigra* deriva de la presencia del pigmento negro neuromelanina, contenido en las neuronas de la parte compacta. La neuromelanina es un polímero de dihidroxifenilalanina (DOPA), precursor de la dopamina. Como se ha descrito en la enfermedad de Parkinson, las neuronas

dopaminérgicas del mesencéfalo se encuentran afectadas, por lo que se reduce notablemente la dopamina estriatal.

En la parte compacta de la sustancia negra de estos enfermos no se encuentra presente la neuromelanina. También se encuentran afectadas las neuronas dopaminérgicas de otras partes del sistema nervioso central (SNC). Sin embargo, es la pérdida de dopamina en los ganglios basales la que al parecer produce los signos neurológicos más debilitantes.

Por tanto, la característica neuropatológica fundamental en la EP es el “blanqueo” de la franja de la SN, normalmente gris o negra, debido a la pérdida de las neuronas dopaminérgicas melanizadas. Puesto que la enfermedad muestra una especial predilección por la zona ventrolateral de la SNc es en este tipo de células donde comienza la lesión para progresar después a la zona dorsal de esta estructura. Se requiere la muerte de al menos el 60-70% de las neuronas de la SN para la manifestación de los síntomas clínicos, lo cual demuestra la alta plasticidad del sistema dopaminérgico nigroestriado. Aunque inicialmente la pérdida neuronal se localiza en la SN, posteriormente y a medida que la enfermedad progresa, la patología se extiende a otras áreas de los ganglios basales y el tronco cerebral. Sin embargo, otros autores (Braak y col., 1996) han sugerido que la neurodegeneración comienza en la corteza entorrinal, de manera que la cascada de muerte celular se inicia en esta área y continúa con la degeneración de la SN. La velocidad de degeneración en la corteza entorrinal en este caso debería ser más lenta que la de la SN. Consecuentemente y teniendo en cuenta los importantes cambios patológicos

que ocurren en la SN, ésta parece ser la primera región cerebral atacada por este proceso destructivo.

Además de la distribución especial de pérdida de neuronas pigmentadas en la SNc, otra de las características neuropatológicas de la enfermedad es la presencia de inclusiones eosinófilas, llamadas cuerpos de Lewy, presentes en las neuronas supervivientes (Forno, 1982). Estas inclusiones intracitoplasmáticas contienen fundamentalmente formas filamentosas con un centro denso consistente en filamentos orientados radialmente. Parece ser que su formación es el resultado de una acumulación anormal de proteínas del citoesqueleto dentro de la neurona.

La causa o causas de las actividades motoras anormales en la EP son casi desconocidas aunque, como ya se ha comentado, están muy relacionadas con la pérdida de liberación de dopamina en el núcleo caudado y putamen por las terminaciones nerviosas de la vía nigroestriada. La destrucción de la SN hace que las terminales dopaminérgicas degeneren y que ya no esté presente la DA normalmente liberada en el núcleo caudado y putamen. Pero aún existe un gran número de neuronas que liberan Ach, y éstas transmiten señales excitadoras en estos núcleos. En ausencia de la liberación de DA, las vías colinérgicas se tornan excesivamente activas, lo que justificaría muchos de los síntomas motores de la EP.

Desde el punto de vista clínico, la enfermedad de Parkinson se caracteriza por: 1) *rigidez* de la musculatura, en áreas extensas del cuerpo o en áreas aisladas, 2) *temblor en reposo* en las áreas comprometidas, en la

mayoría pero no en todos los casos, y 3) una seria incapacidad de iniciar el movimiento, denominada *acinesia*.

La *rigidez* parkinsoniana es de tipo “plástico”; el movimiento brusco no encuentra habitualmente resistencia intensa a partir de los reflejos de estiramiento; los músculos tanto sinergistas como antagonistas permanecen fuertemente contraídos a lo largo del movimiento. En consecuencia, se cree que la rigidez característica de esta enfermedad es en gran parte el resultado del exceso de impulsos transmitidos por el sistema corticoespinal, activando así las fibras motoras alfa para los músculos, además de la probable activación excesiva también del sistema eferente gamma.

Habitualmente se produce *temblor*; su frecuencia normalmente es de cuatro a seis ciclos por segundo. El mecanismo del temblor no se conoce, aunque un tipo de tratamiento que lo alivia frecuentemente es la destrucción quirúrgica del núcleo ventrolateral del tálamo que es una de las vías de retroalimentación desde los ganglios basales hacia la corteza motora. Por esto, se presume que la pérdida de la influencia inhibidora de la dopamina en los ganglios basales lleva al estímulo de la actividad del circuito de retroalimentación corticobasal ganglionar-talámico-cortical, provocando una oscilación que produce el temblor muscular.

Aunque la rigidez muscular y el temblor son ambos angustiantes para el paciente parkinsoniano, más seria es la *acinesia* que se produce en los estadios finales de la enfermedad. Para realizar aún los movimientos más simples, la persona debe ejercer el grado más alto de concentración y el esfuerzo mental que es necesario para hacer el “arranque” del movimiento está

a menudo más allá de la fuerza de voluntad del paciente. La causa de la acinesia no se conoce. Se presume que la falta de liberación de dopamina en el núcleo caudado y putamen por las fibras nigroestriadas permite una actividad excesiva de las neuronas productoras de acetilcolina. Pero la operación normal de los ganglios basales requiere un equilibrio entre las actividades excitatorias e inhibitorias, y la pérdida de este equilibrio lleva a un sistema de ganglios basales no funcional.

El diagnóstico de la enfermedad de Parkinson se basa generalmente en los datos clínicos expuestos. Sin embargo, nuevas y modernas técnicas de imagen, como la tomografía por emisión de positrones (PET), pueden tener un importante papel en la diferenciación de los distintos síndromes parkinsonianos o en el diagnóstico preclínico de esta enfermedad.

8.5. Tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

El tratamiento médico de la enfermedad de Parkinson suele ser eficaz y debe continuarse durante el resto de la vida del paciente, siendo en cada caso variable el grado de mejoría alcanzado con los diversos fármacos empleados. En general, se fundamenta en las medidas siguientes: *a)* anticolinérgicos; *b)* amantadina; *c)* L-DOPA (o levodopa) y otros fármacos dopaminérgicos, y *d)* medidas generales. Sin embargo, aunque para la mayoría de los pacientes estas medidas mantienen una buena calidad de vida, cuando la enfermedad progresa o cuando estos medicamentos no mejoran la movilidad o producen efectos adversos significativos, debe considerarse el tratamiento quirúrgico.

El tratamiento con L-DOPA o *levodopa* es en la actualidad el más eficaz contra la enfermedad. Se trata de un aminoácido que cruza con facilidad la BHE y que es metabolizado a DA en los ganglios basales por la acción de la enzima DOPA-descarboxilasa, por lo que su administración a pacientes con enfermedad de Parkinson corrige el déficit dopamínico que existe en el núcleo estriado. Este fármaco debe administrarse junto con un inhibidor periférico de la DOPA-descarboxilasa, tales como la carbidopa o la benserazida. Estos inhibidores enzimáticos no atraviesan la BHE, por lo que permiten la transformación de la L-DOPA en dopamina en el cerebro, pero evita esta conversión en los tejidos extracerebrales.

El principal problema del tratamiento con L-DOPA son los frecuentes efectos secundarios que provoca. Los más comunes son los movimientos involuntarios anormales y los trastornos psíquicos. Los movimientos involuntarios anormales consisten en movimientos coreoatetósicos y posturas distónicas, a veces dolorosas, que pueden afectar cualquier grupo muscular, pero que son más patentes en la cara. Los trastornos mentales se observan en el 15-20% de los pacientes. Los más frecuentes, sobre todo en los individuos de edad avanzada, son los estados confusionales, pero puede desencadenarse cualquier cuadro psiquiátrico.

Otro problema importante que surge con el uso de la L-DOPA es que la mejoría inicial obtenida con este tratamiento se mantiene durante 2 o 3 años, a partir de los cuales 1/3 tiende a empeorar poco a poco y otro 1/3 más rápidamente, de tal modo que a los 6 o 7 años de tratamiento continuado, la

incapacidad funcional es igual o mayor que el nivel de incapacidad anterior al tratamiento.

Otra complicación que surge a los 2 o 3 años del tratamiento continuado con L-DOPA es el denominado deterioro de fin de dosis, que consiste en la reaparición, en pacientes previamente bien controlados, de síntomas parkinsonianos varias veces al día, con lo que el paciente alterna períodos de relativo bienestar, durante los cuales los síntomas están bien controlados (períodos *on*), con otros en los que éstos resurgen con intensidad variable (períodos *off*). Cuando estas oscilaciones motoras ocurren de manera súbita y errática son muy incapacitantes y de difícil solución y se denominan fenómenos *on-off*, los cuales afectan al 10% de los pacientes.

En definitiva, el tratamiento con L-DOPA no altera el curso progresivo de la enfermedad, y como su administración es difícil y produce con frecuencia efectos secundarios molestos, su uso debe reservarse para los parkinsonianos con síntomas incapacitantes que no han mejorado con medidas más simples.

9. TEORÍAS Y MODELOS DE NEURODEGENERACIÓN.

Existen diversas teorías que tratan de dilucidar los mecanismos implicados en la degeneración del sistema dopaminérgico (Tomás-Camardiel y col., 2004).

(A) *Estrés oxidativo*. La más importante de las teorías de neurodegeneración se refiere al estrés oxidativo como causa del daño a las neuronas de la SN. Este estrés oxidativo podría estar originado por un incremento de los niveles de

radicales libres de oxígeno (RLO) o bien por una disminución de los mecanismos de defensa frente a ellos. El modelo animal de EP por estrés oxidativo más importante es el basado en el uso de la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) como una toxina dopaminérgica específica. La 6-OHDA destruye las neuronas dopaminérgicas mediante un mecanismo mediado por radicales libres (Cohen and Heikkila, 1974). La especificidad de la neurotoxicidad de la 6-

OHDA está asociada a su recaptación por un mecanismo de transporte específico de las neuronas dopaminérgicas (el transportador de recaptación de DA; DAT) donde se acumula y oxida para producir peróxido de hidrógeno, superóxido y radicales hidroxilos (Cohen and Heikkila, 1974; Graham, 1978).

(B) Fallo energético mitocondrial. Por otro lado, existen numerosos datos que apuntan a la implicación de defectos mitocondriales en la patogénesis de la EP (Beal, 2003). Aunque ésta no parece ser la causa primaria de la enfermedad podría ser un factor importante en su desarrollo. El modelo animal de EP por fallo energético mitocondrial más habitual e importante es el basado en el uso del MPTP y su metabolito MPP⁺, un compuesto cuyo principal efecto tóxico es la inhibición de la actividad del complejo I mitocondrial (Gu y col., 1998). Su selectividad sobre las neuronas dopaminérgicas parece ser debido a su recaptación en las terminales nerviosas del sistema dopaminérgico a través del sistema de recaptación de dopamina anteriormente mencionado (Chiba y col., 1985; Javitch y col., 1985), con su posterior acumulación en la mitocondria.

(C) Inflamación. Desde 1988, cuando McGeer mostró la presencia de marcadores de inflamación en el sistema nervioso central de pacientes con EP, se postuló la implicación de los eventos inflamatorios en la patogénesis de esta

enfermedad neurodegenerativa. McGeer y col. (1988a, b), mostraron la presencia de linfocitos T supresores citotóxicos CD⁺ y de células microgliales activadas con el complejo mayor de histocompatibilidad clase II en el tejido de pacientes con EP. Además, se han descrito diferentes marcadores inflamatorios en cerebros parkinsonianos (Hunot y Hirsch, 2003): (a) En estudios *postmortem* se han encontrado importantes proliferaciones de macrófagos ameboides y microglía reactivos en la SN de pacientes con EP (McGeer y col., 1988a; Hirsch y col., 1998); (b) también aparecen en la SN de este tipo de pacientes células gliales activadas que expresan distintas citokinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , la interleukina (IL)-1 β y el interferón (IFN)- γ (Mogi y col., 1998; Hunot y col., 1999), junto con una expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Hunot y col., 1997; Mogi y col., 1998); (c) por último, se han encontrado incrementos en la expresión de IL-1 y 6 y TNF- α en el fluido cerebroespinal de pacientes con la EP.

10. MODELOS DE PARKINSON POR INFLAMACIÓN.

Todos estos datos sugieren alguna relación entre la neurodegeneración en la EP (y también en los modelos de EP) y los procesos inflamatorios.

Aunque la activación de la microglía es la mayor defensa del cerebro, ésta produce la liberación de varias citokinas y radicales libres, como el radical superóxido y el óxido nítrico (Minghetti y col., 1999). Estos factores microgliales pueden incrementar la neurotoxicidad y contribuir a la neurodegeneración en las enfermedades mediadas por inflamación (McGeer y col., 1988a). En estas

condiciones, los procesos inflamatorios (proliferación y activación de la microglía) podrían ser un evento secundario producido por los procesos degenerativos que ocurren directamente en las neuronas dopaminérgicas, pero al mismo tiempo podrían ayudar al progreso de la degeneración. Además, existe la posibilidad de que los procesos inflamatorios por sí mismos pudieran ser dañinos para las neuronas dopaminérgicas en el sistema nigroestriado.

Existen diversos inductores fisiológicos/patológicos de neuroinflamación que podrían estar implicados en la degeneración del sistema dopaminérgico (Fig. 9). Diferentes toxinas, como la 6-OHDA, el MPTP/MPP⁺ o la rotenona inducen un proceso inflamatorio, además de sus mecanismos tóxicos específicos. También se ha descrito la relación entre el traumatismo físico y la EP (Lees, 1997; Taylor y col., 1999). Un efecto similar se consigue al inyectar histamina, un neurotransmisor que causa la apertura de la BHE (Abbott, 2000), en la SN, produciéndose un daño selectivo en las neuronas dopaminérgicas junto con la activación de la microglía (Vizueté y col., 2000).

Otros factores como determinadas infecciones o inclusiones celulares de proteínas también parecen estar relacionadas con la degeneración del sistema nigroestriado.

Por otro lado, existen compuestos proinflamatorios capaces de producir la activación microglial junto con una inducción de los procesos inflamatorios. Entre estos compuestos destacan el trisialogangliósido (GT1b), las IgGs, la trombina y el lipopolisacárido bacteriano (LPS).

(A) *Trisialogangliósido*. El trisialogangliósido (GT1b) es un componente abundante en las membranas celulares del sistema nervioso humano.

Se ha demostrado que este compuesto induce la muerte de las neuronas dopaminérgicas en cultivos celulares de mesencéfalo de rata (Chung y col., 2001). Además, Ryu y col. (2002) examinaron los efectos neurotóxicos del GT1b en las neuronas dopaminérgicas de la SN de ratas y encontraron que 7 días tras la inyección del GT1b se produce la muerte de neuronas nigrales, incluidas las neuronas dopaminérgicas, y una activación de la microglía presente en esta estructura. La neurotoxicidad ejercida por el GT1b sobre las neuronas dopaminérgicas de la SN es mediada, al menos en parte, por la liberación de NO de las células microgliales.

(B) *Inmunoglobulinas G*. Las células microgliales también son activadas por inmunoglobulinas G (IgGs) de pacientes parkinsonianos en presencia de membranas celulares dopaminérgicas modificadas por bajas dosis de dopa-quinona o H_2O_2 , pero no en presencia de membranas celulares colinérgicas (Le y col., 2001). Esta activación requiere del receptor microglial FCgammaR. A pesar de que la activación microglial produce la liberación de varias citocinas y especies reactivas de oxígeno, sólo el NO y el H_2O_2 parecen mediar el daño celular dopaminérgico inducido por la microglía.

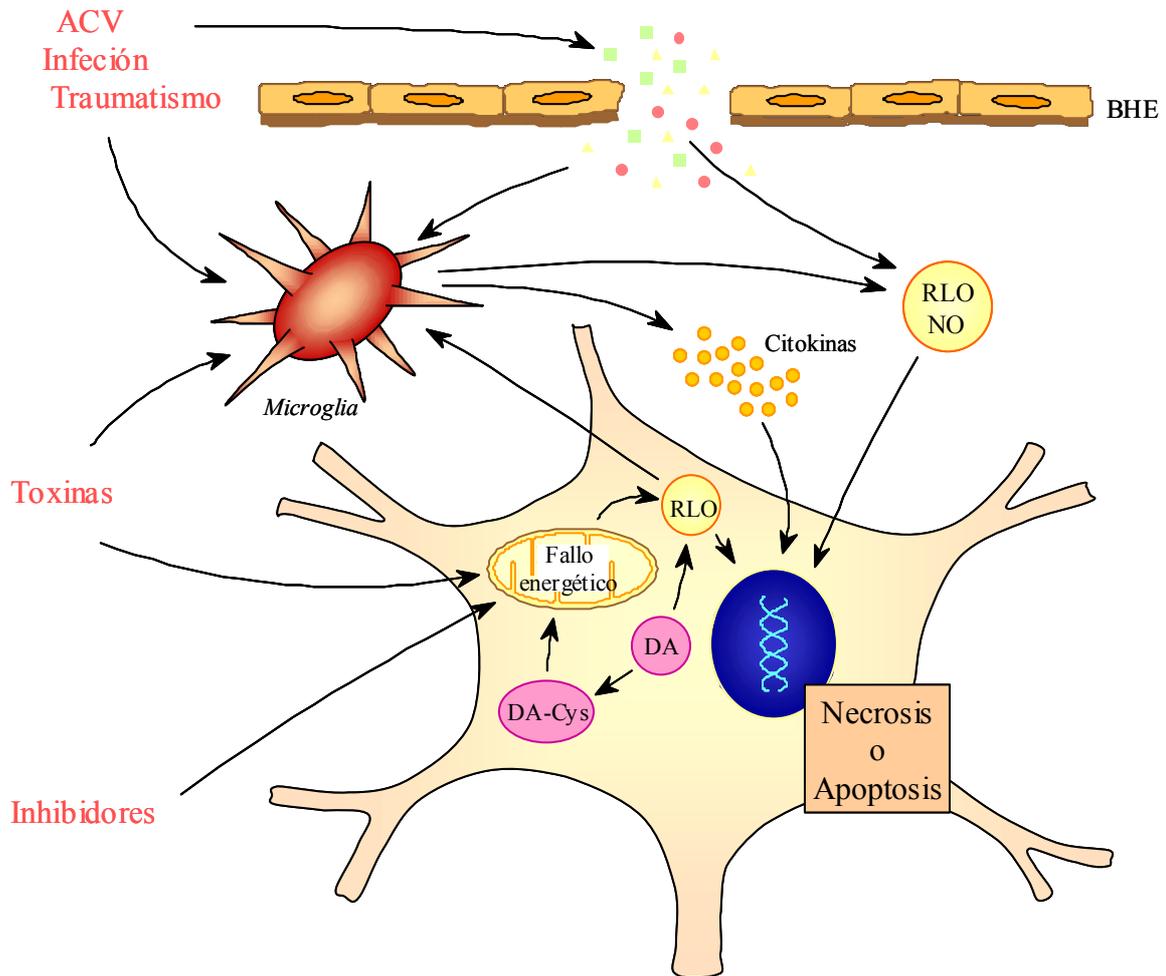


Fig.9. Interacciones neurona-glia que podrían llevar a la muerte neuronal. La inflamación puede estar inducida directamente por diversos factores “externos” como un accidente cerebrovascular (ACV), una infección o un traumatismo, que también podrían producir la rotura de la BHE con la consiguiente extravasación de compuestos que podrían activar las células microgliales y llevar a la formación de RLO. Además, la microglía activada libera varios compuestos, como citocinas proinflamatorias, NO y RLO, lo que podría llevar a la muerte neuronal. Dentro de la neurona dopaminérgica, la cadena respiratoria mitocondrial puede estar afectada por toxinas e inhibidores, lo cual llevaría a un fallo energético, a la producción de RLO y a la reducción de la viabilidad de las neuronas. Estos RLO podrían actuar como una señal para la activación de las células microgliales, indicando que las neuronas no están sanas. La dopamina puede ejercer una acción tóxica a través de sus metabolitos y formando RLO. La DA también puede formar complejos con la cisteína, inhibiendo la cadena respiratoria mitocondrial y produciendo más RLO. La inhibición de la activación microglial puede ser uno de los factores más importantes en la prevención de los procesos neurodegenerativos, ya que la eliminación de la inducción inflamatoria podrían disminuir el daño neuronal (Herrera y col., 2004).

(C) *Trombina*. La trombina es una serinoproteasa multifuncional producida rápidamente desde la protrombina en los lugares de lesión y de rotura de la BHE, lo que sugiere que podría entrar fácilmente en el SNC. Estudios previos en nuestro laboratorio (Carreño-Müller y col., 2003) demostraron que la inyección de diferentes concentraciones de trombina en la SN de la rata produce una fuerte reacción macrófago/microglial en esta estructura junto con la inducción de la expresión de diversas citokinas y mediadores de la inflamación, tales como la iNOS, la IL-1 α , la IL-1 β y el TNF- α . Además, la inyección de trombina produce un daño selectivo sobre las neuronas dopaminérgicas de la SN, dejando inalteradas el resto de fenotipos neuronales presentes en esta estructura.

11. LIPOPOLISACÁRIDO.

El lipopolisacárido o endotoxina representa el principal componente de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y juega un papel clave en el desarrollo de infecciones y sepsis (Rietschel y Brade, 1992; Schletter y col., 1995). El LPS fue descubierto aproximadamente hace unos 100 años por Richard Pfeiffer y, al contrario que la exotoxina segregada por la bacteria del cólera, se trata de una toxina estable al calor (Ulmer y col., 2002).

11.1. Estructura del LPS.

Aunque existe una gran variación en la composición del LPS, todos ellos muestran una estructura común. Se trata de moléculas anfipáticas consistentes en una parte polisacárida e hidrófila que va unida covalentemente a un componente lipídico e hidrófoba, denominado lípido A (Fig. 10). El heteropolisacárido comprende dos regiones: la cadena O-específica también llamada antígeno O, formada por unidades repetitivas de oligosacárido; y la región central o *core*. Éste a su vez se subdivide en *core* externo (formado por hexosas), mediante el cual se une al antígeno O, y el *core* interno (formado por heptosas). El lípido A se compone en general de un disacárido fosforilado, unido a dos D-glucosaminas en posición $\beta 1,6$ y que porta un máximo de seis o siete residuos acilo. Se une al *core* interno mediante un residuo llamado KDO (ácido 2-ceto-3-desoxioctanoico).

Existen variaciones en la longitud, posición y número de ácidos grasos que componen el lípido A.

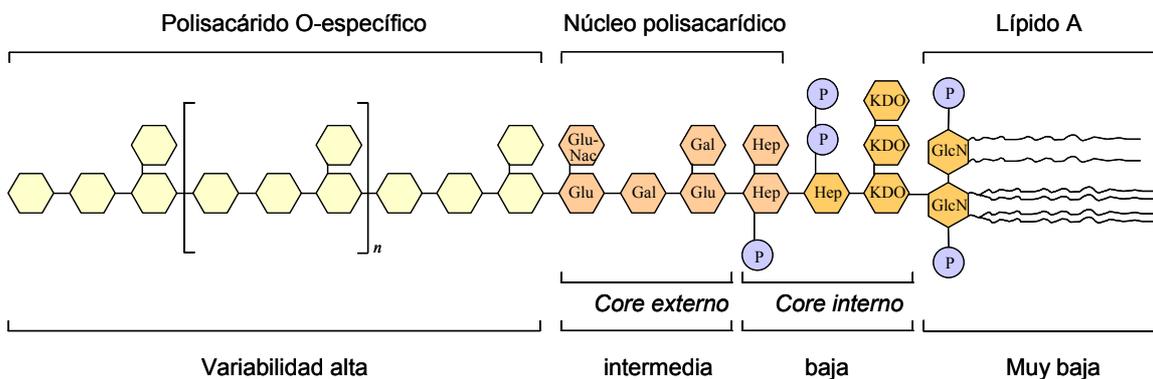


Fig. 10. Estructura química y variabilidad del lipopolisacárido.

11.2. Interacción entre el LPS y proteínas solubles de membrana.

Un requisito previo para la activación de las células por el LPS es su interacción con moléculas específicas de unión al LPS en la superficie de sus células diana. Se han descrito varias estructuras de unión al LPS, pero sólo se ha demostrado una relevancia fisiológica para algunas de ellas (Fig. 11).

La proteína de la superficie celular más importante relacionada con la unión al LPS y a su activación celular es la glucoproteína de 55 kDa CD14 (Tanaka y col., 2000). El CD14 existe como una proteína de membrana (CD14m) anclada a un glicosilfosfatidilinositol (GPI) en las células monocíticas, leucocitos polimorfonucleares y algunos linfocitos B (Gu y col., 1998) y células epiteliales. La unión del LPS al CD14m en los monocitos es necesaria para la estimulación de estas células, lo cual lleva a una producción y liberación de mediadores inmunes.

La unión del LPS al receptor CD14 está fuertemente incrementada por una glucoproteína sérica de 60 kDa denominada proteína de unión al LPS (LPS-binding protein o LBP) (Staal y Sonsalla, 2000; Tanaka y col., 2000). Durante la respuesta de fase aguda la concentración de LBP se incrementa desde 5-10 µg/ml hasta 200 µg/ml (Staal y Sonsalla, 2000). El LBP reduce la concentración de LPS requerida para la activación de los monocitos formando complejos LBP-LPS, que son reconocidos por el CD14.

Además del CD14m, existen distintos tipos de CD14 solubles (de 48, 53 y 55 kDa) presentes en concentraciones de alrededor de 2-6 µg/ml en el suero (Frey y col., 1992), y que son liberados por monocitos o bien secretados por formas libres de GPI (Alam y col., 1997a, b; McNaught y Olanow, 2003). Se

sabe que el LPS se une directamente a las formas solubles del CD14 (CD14s), un proceso altamente facilitado por el LBP, a pesar de que esta proteína no está presente en los complejos de LPS-CD14s (Andrew y col., 1993). Los complejos LPS-CD14s permiten la activación de algunas células sin CD14m, como células endoteliales, fibroblastos y células del músculo liso que producirían citocinas (Benveniste, 1992; Good y col., 1992; Wang y col., 2002). Así, se ha postulado la existencia de un receptor específico para los complejos de LPS-CD14s que se expresaría en estas células y que mediaría la activación por el LPS de las células sin CD14. En conclusión, el CD14 como receptor soluble de membrana, jugaría un papel extremadamente importante en el reconocimiento molecular del LPS en varias células. Sin embargo, parece que para la activación celular se requieren moléculas de membrana adicionales.

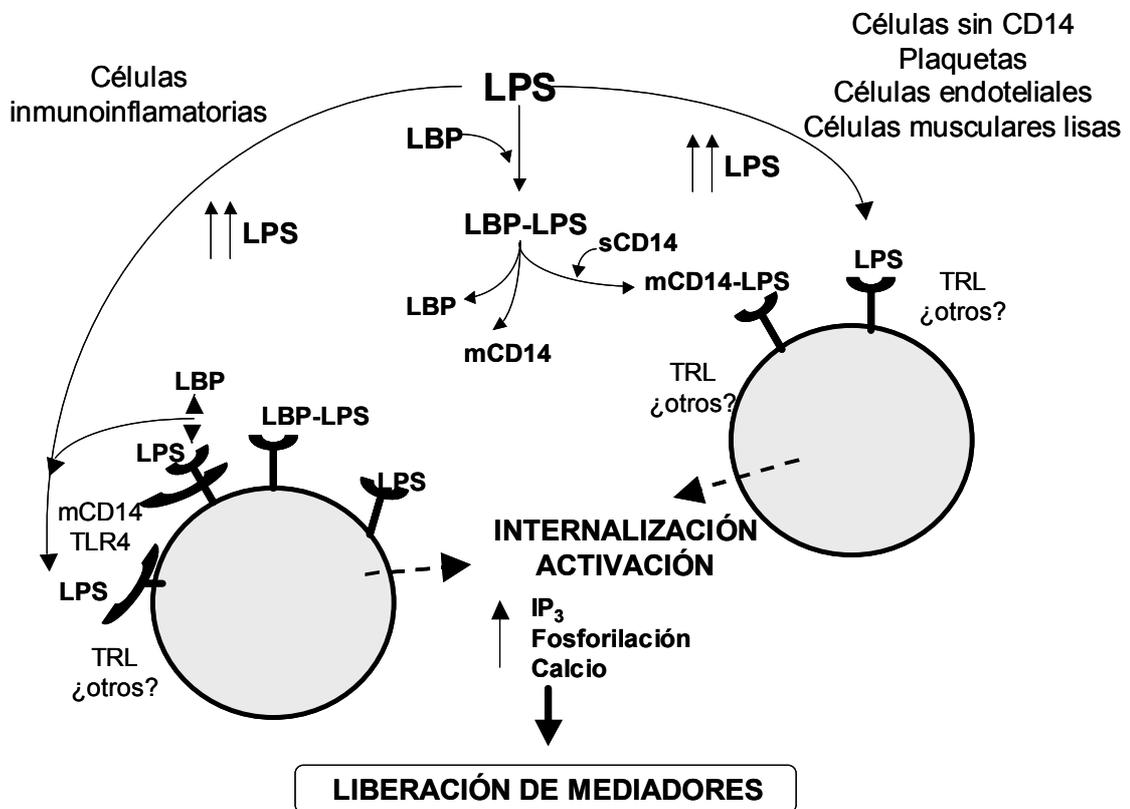


Fig.11 . Mecanismos de activación celular del LPS

11.3. Transducción de señal inducida por el LPS.

En los últimos años se han identificado en humanos y ratones una familia de proteínas denominadas receptores semejantes a Toll (Toll-like receptors o TLRs). Se trata de proteínas transmembrana con un dominio extracelular con repeticiones ricas en leucina (LRR) y un receptor citoplasmático Toll/IL-1 (TIR) con un dominio de gran semejanza estructural con el receptor de IL-1 (O'Neill y Greene, 1998; Anderson, 2000). Existen evidencias que sugieren que estos TLRs son las moléculas más importantes de reconocimiento de patógenos y que se utilizan diferencialmente en el inicio de las cascadas de señalización en respuesta a infecciones con diferentes clases de patógenos.

Una vez que el LPS estimula las células diana ocurren una serie de acontecimientos intracelulares. El más importante y mejor caracterizado es la activación del factor nuclear NF- κ B, que juega un papel central en la regulación de las respuestas inflamatorias e inmunes (Ghosh y col., 1998; May y Ghosh, 1998). El NF- κ B representa un grupo de proteínas relacionadas estructuralmente, incluidas la p65, p50, p52, RelB y c-Rel. En condiciones normales, el NF- κ B se encuentra secuestrado en el citosol como una forma inactivada homo o heterodimérica, con interacciones no covalentes con sus proteínas de inhibición, denominadas I κ Bs. Tras la estimulación con el agonista apropiado, el I κ B es fosforilado, ubiquitinizado y degradado. Así, el NF- κ B es liberado y se trasloca al núcleo iniciando fenómenos de expresión génica. Dentro de los genes diana del NF- κ B se incluyen aquellos que codifican para citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, proteínas de fase aguda,

péptidos antimicrobianos, la iNOS y la ciclooxigenasa 2 (COX-2). En conjunto, estos mediadores proporcionan protección inmediata al huésped e inducen el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa (Ghosh y col., 1998; May y Ghosh, 1998).

En los últimos años se ha producido una importante expansión de nuestro conocimiento sobre los mecanismos de señalización por los que el LPS induce la activación del NF κ B. De hecho, se han descubierto varios de los componentes moleculares implicados en este proceso (Fig. 12). El TLR4 es un receptor primario transmembrana de señalización para el LPS. Una vez unido al CD14, el LPS debe transferirse al TLR4, resultando en la homodimerización del TLR4 y en un cambio conformacional de su dominio citoplasmático. Posteriormente, se recluta sobre el receptor una proteína adaptadora llamada MyD88, lo cual va seguido de la interacción con la quinasa asociada al IL-1R (IRAK)-1, -2 o -M. La IRAK se disocia del complejo del receptor y recluta al factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6), que finalmente resulta en el ensamblaje y activación del complejo IKK α / β / γ y la posterior fosforilación y degradación del I κ B y la traslocación al núcleo del NF κ B.

El mecanismo por el cual el TRAF6 activa a las IKKs no se conoce bien, aunque hay evidencias que muestran que el TRAF6 podría interactuar con moléculas adicionales que ayudarían a activar a proteínas kinasas en cascada, lo cual llevaría a la fosforilación y activación de las IKKs. Se han identificado tres proteínas TRAF6, denominadas intermediario evolutivo conservado de señales en la vía Toll (ECSIT), proteínas de unión a TAK-1 (quinasa activada por

el factor de crecimiento transformante β -2 (TAB2) y proteína de unión al TRAF6 (T6BP) (Zhang y Ghosh, 2000).

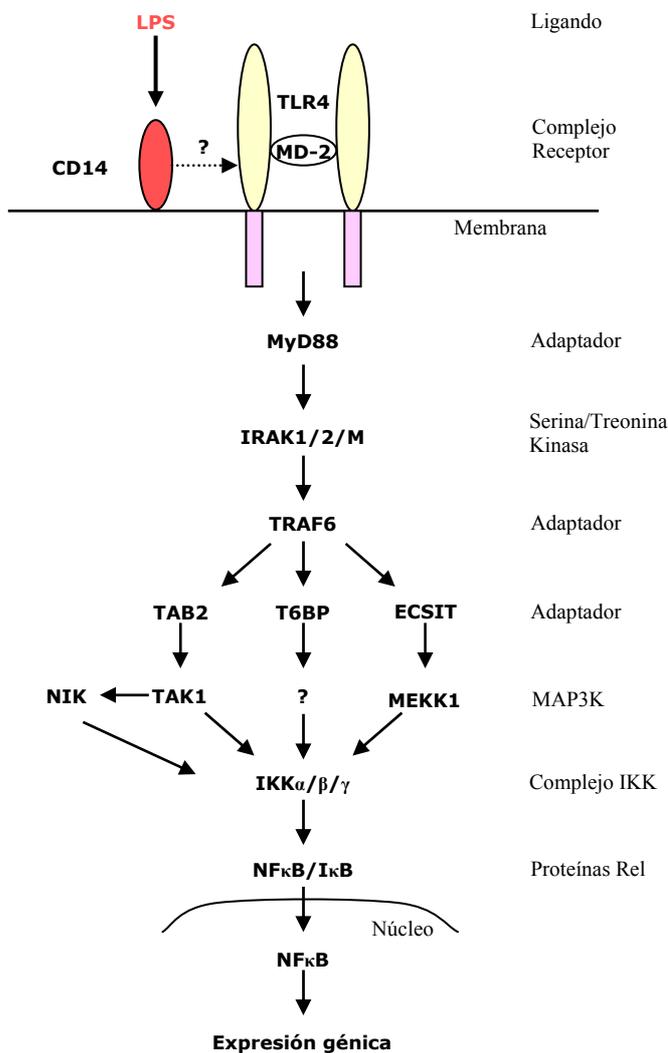


Fig. 12. Vías de señalización inducidas por el LPS que acaban en la activación del NF κ B. Tras la unión del LPS al CD14, éste puede ser transferido al complejo receptor TLR4-MD-2 en la membrana celular o bien activar una cascada de proteasas que generan un ligando para el TLR4. Consecuentemente, el TLR4 puede dimerizarse, lo cual resultaría en un reclutamiento en cascada de moléculas y por último en la activación del NF κ B, así como en la transcripción de varios genes implicados en la respuesta inmune e inflamatoria. Por otro lado, el TLR2 es el responsable de mediar la señal inducida por otros productos microbianos y, al igual que en la cascada del LPS, se usan idénticos intermediarios de señalización para activar al NF κ B. Las vías de señalización independientes de MyD88 también existen en la activación del NF κ B inducida por el LPS; sin embargo, las identidades moleculares de estos mediadores aún no han sido determinadas. Adaptado de Zhang G. y Ghosh S. Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J Endotoxin Res.* 2000;6(6):453-7.

Existen otras vías de transducción de señales del LPS. En diversos estudios *in vitro* con monocitos y fibroblastos se han implicado proteínas G y pequeñas proteínas G que pueden participar en la activación de tirosinquinasas (TK) (Tanke y col., 1991; Mayeux, 1997), la fosfolipasa C (PLC) y A₂ (PLA₂) (Chang y col., 1990; Fleming y col., 1996), así como la calmodulina (Nakano y col., 1993; Mattson y col., 1996). También se ha atribuido el papel de segundo mensajero a la esfingomielasa (SM), que hidrolizaría la esfingomielina en ceramida, la cual activaría diferentes proteínfosfatasas (PPT) y proteínquinasas (PK), como la PK activada por ceramida (Joseph y col., 1994), que podrían intervenir en la señal del LPS activando o inhibiendo diversas enzimas como la PK C, las fosfolipasas PLC y PLA₂, y la COX-2 (Hayakawa y col., 1996; Liu y col., 1999).

Otra vía es la formada por las PK, en la cual están implicados varios grupos: las serina-treonina PK A y C (Shapira y col., 1994; Kozak y col., 1997) y un gran conjunto de TK (Ruetten y Thiemermann, 1997). El conjunto de las TK activadas por mitógenos, MAP kinasas (MAPK), también participan en gran medida en las señales intracelulares del LPS. Esta gran familia consta de PK que fosforilan restos de serina-treonina y tirosina-treonina. Según diferentes estudios *in vitro* realizados en macrófagos, otros leucocitos, células endoteliales, células musculares lisas y otros tipos celulares (Arditi y col., 1995; Downey y Han, 1998; Baydoun y col., 1999), existen al menos cuatro subgrupos de MAPK, de los cuales se ha descrito que tres están relacionados con las respuestas inducidas por el LPS. Una de ellas está formada por las kinasas reguladas por señales extracelulares (ERK). Las otras vías

relacionadas con las MAPK incluyen el conjunto de proteínas que forman la subfamilia de PK del factor de transcripción c-jun, llamadas JNK.

Las kinasas p38 también juegan un papel crucial en la regulación de la respuesta con citocinas tras la estimulación con el LPS. De hecho, se sabe que un inhibidor específico de estas kinasas, el SB203580, previene completamente la liberación de citocinas tras la estimulación de los monocitos con el LPS (Lee y col., 1994).

11.4. El LPS como modelo de la enfermedad de Parkinson.

Los procesos inflamatorios, incluida la activación microglial, parecen ser importantes en el desarrollo y progresión de varias enfermedades neuronales degenerativas, entre ellas la EP (McGeer y col., 1988a, b; Akiyama y McGeer, 1989). La cinética de la reacción inflamatoria que sigue a la infusión intracerebral del LPS ya se ha descrito en el SNC de ratones (Anderson y col., 1992) y rata (Bourdiol y col., 1991; Montero-Menei y col., 1994, 1996; Szczepanik y col., 1996). De igual manera, estudios previos de nuestro grupo de investigación trataron de determinar si la activación glial inducida por una única inyección de LPS en la SN podría tener algún efecto sobre la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas *in vivo* y si este efecto era selectivo de este tipo de neuronas. El modelo que describieron permitiría determinar en qué medida está implicada la activación glial en la progresiva degeneración nigral característica de la EP y también en qué medida los factores derivados de la glía, como las citocinas o la privación de factores neurotróficos,

clásicamente asociados con una importante muerte neuronal *in vivo*, están implicados en la degeneración dopaminérgica.

La inyección de 2 µg de LPS en la SN de la rata produjo una serie de eventos en esta estructura cerebral (Castaño y col., 1998). Cuatro días después de la inyección de LPS hubo una degeneración del sistema dopaminérgico puesta de manifiesto por el descenso significativo de los niveles de DA tanto en la SN como en el estriado. Mientras que los niveles de DA decrecieron, las relaciones HVA/DA y DOPAC/DA se incrementaron en todos los tiempos en la SN y el estriado, lo que indicaría que el daño dopaminérgico inducido por la inyección de LPS incrementa la transmisión sináptica de DA. El descenso en los niveles de DA también está en consonancia con el descenso en la actividad de la TH (la enzima inicial y limitante de la biosíntesis de catecolaminas), sobre todo en el estriado. Este daño sobre las neuronas dopaminérgicas también se puso de manifiesto por la pérdida de neuronas TH-positivas en la SN.

La neurodegeneración encontrada está de acuerdo con estudios previos con LPS. Andersson y col., (1992) describieron la pérdida de células piramidales de la capa CA1 del hipocampo de ratones tras una infusión intrahipocámpal aguda de 2 µg de LPS. Además, se ha descrito una leve pero significativa pérdida de receptores neuronales NMDA tras una única inyección de LPS en el estriado (Bourdiol y col., 1991).

La eficacia del LPS como activador inmune en el SNC se mostró por el cambio en la morfología de la microglía y el incremento del número de células OX-42 positivas (Fig. 13). Dos días tras la inyección de LPS, las células

microglíales ya muestran una morfología activada en la SN dañada. Este resultado está de acuerdo con estudios previos que muestran que el LPS es un potente estimulante de la microglía (Andersson y col., 1992b; Lee y col., 1993; Montero-Menei y col., 1994, 1996).

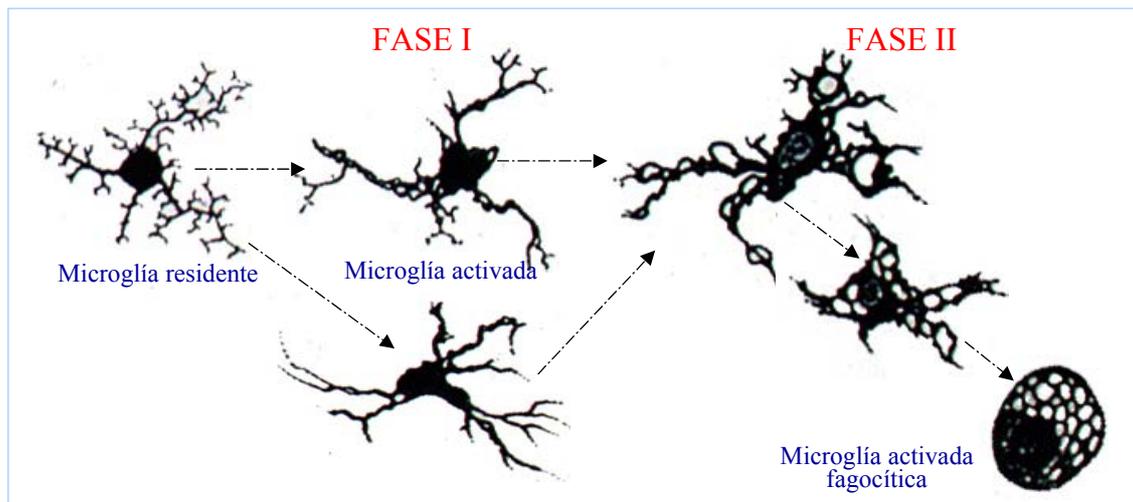


Fig.13. Representación esquemática de los cambios de morfología que sufre la microglía tras la inyección de LPS en la SN de la rata. Tras la inyección con LPS la microglía residente se transforma en microglía activada, caracterizada por procesos más gruesos y escasos hasta acabar tomando la morfología redondeada típica de la microglía fagocítica.

La reacción inflamatoria inducida por la inyección de LPS parece afectar de distinta manera a los diferentes tipos neuronales. Estudios *in vitro* han mostrado que las neuronas dopaminérgicas son dos veces más sensibles a los efectos tóxicos del LPS que las neuronas TH-negativas (Bronstein y col., 1995). Nuestro grupo mostró en estudios previos que las neuronas dopaminérgicas son sensibles al LPS sólo cuando éste se ha inyectado en la SN. Los distintos parámetros bioquímicos e inmunocitoquímicos estudiados mostraron que la

inyección de LPS en el HPM o en el estriado no afectan al sistema dopaminérgico, excepto por un incremento en los niveles de DA y DOPAC en el estriado a los 15 días tras la inyección de LPS en esta estructura, lo que podría deberse a un incremento en la producción de factores de crecimiento en respuesta al LPS.

Esta diferente reacción inflamatoria entre la SN y el estriado también fue patente en las características de desaparición de los astrocitos en el lugar de la inyección del LPS, de manera que cuando el LPS fue inyectado en el estriado, el área carente de astrocitos fue muy estrecha y localizada alrededor del tracto de inyección, y no se observaron fuertes agrupaciones de macrófagos.

La pérdida de astrocitos ya se había descrito tras distintos daños en el SNC, como con la inyección de excitotoxinas (Björklund y col., 1986; Ross y Ebner, 1990; Dusart y col., 1991; Fernaud-Espinosa y col., 1993; Jørgensen y col., 1993), ataque (Eriksdotter-Nilson y col., 1987) y con la inyección de 6-OHDA en el HPM (Strömberg y col., 1986). Sin embargo, algunos autores no han observado pérdida de astrocitos cuando se inyectaron neurotoxinas en el estriado (Björklund y col., 1986; Isacson y col., 1987). La desaparición de los astrocitos puede deberse a la apertura de la BHE junto con una reacción masiva de microglía y macrófagos y reclutamiento de leucocitos. La hinchazón de los astrocitos con desorganización del citoesqueleto se ha descrito en áreas de pérdida de BHE, pero no es posible concluir si la hinchazón de los astrocitos es la causa o la consecuencia de la apertura de la BHE (Kimmelberg y Ransom, 1986). Tras la apertura de la BHE, como en el caso de la muerte neuronal, el incremento masivo en componentes séricos, como el glutamato, pueden inducir

la hinchazón de los astrocitos (Kimelberg y Ransom, 1986). Sin embargo, también tenemos que tener en cuenta que en estudios *in vitro*, el LPS altera la función astrocítica y su estructura a través de la liberación de citokinas proinflamatorias (Hu y col., 1994).

Al contrario que su efecto sobre el sistema dopaminérgico, el LPS no afectó otros tipos neuronales estudiados. Estos estudios mostraron que el LPS no indujo daño sobre las neuronas GABAérgicas tras la inyección de LPS en la SN o en el estriado. Por su parte el sistema serotoninérgico mostró un daño transitorio (Herrera y col., 2000); los niveles de serotonina descendieron desde el día 4 en adelante pero volvieron a sus valores normales al día 15 en el estriado y al 21 en la SN, mientras que los niveles de DA no se recuperaron durante todo el intervalo estudiado. El incremento en los niveles del ácido 5-hidroxiindolacético en el día 2 podría indicar un aumento de la neurotransmisión de serotonina. Las alteraciones en los niveles del ácido 5-hidroxiindolacético desaparecieron desde el día 15 en adelante, reforzando la idea de que el tratamiento con LPS fundamentalmente afecta al sistema dopaminérgico. Igualmente, la inyección de LPS en el rafe dorsal no produjo cambio alguno en la inmunotinción de las células serotoninérgicas.

Así, parece que el proceso neuronal inducido por el LPS, al menos en las áreas estudiadas, es específico de las neuronas dopaminérgicas y se dispara en el cuerpo neuronal de la SN. La degeneración debe ser producida por la inflamación inducida por el LPS.

Además, los anteriores trabajos de nuestro grupo no sólo muestran que el daño inducido por el LPS es específico para las neuronas de DA sino

también que este daño no se revierte durante el período de tiempo estudiado (1 año). Las medidas de la concentración de DA, la actividad de la TH y los análisis inmunohistoquímicos 1 año después de una única inyección de LPS en la SN, revelaron la pérdida de marcadores de DA en torno al 50-60%. Aunque hay algunas variaciones en los resultados con HPLC, el estudio de los distintos índices de recambio parecen indicar que no hay cambios significativos en el recambio de la DA tras la inyección de LPS, indicando un posible mecanismo compensatorio más que una recuperación celular como motivo de estos cambios. Por todo ello, se puede asumir que el daño inducido por el LPS en el sistema dopaminérgico es permanente.

En conclusión, estos estudios demostraron que una única inyección de LPS produce una fuerte respuesta inflamatoria en la SN lo que lleva al daño de las neuronas de DA sin afectar a otros tipos neuronales. Esta neurodegeneración se dispara en el cuerpo neuronal, lo que está de acuerdo con Patt y col.(1991) que sugieren que en la EP la lesión se inicia en la SN. El daño es permanente, al menos en el período de tiempo estudiado (1 año) y se acompaña por el daño en las terminales dopaminérgicas en el estriado.

Todos estos resultados muestran las diferencias entre los efectos neurotóxicos sobre las neuronas dopaminérgicas inducidos por el LPS y la 6-OHDA o el MPP⁺; así, la 6-OHDA o el MPP⁺ son inductores más potentes de neurodegeneración cuando se inyectan en estas estructuras, debido a la alta actividad del transportador de DA en estas áreas (Jones y col., 1995; Santiago y col., 1995), matando las neuronas directamente, a través de la producción de RLO o por la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial respectivamente

(Youdim y Riederer, 1993; Gerlach y Riederer, 1996), mientras que el LPS actúa indirectamente, a través de la activación microglial y la liberación de productos neurotóxicos (Banati y col., 1993; Giulian, 1993a, b).

El daño originado por el LPS sobre las neuronas dopaminérgicas puede ser debido a neurotoxinas secretadas por la microglía como el NO (Piani y col., 1991; Banati y col., 1993; Giulian y col., 1993a, b; Lees, 1993). En el SNC se ha identificado la activación de la isoforma de la iNOS de tipo II en astrocitos y microglía en respuesta al LPS o la interleukina-1 β (Murphy y col., 1993). Esta activación podría conducir a una liberación sustancial de NO, que es citotóxico tanto para las células del huésped como para las de los agentes infecciosos. Para examinar el posible efecto del NO sobre la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SN producida por el LPS, se inhibió la NOS a través de la administración sistémica de L-NOARG (N^o-nitro-L-arginina), un inhibidor de la NOS. Bajo estas condiciones se encontró que el L-NOARG no revirtió la disminución en los niveles de DA ni la actividad de la TH inducidas por el LPS. Estos resultados, sin embargo, no están de acuerdo con los aportados por Bronstein y col. (1995) donde, en cultivos celulares, los autores encontraron que el tratamiento de las células con un inhibidor de la NOS prevenía los efectos neurotóxicos del LPS sobre las células TH-positivas. Esta discrepancia puede deberse a que este estudio fue realizado *in vivo*. Sin embargo, dichos resultados estaban de acuerdo con los descritos previamente por nuestro grupo (Santiago y col., 1994), donde la inhibición de la producción del NO no protegió al sistema dopaminérgico contra el daño producido por el MPP⁺, y con trabajos previos de Sawada y col.(1996), que encontraron que los agentes generadores

de NO mostraron unos efectos neurotóxicos restringidos exclusivamente a las neuronas no dopaminérgicas (Sawada y col., 1996). Todos estos datos parecían sugerir que en nuestro modelo la neurotoxicidad dopaminérgica no estaba mediada por el NO.

Las enfermedades cerebrales que progresan lentamente y que están asociadas a un foco de inflamación podrían relentizarse o incluso curarse a través de medidas antiinflamatorias. Al mismo tiempo, la inflamación es una diana farmacológica atractiva, ya que progresa a lo largo de varios días tras el daño. Además, la intervención con agentes antiinflamatorios no produciría efectos secundarios intolerables (Barone y Feuerstein, 1999). Las células diana de este tipo de tratamientos son las células microgliales, el centro y fuente de moléculas que apoyan e inhiben la inflamación.

La terapia con glucocorticoides se ha usado mucho en neurología clínica para el tratamiento de inflamaciones cerebrales (Anderson y Cranford, 1979; Norris y Hachinski, 1986) y daños en la médula espinal (Bracken y col., 1990). Estudios previos mostraron *in vivo* que la degeneración dopaminérgica inducida por una única inyección de 2 ug de LPS puede prevenirse con dexametasona (Castaño y col., 2002), un antiinflamatorio glucocorticoide muy usado y con marcados efectos en la cascada proinflamatoria. El tratamiento de los animales con LPS y dexametasona podría poner de manifiesto las implicaciones de la inflamación en los procesos degenerativos dopaminérgicos.

Estos estudios mostraron que la fuerte activación microglial encontrada tras la inyección con LPS se previene a través del tratamiento con dexametasona. El LPS no sólo produjo un aumento en la proliferación de la

microglía sino que también aumentó la expresión del CMH clase II. La microglía residente no expresa de manera constitutiva el CMH II. Sin embargo, su expresión aumenta rápidamente tras distintos tipos de daño en el SNC (Akiyama y col., 1988), isquemia (Gehmarnn y col., 1992), degeneración Walleriana (Rao y Lund, 1993) y encefalomiелitis alérgica experimental (Vass y col., 1986). La expresión del CMH II en la microglía se considera no sólo un marcador de la activación microglial sino que también se suele interpretar como una evidencia de la capacidad de presentación de antígenos. En estos estudios nuestro grupo mostró que la dexametasona no sólo inhibía el número de células OX-42 positivas (42.5% del grupo con LPS) sino también el número de microglía/macrófagos que expresan el CMH II (63.8% del grupo con LPS). Estas observaciones están de acuerdo con trabajos previos que describen que los glucocorticoides disminuyen la expresión del CMH II (Kiefer y Kreutzberg, 1991; Loughlin y col., 1992). Sin embargo, la dexametasona no fue capaz de prevenir la pérdida de astrocitos.

La dexametasona también previno la pérdida del contenido de catecolaminas, de la actividad de la TH y de la inmunotinción de TH. Tras una inyección subcutánea diaria de dexametasona (a lo largo de 15 días), la DA y sus metabolitos recuperaron valores normales. Así pues, en la SN, el grupo tratado con LPS mostró niveles de alrededor del 65% del grupo control para la DA y la 3-metoxitiramina y del 79% para el DOPAC, mientras que en el grupo tratado con LPS/dexametasona los niveles de DA y sus metabolitos volvieron al 86-100% de los valores del grupo control tratado sólo con dexametasona. En el estriado, se encontró una protección similar en los niveles de monoaminas y en

la actividad de la TH, la cual se incrementó desde el 53.4% del control en el grupo con LPS hasta el 91.7% del grupo con dexametasona en el grupo tratado con LPS/dexametasona). La protección observada con la dexametasona podría deberse a una inhibición de los eventos citotóxicos mediados por la microglía. Se sabe que la supervivencia neuronal se incrementa en numerosos sistemas cuando se reduce la activación microglial (Thanos y col., 1993; Moore y Thanos, 1996; Rogove y Tsirka, 1998). Como ya se ha mencionado, los glucocorticoides son potentes antiinflamatorios que interfieren con muchos de los procesos característicos de la activación microglial. Así, la dexametasona inhibe la producción de TNF- α inducida por el LPS (Han y col., 1990) y de IL-1 β (Kern y col., 1988; Kimberlin y col., 1995) e impide la liberación de IL-6 estimulada por el LPS en los astrocitos (Grimaldi y col., 1998).

Ya hemos mencionado que la activación de la microglía puede ejercer efectos perjudiciales a través de la liberación de moléculas inflamatorias (como la IL-1 β , el TNF- α y NO), y que la activación de las células gliales del cerebro con el LPS estimula la liberación de NO y de varias citokinas, fundamentalmente TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Jeohn y col., 1998). Sin embargo, hemos mostrado que el LPS puede causar la desaparición de inmunorreactividad de neuronas TH en la SN independientemente del NO (Castaño y col., 1998). También se sabe que el TNF- α se detecta en cerebros de pacientes con EP. Teniendo en cuenta estas consideraciones nuestro grupo trató de profundizar en los componentes inflamatorios responsables del daño catecolaminérgico inducido por el LPS. Para ello, se inyectaron TNF- α , IL-1 β e IFN- γ a diferentes dosis para comparar sus efectos con aquellos descritos para

el LPS. Con ello se esperaba mimetizar la neurodegeneración inducida por el LPS a través de la inyección de estas citokinas. Curiosamente, no llegaron a mimetizar el daño inducido por el LPS y ninguno de los marcadores dopaminérgicos estudiados sufrió un descenso significativo. La activación de las células microgliales quedó confinada cerca del tracto de inyección e incluso la población astrocítica, que no se protegió con la dexametasona del daño producido por el LPS, pareció similar a la encontrada en animales controles tras la inyección de citokinas.

Teniendo en cuenta estos resultados y los demás datos obtenidos de la literatura sobre la actuación del LPS en la producción de citokinas, no se puede descartar que el daño inducido por el LPS en el sistema nigroestriatal dopaminérgico pueda ser debido, al menos en parte, a una cascada de eventos independiente de la descrita para el TNF- α /IL-1 β o IFN- γ .

En conclusión, estos resultados mostraron cómo la neurodegeneración dopaminérgica nigroestriatal relacionada con la inflamación puede ser prevenida por la dexametasona. Por eso, estos resultados podrían tener implicaciones en el tratamiento de enfermedades neurológicas, incluida la EP.

En este mismo contexto la minociclina está emergiendo como una prometedora molécula neuroprotectora debido a sus propiedades antiinflamatorias, lo que ha sido probado con éxito bajo distintas condiciones de neurodegeneración. Esto incluye la isquemia cerebral global (Yrjanheikki y col., 1998), la isquemia cerebral focal (Yrjanheikki y col., 1999), el daño cerebral neonatal hipóxico/isquémico (Arvin y col., 2002), la excitotoxicidad (Tikka y col.,

2001), la esclerosis múltiple (Popovic y col., 2002), enfermedad de Huntington (Chen y col., 2000) y la esclerosis lateral amioatrófica (Zhu y col., 2002).

Estudios previos de nuestro grupo, usando una inyección intranigral de LPS *in vivo*, demostraron que el tratamiento crónico con minociclina protege las neuronas dopaminérgicas del daño inducido por el LPS de forma efectiva (Tomás-Camardiel y col.,2004). Este efecto protector se hizo extensivo a la población astrocítica. Además, el tratamiento con minociclina fue muy efectivo previniendo el incremento a largo plazo de la inmunoreactividad de 3-nitrotirosina (3-NT) y la rotura de la BHE inducidas por el LPS en la SN. Por último, el tratamiento con minociclina previno la activación de la microglía y la expresión de determinadas citocinas, como la IL-1 α y el TNF- α , tras una única inyección intranigral de LPS.

Estos resultados pueden ayudar a clarificar los mecanismos por los que el LPS induce la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SN. En este contexto, la iNOS está surgiendo como una actividad enzimática potente y dañina relacionada con la muerte celular (para revisión ver Czlonkowska y col., 2002). El estudio espaciotemporal detallado de los patrones de inducción de citocinas y moléculas proinflamatorias relacionadas en respuesta a una única inyección intraestriatal de LPS ha demostrado que desde los 2 días, la actividad de los transcritos disminuye, y a los 3 días, está sustancialmente disminuida o incluso ausente, de manera que las inducciones más notables tienen lugar dentro de las 16 primeras horas (Stern y col., 2000). Un curso temporal similar de cambios de la proteína iNOS se ha encontrado en la SN en respuesta a una única inyección de LPS (Arimoto y Bing, 2003). Sin embargo,

los análisis moleculares a corto plazo (6 horas) a través de RT-PCR no fueron capaces de demostrar el efecto positivo de la minociclina previniendo el incremento en el ARNm de la iNOS y la IL-1 β inducido por el LPS, pero sí el de la IL-1 α y el TNF. Los patrones rápidos y cambiantes inducidos por el LPS en los ARNm de iNOS e IL-1 β pueden haberlos llevado a subestimar el efecto a corto plazo de la minociclina sobre ambos marcadores al tiempo postlesión examinado de 6 horas. De hecho, la inducción del ARNm de iNOS está retrasado en comparación con lo observado para otras citocinas como el TNF- α en respuesta al LPS (Stern y col., 2000). Es interesante el hecho de que aunque las diferencias no son significativas, los valores medios de ambos marcadores son un 30% menores en los animales tratados con minociclina que en los encontrados en animales tratados con LPS.

Por todo ello nuestro grupo investigó el patrón a largo plazo de la inmunorreactividad de la 3-NT en la SN bajo dichas condiciones experimentales. El NO, el producto último de la NOS, parece que contribuye al nivel de estrés oxidativo que acompaña a los cerebros parkinsonianos (Beal, 1998). El NO reacciona con el superóxido generando peroxinitrito, el cual parece que media la acción tóxica de estas especies (Torreilles y col., 1999). El peroxinitrito reacciona de formas complejas con diferentes biomoléculas; entre otros, los peroxinitritos nitrosilan a los residuos de tirosina dando lugar a la 3-NT (Torreilles y col., 1999). Curiosamente, tras la inyección de LPS se produce una marcada inmunorreactividad frente a la 3-NT en la SN y además, el tratamiento con minociclina reduce el patrón de inmunorreactividad de la 3-NT inducido por el LPS. Todos estos datos sugieren un papel crítico de los

peroxinitritos en la neuropatología asociada al LPS en la SN. Esta idea está corroborada por el hecho de que los peroxinitritos son tóxicos para las neuronas dopaminérgicas en cultivos celulares (Liu y col., 2000a). Además, Du y col. (2001) demostraron que la minociclina bloquea la activación de la iNOS y la producción de NO, y produce una protección significativa del sistema dopaminérgico nigroestriatal frente al daño inducido por el MPP⁺. Consecuentemente, estos resultados mostraron en este caso que el NO sí que parece ser un importante mediador de la muerte celular dopaminérgica, y lo que es más importante, la minociclina fue muy efectiva protegiendo al sistema dopaminérgico.

La cuestión que surge trata del mecanismo más plausible por el que la minociclina inhibe el potencial efecto dañino del peroxinitrito y la formación de 3-NT. La formación de 3-NT parece necesitar de la producción de NO y superóxido (Torreilles y col., 1999). En nuestro modelo de neurodegeneración parece que la iNOS y la NADPH-oxidasa microgliales juegan un papel crítico. Por eso, la inhibición farmacológica de ambas enzimas ha demostrado conferir protección en el modelo del LPS (Gao y col., 2002; Iravani y col., 2002; Arimoto y Bing, 2003). Consecuentemente, la capacidad de la minociclina para inhibir significativamente la activación microglial proporciona una explicación plausible para la menor inmunorreactividad de la 3-NT encontrada en los animales tratados con LPS.

Aunque estos datos sugieren una implicación de los peroxinitritos en los eventos patológicos que suceden a la inyección con LPS, también se debería considerar la posibilidad de que ciertas citocinas participen en la cascada de

señalización que conduce a la muerte dopaminérgica y la pérdida significativa de astrocitos. Puesto que la producción de NO y el daño oxidativo relacionado con él también se asocian a la disrupción de la BHE (Shukla y col., 1995; Calingasan y col., 1998), se quiso saber la extensión de la rotura de la BHE tras la inyección de LPS, la posible correlación espacial entre la rotura de la BHE y la muerte de las neuronas dopaminérgicas y/o los astrocitos reactivos, y la capacidad de la minociclina para prevenir la rotura de la BHE inducida por el LPS. Así, se encontró que la rotura de la BHE fue muy extensa en respuesta a la inyección con LPS. Curiosamente, la minociclina protegió significativamente de la rotura de la BHE producida por el LPS. Además, se encontró una estrecha correlación entre la extensión de la rotura de la BHE y el área de pérdida de astrocitos. El tratamiento con minociclina fue capaz de prevenir la rotura de la BHE y la pérdida de astrocitos en respuesta al LPS en una extensión similar. Por ello, sugerimos que la rotura de la BHE puede estar detrás de la pérdida de los astrocitos. Si esta asunción es correcta, la minociclina, a través de la protección de la rotura de la BHE, podría preservar la integridad de la población astrocítica, lo que no está en desacuerdo con estudios previos que muestran que la minociclina no tiene efectos sobre los astrocitos (Yrjanheikki y col., 1998).

Estudios recientes sugieren que los astrocitos pueden ser severamente dañados y degenerar tras un daño en el SNC antes del desarrollo de gliosis reactiva. Este concepto es especialmente evidente en los estudios sobre traumatismo cerebral (Liu y col., 1999; Zhao y col., 2003). Existen varios estudios que tratan sobre cómo la inyección de LPS no es útil para estudiar la

población astrocítica (Kim y col., 2000; Liu y col., 2000b; Lu y col., 2000; Arimoto y Bing, 2003). Estos estudios demostraron que tras una única inyección de LPS, hay una aparente pérdida de astrocitos en el área que rodea al sitio de la lesión y astrogliosis en la periferia (Herrera y col., 2000; Castaño y col., 2002). En estos estudios, fue evidente que los astrocitos estaban ausentes del lugar de daño del LPS tanto en la SNc como en la SNr al menos durante la primera semana tras la inyección (Herrera y col., 2000). Desde el día 9 en adelante, hay una progresiva disminución del área carente de astrocitos desde el borde hasta el centro hasta estar completamente cubierta a los 6 meses (Herrera y col., 2000). El hecho de que el área carente de astrocitos esté rellena con células activadas OX-42 positivas con morfología de macrófago sugiere que los eventos degenerativos tienen lugar en las células astrogliales en respuesta al daño por el LPS. Todo ello sugiere que los astrocitos son particularmente vulnerables a la inflamación, lo que podría ser un factor crítico en los eventos degenerativos posteriores que tienen lugar en la SN considerando las importantes interacciones neurona-glía (Nedergaard y col., 2003; Ransom y col., 2003). El fallo temprano en la función astrocítica en respuesta al LPS puede comprometer el mantenimiento de la homeostasis en el microambiente extracelular, alterando las críticas interacciones neurona-glía y provocando el cese de la liberación de factores tróficos (Zhao y col., 2003). En este contexto, encontramos una correlación espacial precisa entre la rotura de la BHE y la inmunorreactividad de 3-NT, lo que conlleva que la formación de peroxinitrito está tras la disfunción endotelial que conduce a la rotura de la

BHE. La cuestión que surge es si la protección de la BHE inducida por la minociclina podría estar detrás de un mecanismo de protección celular.

Además, merecen especial atención diferentes serinproteasas, que se han encontrado en el cerebro en situaciones en las que la BHE estaba comprometida (para revisión ver Gingrich y Tarynelis, 2000). En este contexto, nuestro grupo ha encontrado recientemente que la trombina, la serinproteasa mejor conocida por su papel en la cascada de coagulación, es muy tóxica para las células dopaminérgicas nigrales y los astrocitos reactivos en la SN (Carreño-Müller y col., 2003). Por todo ello, estos datos sugieren que los mecanismos asociados a la degeneración en la SN en el cerebro adulto de la rata en respuesta al daño producido por el LPS no es sencilla. En estudios previos, hemos demostrado que los corticosteroides protegen de la muerte de las neuronas dopaminérgicas nigrales inducida por el LPS (Castaño y col., 2002). Curiosamente, los corticoesteroides, potentes agentes antiinflamatorios, son los más importantes en el tratamiento del edema tumoral cerebral ya que reducen la permeabilidad de la BHE (Papadopoulos y col., 2001; Ayata y Ropper, 2002). Por eso concluimos que la minociclina, una potente molécula antiinflamatoria, reduce la formación de citokinas y moléculas proinflamatorias relacionadas y la permeabilidad de la BHE reduciendo tanto la activación de la microglía como la formación de peroxinitritos por lo que minimiza la muerte celular. Si futuros estudios demuestran que la inflamación está implicada en la etiopatología de la EP, estos datos promoverían el uso potencial de la minociclina para retrasar el inicio de esta enfermedad.

Todos estos datos nos hacen considerar que el LPS puede proporcionar un interesante modelo para estudiar los efectos específicos de la inflamación en los procesos degenerativos del sistema dopaminérgico, los cuales podrían jugar un papel importante en la aparición de la EP.

OBJETIVOS

Nuestro grupo lleva años estudiando los mecanismos de degeneración del sistema dopaminérgico nigroestriado que podrían justificar o estar implicados en la aparición de la enfermedad de Parkinson. Entre las características comunes que se han descrito en las zonas afectadas, sustancia negra y estriado, nos pareció de gran interés el estudio de los marcadores que demuestran la existencia de inflamación. Esta inflamación podría ser un hecho secundario de la enfermedad. La muerte celular generalmente conlleva una importante inducción de la inflamación. Sin embargo también, podría ocurrir que la inflamación tuviera una acción directa sobre la neurodegeneración o que al menos pudiera participar en la progresión de la misma ya que se trata de un proceso crónico. Con el fin de estudiar estas posibilidades nuestro grupo desarrolló un modelo animal mediante la inducción del proceso inflamatorio en el SNC. La inducción de la inflamación se produjo por la inyección de lipopolisacárido, una de las sustancias proinflamatorias más conocidas y utilizadas en investigación. En este modelo se demostró que el LPS era capaz de inducir inflamación en el SNC, aunque no todas las estructuras eran igualmente sensibles a este compuesto. La más sensible fue la sustancia negra, estructura especialmente implicada en la enfermedad de Parkinson. Tampoco todos los sistemas neuronales se comportaron del mismo modo, siendo especialmente sensibles los cuerpos dopaminérgicos de la sustancia negra, que precisamente son los cuerpos que degeneran en la enfermedad de Parkinson. Este modelo demostró de una manera fehaciente que el proceso inflamatorio puede ser capaz por sí mismo de inducir la degeneración del sistema dopaminérgico de la sustancia negra, y que por lo tanto podría estar

implicado al menos en la progresión de su degeneración cuando el desencadenante de la degeneración fuera otra causa y conllevara, como se describe in vivo, la inducción de la inflamación.

En este proyecto, nos proponemos utilizar este modelo para buscar las causas que pudieran estar implicadas en la especial sensibilidad de los cuerpos neuronales dopaminérgicos al proceso de inflamación. Esta especial sensibilidad se desprende no sólo de que la sustancia negra sea la estructura más sensible, que en este caso se justifica por ser la estructura del SNC que presenta mayor concentración de microglía, lo que conllevaría una máxima activación de estas células y la gran producción de sustancias que participan en la inflamación tales como citocinas y radicales libres, con la consiguiente acción tóxica. Sin embargo, dentro de la sustancia negra los cuerpos neuronales dopaminérgicos son más sensibles que los de otros tipos neuronales.

Para este estudio, proponemos que una de las características más significativas del sistema dopaminérgico es la presencia de elevadas concentraciones de dopamina endógena. Se sabe que la dopamina, al menos en determinadas condiciones, se comporta como un compuesto tóxico productor de estrés oxidativo. Por ello vamos a estudiar la posible influencia de la dopamina en el proceso degenerativo inducido por la inyección intranigral de LPS.

Para ello, en primer lugar llevaremos a cabo el estudio del proceso degenerativo inducido por la inyección de LPS en condiciones de no producción de dopamina. Esta condición se producirá mediante la inhibición de

la enzima tirosina hidroxilasa, enzima limitante de la formación de DA, mediante el tratamiento con α -metilparatirosina (α -MPT), un inhibidor ampliamente conocido y utilizado de esta enzima.

Para analizar en mayor profundidad el posible papel de la DA, llevaremos a cabo otros experimentos en los que intentaremos restaurar los niveles de dopamina al mismo tiempo que mantenemos el tratamiento con α -MPT. Esto se puede conseguir mediante el uso del tratamiento típico utilizado en los enfermos de Parkinson, que consiste en la administración de L-DOPA/benserazida; esto produce la síntesis de DA soslayando la inhibición de la TH, ya que en este caso la DA es producida por la actuación de la enzima L-DOPA descarboxilasa directamente sobre la L-DOPA administrada de forma sistémica. En estas condiciones se deberían restaurar los efectos producidos con el tratamiento único de la inyección intranigral de LPS. Con ambos tipos de experimentos se puede poner de manifiesto de forma bastante inequívoca la implicación de la dopamina en el proceso neurodegenerativo.

En el caso de que la dopamina tenga una participación pasaremos a estudiar algunos de los posibles mecanismos por los que podría actuar. En este trabajo hemos seleccionado dos: por un lado se determinará la implicación de los receptores de dopamina, concretamente del receptor D2 a través del uso del sulpiride, un antagonista de este tipo de receptor; por otro lado se tratará de determinar la implicación de la liberación de glutamato y los mecanismos de excitotoxicidad, para lo cual usaremos un antagonista frente al glutamato, el ácido kinurénico.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES.

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con el «Guidelines of the European Union Council» (86/609/EU), siguiendo las regulaciones españolas (BOE 67/8509-12, 1998) para el uso de animales de laboratorio y aprobadas por el comité científico de la Universidad de Sevilla.

En todos los experimentos realizados se usaron ratas albinas macho de la raza Wistar de 3 meses de edad (200-250 g) criadas en nuestro laboratorio. Se mantuvieron 3 o 4 ratas por caja a temperatura ambiente constante (22 ± 2 °C) y una humedad relativa del 60%, con ciclos de luz-oscuridad de 12 h y acceso ilimitado a agua y comida (dieta de mantenimiento A.04 de Panlab S.L.).

2. OPERACIONES QUIRÚRGICAS.

Las operaciones intracerebrales se practicaron mediante trepanación del cráneo previa anestesia con hidrato de cloral (400 mg/Kg de peso; i.p.) y posicionando el animal en un estereotáxico (Kopf Instruments, Tujunga, CA, EE.UU). Las coordenadas para inyectar los tóxicos se tomaron siguiendo el atlas de cerebro de Paxinos y Watson (1986). Todas las inyecciones se realizaron en la sustancia negra izquierda a través de una jeringa Hamilton posicionada a 5,5 mm caudal, 1,8 mm lateral y 8,3 mm ventral con respecto al punto Bregma. El flujo de inyección fue de 0,5 µl/min y el volumen total inyectado de 2 µl. Después de cada inyección se esperaron 5 minutos para evitar el reflujo a lo largo del tracto de inyección.

3. TRATAMIENTOS.

Para todos los grupos de tratamientos se usaron al menos 5 ratas por grupo excepto el grupo de α -MPT a 33 °C en el que sólo se usaron 3 animales dada la alta mortalidad de este tratamiento. El resumen de los distintos tipos de tratamientos se esquematiza en la figura 14.

3.1. Controles.

El grupo control recibió una única inyección intranigral de 2 μ L de vehículo (Monastral Blue al 1% en tampón fosfato salino, utilizado como trazador inerte para localizar el sitio de la inyección). Los animales se sacrificaron una semana después de la cirugía.

3.2. Tratamiento con LPS.

El grupo tratado con LPS recibió una única inyección intranigral de 2 μ g de LPS en 2 μ L de vehículo. Una semana más tarde fueron sacrificados y los cerebros procesados para posteriores análisis.

3.3. Tratamiento con α -MPT.

Los animales tratados con α -MPT se dividieron en 5 grupos. En todos los casos el tratamiento con α -MPT se hizo intraperitonealmente con la droga en suspensión en NaCl al 0,9%. Los animales recibieron 2 dosis al día durante los 4 primeros días del experimento inyectándose la primera dosis justo antes de la inyección de LPS en la sustancia negra. (a) Un grupo recibió una única inyección de 2 μ g de LPS en 2 μ L de vehículo en la sustancia negra y 2 dosis

diarias de 100 mg/Kg de peso de α -MPT. (b) El segundo grupo se inyectó con la misma cantidad de LPS en la SN y se trató con una dosis de 150 mg/Kg de peso de α -MPT. (c) Un tercer grupo recibió una única inyección de LPS (2 μ g en 2 μ L de vehículo) en la SN y una dosis de α -MPT de 200 mg/Kg de peso. (d) El cuarto grupo se trató con LPS (2 μ g en 2 μ L de vehículo) en la SN y una dosis de 200 mg/Kg de peso pero los animales se mantuvieron en un ambiente cálido (33 °C) en un esfuerzo por mantener su temperatura corporal en valores normales. (e) Por último, un quinto grupo se trató con dosis de α -MPT de 200 mg/Kg de peso pero no recibieron inyección alguna de LPS en SN. Todos los animales fueron sacrificados una semana después de la cirugía.

3.4. Tratamiento con L-DOPA/benserazida.

El grupo tratado con L-DOPA/benserazida recibió una única inyección de 2 μ g de LPS en 2 μ L de vehículo en la SN. 40 minutos antes de la inyección con LPS los animales se inyectaron intraperitonealmente con benserazida (10 mg/Kg de peso). Al tiempo de la inyección con LPS los animales recibieron sendas inyecciones con α -MPT (200 mg/Kg; i.p.) y L-DOPA (25 mg/Kg; i.p.). Desde este momento, los animales recibieron 2 dosis diarias de α -MPT + L-DOPA 40 minutos después de las inyecciones con benserazida. Este tratamiento se mantuvo durante 4 días. Todos los animales se sacrificaron una semana después de la cirugía.

3.5. Tratamiento con sulpiride.

El grupo de animales tratados con sulpiride recibieron una única inyección de 2 µg de LPS en 2 µL de vehículo en la SN. Desde el momento de la inyección los animales se trataron con 2 dosis diarias de sulpiride (80 mg/Kg de peso; s.c.) disuelto en PBS al 1% en ácido. Este tratamiento se mantuvo durante 3 días. Los animales se sacrificaron una semana después de la cirugía.

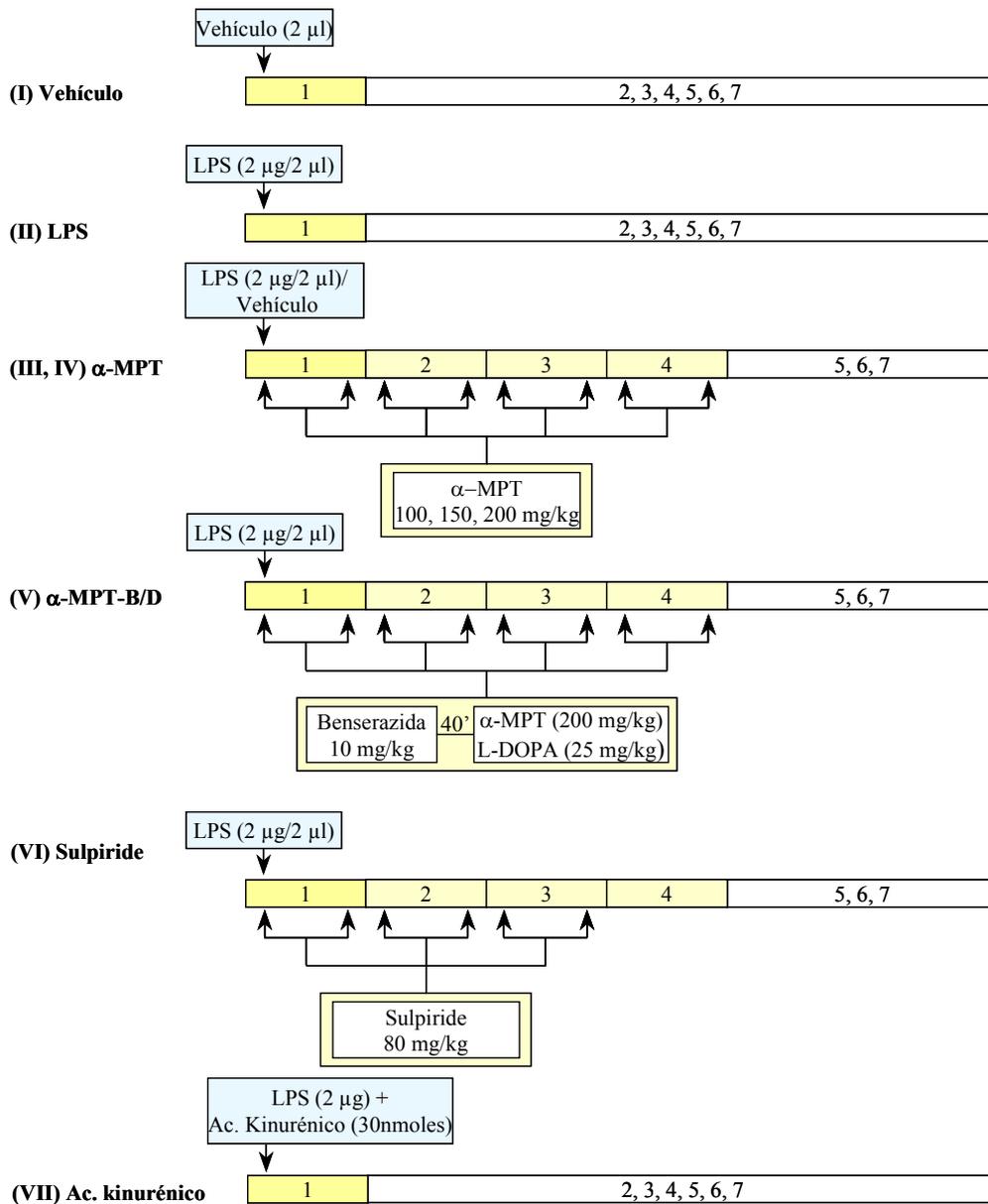


Fig.14. Representación esquemática de los tratamientos administrados. Todos los tratamientos comienzan el día 1 con una inyección de LPS o vehículo en la SN. Los grupos III-VI además recibieron tratamientos sistémicos (i.p.) durante 3 o 4 días. Las ratas se mantuvieron a temperatura constante (22 °C) excepto el grupo tratado con α-MPT a 33 °C y se sacrificaron 1 semana después de la inyección de LPS

3.6. Tratamiento con ácido kinurénico.

El grupo de animales tratados con ácido kinurénico recibieron una única inyección de una mezcla que contenía 2 µg de LPS y 30 nmoles de ácido kinurénico en 2 µL de vehículo (Monastral Blue al 1% en PBS). Una semana más tarde todos los animales se sacrificaron.

4. MEDIDA DE LA TEMPERATURA CORPORAL.

Para la medida de las temperaturas corporales (rectales) de los animales se usó un termómetro Seikuve SB-80 digital. Se tomaron medidas de temperaturas rectales de todos los grupos de animales tratados con α-MPT y también de animales controles tratados con LPS y con vehículo. Las medidas se realizaron cada 2 horas después del inicio del tratamiento durante 8 horas al día y se mantuvieron a lo largo de toda la semana que duraron los tratamientos. La primera lectura de cada tratamiento coincidió con el momento de la inyección intranigral de vehículo o LPS en el día 1. Las medidas se promediaron para conseguir un único valor por animal y día y se expresaron como medias ± desviación estándar (DE) de al menos 5 animales por cada tratamiento, excepto para el grupo tratado con 200 mg/kg de α-MPT y mantenidos a 33 °C, donde sólo se usaron 3 animales debido a la alta mortalidad observada en este tratamiento.

5. PERFUSIÓN DE LOS ANIMALES.

Para las técnicas de inmunocitoquímica, los animales fueron perfundidos bajo profunda anestesia con hidrato de cloral (400 mg/Kg; i.p.) con una solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato, pH 7,4. Los cerebros se separaron y se crioprotegieron sumergiéndolos en sacarosa en tampón fosfato salino (PBS), pH 7,4, primero al 10% durante 24 horas y más tarde al 30% hasta que se hundieron (2-5 días). A continuación se congelaron en isopentano a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se cortaron en un criostato en secciones de $30\text{ }\mu\text{m}$. Dichas secciones se montaron en portaobjetos gelatinizados.

6. INMUNOCITOQUÍMICA.

6.1. Inmunocitoquímica frente a TH, OX-6 y GFAP.

Para localizar y cuantificar el daño en neuronas dopaminérgicas y en las poblaciones microgliales y astrogliales se usaron técnicas de inmunocitoquímica frente a TH, OX-6 y GFAP. El anticuerpo frente a TH reconoce a la tirosina hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de DA y por tanto buen marcador de neuronas dopaminérgicas. El OX-6 reacciona con el determinante monomórfico del complejo mayor de histocompatibilidad II presente en la microglía activada. El GFAP es capaz de reconocer a la proteína fibrilar ácida presente en los astrocitos. Todos los anticuerpos se obtuvieron de suero de ratón. Las inmunocitoquímicas se realizaron sobre secciones de 30

µm de grosor de cerebros procedentes de animales perfundidos. Todos los lavados y diluciones se realizaron con tampón Tris salino (TBS) a pH 7,4.

Para los tres anticuerpos se siguió un protocolo común que sólo se diferenció en las concentraciones de los distintos anticuerpos primarios (1:200 para la TH, 1:200 para el OX-6 y 1:300 para el GFAP). Las secciones se descongelaron y se dejaron secar durante unos minutos a temperatura ambiente. Después de varios lavados de 10 minutos cada uno se procedió a la activación de la peroxidasa endógena mediante una solución de H₂O₂ al 0,3% en metanol. Las secciones se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con suero de caballo al 1% en tampón TBS y posteriormente durante 18 horas con una solución del anticuerpo primario que contenía 0,25% de tritón X-100 y 1% de suero de caballo a 4 °C en una cámara con humedad para evitar que las secciones se sequen. El resto de la técnica se realizó a temperatura ambiente. Tras otra serie de lavados en TBS las secciones se trataron con una solución de IgG biotinilado de caballo frente a ratón preparada al 0,5% en tampón TBS con un 0,25% de tritón X-100 durante dos horas. Posteriormente y tras una nueva serie de lavados en TBS las secciones se incubaron durante una hora con una solución de ExtrAvidin[®]-Peroxidase (Kit ABC) diluido al 1% en TBS. La peroxidasa se visualizó revelando con una solución estándar de diaminobenzidina/hidrógeno durante 5 minutos.

6.2. Análisis de los datos obtenidos por inmunocitoquímica.

Para la medida de las áreas carentes de inmunorreactividad frente a GFAP expresadas en mm² se utilizó el programa de análisis de imagen

AnalySIS® (Soft Imaging System GMBH, Münster, Alemania) acoplado a una cámara de fotos digital Polaroid (Polaroid Corporation, Cambridge, MA, EE.UU.) que fue montada en un microscopio óptico DMLB de Leika (Leika Mikroskopie, Wetzlar, Alemania). El conteo del número de células OX-6 positivas se realizó utilizando 5 campos por sección y 5 secciones por animal. Los resultados se expresaron como células por mm². En el caso de las neuronas TH inmunopositivas en la sustancia negra, el conteo se realizó usando 5 campos por sección y 5 secciones por animal y los resultados se expresaron como número de neuronas por sección.

7. HIBRIDACIÓN *IN SITU*.

7.1. Obtención de la ribosonda.

En nuestro estudio usamos diferentes clones que fueron sembrados en placas de agar con medio de crecimiento Luri (LB) con 100 µg/mL de ampicilina como antibiótico. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas para conseguir colonias aisladas. Por cada clon se resembró una colonia, esta vez en 25 mL de LB líquido y con la misma concentración de ampicilina y se incubó a 37 °C con agitación de 200 r.p.m. durante 16 horas. Tras esto se realizó la extracción del ADN plasmídico utilizando un Plasmid Midi Kit de Quiagen. A continuación se procedió a la linealización de los distintos clones, incubando cada uno de ellos a 37 °C durante 2 horas con la enzima de restricción correspondiente para obtener las sondas sentido y antisentido. Por último, el ADN linealizado se fenolizó y precipitó con etanol absoluto en frío y acetato

sódico 3M (pH 5,3) para eliminar los restos de enzimas y sales remanentes tras las manipulaciones previas. Después de esto y tras cada paso intermedio, se realizaron electroforesis de alícuotas de 1 μ L de cada uno de los clones en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, con objeto de visualizar y cuantificar el ADN.

Posteriormente, se procedió a la transcripción de este ADN para la obtención de la ribosonda. La mezcla de reacción contenía: 20 unidades de polimerasa, el tampón proporcionado con ésta, ATP, CTP y GTP, cada uno a concentración de 1 mM, 125 μ Ci de [³⁵S] UTP 30 μ M (1300 Ci/mmol), DTT 4 mM y 7,2 unidades de inhibidor de la ribonucleasa. La reacción de marcaje transcurrió a 37 °C durante 2 horas y fue parada con EDTA 0.5 M. Seguidamente se separó el isótopo incorporado al ARNc del que no lo fue mediante columnas de Sephadex y posterior centrifugación durante 2 minutos a 735 x g.

Los clones empleados fueron:

1. El ADNc de TH de rata clonado en PGEM-4Z como un inserto de *EcoRI-KpnI* de 380-pb, fue amablemente cedido por el Dr. Sokoloff (INSERM, París). Para preparar la ribosonda antisentido de TH, este plásmido se linealizó con *EcoRI* y fue usado como molde con la ARN polimerasa T7 (Díaz y col., 1995). Para preparar la ribosonda sentido de TH el plásmido se linealizó con *SmaI* y fue usado como molde con la ARN polimerasa SP6 (Díaz y col., 1995).
2. El ADNc del transportador de dopamina de rata contenido en un fragmento de *XbaI-HindIII* de 800-pb clonado en pRc/CMV (Invitrogen

Corporation), fue amablemente cedido por el Dr. M. P. Martres (INSERM, París). Este plásmido se linealizó con *XbaI* y se usó como molde con la ARN polimerasa T7 para preparar la ribosonda antisentido del DAT. Para preparar la ribosonda sentido del DAT el mismo plásmido se linealizó con *HindI* y se usó como molde con la ARN polimerasa SP6 (Díaz y col., 1995).

3. Plásmidos pBluescript SK, conteniendo la secuencia de la ácido glutámico descarboxilasa 67 (GAD₆₇) como un inserto de *EcoRI* de 3.2 kpb (clones 14 y 18), fueron amablemente cedidos por el Dr. A. Tobin (UCLA, Los Angeles, EE.UU). El ADNc de GAD₆₇ fue aislado de una librería de ADNc 1 gt-11 preparada a partir de ARN poli (A) del cerebro adulto de rata (Erlander y col., 1991). Para preparar el transcrito sentido de GAD₆₇, el clon 14 fue digerido con *Sall* y usado como molde con la polimerasa T3. Para preparar el transcrito antisentido de GAD₆₇, el clon 18 fue digerido también con *Sall* y usado como molde con la ARN polimerasa T3.
4. El ADNc del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) clonado en PGEM-4Z como un inserto de 460-pb (Promega, Madison, WI, EE.UU) fue amablemente cedido por Genetech (South San Francisco, CA, EE.UU). Para preparar las ribosondas sentido y antisentido de BDNF, este plásmido se linearizó con *HindI* y *EcoRI*, respectivamente, y el ADN obtenido fue usado como molde con la ARN polimerasa SP6 o T7 (Research Biochemicals).

7.2. Reacción de hibridación.

Las secciones de 12 μm se obtuvieron en criostato disponiéndose sobre portaobjetos previamente gelatinizados. Una vez descongeladas fueron post-fijadas en paraformaldehído al 4% durante 30 minutos, continuándose con tres pasos de lavado de 10 minutos cada uno en tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4. Para disminuir las uniones inespecíficas las secciones fueron tratadas con trietanolamina 0,1 M pH 8,0 (1 minuto) y con anhídrido acético al 0,25% en trietanolamina 0,1M (10 minutos). Se continuó con un lavado de 1 minuto en SSC 2X, preparado a partir de uno SSC 20X (3M de NaCl y 0,3M de citrato sódico). A continuación, las secciones fueron deshidratadas mediante paso por soluciones con concentraciones crecientes de etanol (30, 60, 90 y 100%) y secadas al aire. A continuación se procedió a la hibridación de la sonda de [³⁵S]ARNc con su secuencia complementaria; previamente la sonda se diluyó en el tampón de hibridación y se desnaturalizó a 80 °C durante 5 minutos. Dicho tampón se componía de formamida al 50%, solución Denhardt 0,002%, SSC 1X, Tris-HCl 50 mM, pirofosfato sódico 0,1%, ARN de levadura 0,1 mg/mL, esperma de salmón 0,1 mg/mL, EDTA 1mM y sal sódica de sulfato de dextrano. La hibridación se llevó a cabo durante 3 horas a 50 °C, enjuagándose a continuación en dos soluciones de SSC 2X, una con DTT 20 mM y otra sin DTT. Seguidamente se sometieron a digestión con ribonucleasa (Rnasa) a 37 °C (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Rnasa A en NaCl 0,5M, Tris-HCl 0,01M y EDTA 1mM, a pH 8,0) durante 30 minutos. Para aumentar la astringencia, las secciones se dejaron en una solución de SSC 2X con β -mercaptoetanol 0,02M a 25 °C durante toda la noche, y otra solución de SSC 0,1X a 60 °C durante 1 hora.

Finalmente las secciones fueron deshidratadas en etanoles (30, 60, 90 y 100%) con acetato amónico 0,3M y secadas al aire.

7.3. Análisis y cuantificación de la señal de hibridación.

Como paso previo a la cuantificación de la señal, los portaobjetos fueron expuestos a un film de autorradiografía Betamax durante 10 días.

Para el estudio de la expresión del ARNm se cuantificó tanto la densidad óptica sobre la película de autorradiografía como el número de granos de plata sobre neuronas individuales, utilizando un sistema de análisis de imagen. Las secciones fueron procesadas para la emulsión autorradiográfica. Los portaobjetos se impregnaron de emulsión LM-1 diluida 1:1 con agua, manteniéndose en la oscuridad a 4 °C durante 30 días (tres veces el tiempo de exposición del film). A continuación, las secciones se revelaron con el revelador D-19 (Kodak) durante 2,5 minutos a 15 °C y se fijaron durante 4 minutos para teñirlas a continuación con cresil violeta al 0,5%, pH 3,8, deshidratarlas y finalmente montarlas con medio de montaje. El marcaje fue considerado específico cuando la acumulación de granos sobre las células individuales en los núcleos excedió 5 veces el valor del ruido de fondo en la ampliación 100X. El área que se consideró para la cuantificación fue aquella de alta densidad de granos sobre los cuerpos celulares individuales. Debido a los altos niveles de marcaje, a la disposición típica de las agrupaciones sobre los cuerpos y al alto aumento, la delimitación fue inequívoca. Sólo las células bien separadas fueron seleccionadas para la cuantificación. Se analizaron las secciones correspondientes al sitio de la lesión de 5 animales por tratamiento, midiéndose

un mínimo de 100 células para cada uno. Se obtuvieron las imágenes TIF mediante una cámara fotográfica Polaroid DMC acoplada a un microscopio Leika y el analizador de imágenes AnalySIS (Alemania). Para el análisis de las imágenes se empleó este mismo *software*, haciéndose previamente una calibración con una microescala de $^3\text{[H]}$ suministrada por el proveedor del isótopo, asignándose a las unidades de marcaje los valores de densidad óptica/ mm^2 obtenidos. El sistema identifica objetos usando una ventana definida por el usuario, midiendo DO/mm^2 .

8. DESHIDRATACIÓN Y MONTAJE DE LAS SECCIONES

Para la deshidratación de las secciones se utilizó un procedimiento general mediante el cual se sumergieron en soluciones de concentraciones crecientes de etanol (50, 70, 80, 90 y 100%) durante 5 minutos y seguidamente se mantuvieron durante 15 minutos en Histolemon. El medio de montaje utilizado una vez completado el proceso fue el DPX.

9. ESTADÍSTICA.

Los resultados se expresaron como medias \pm desviación estándar. Las medias se compararon y los resultados se analizaron con una ANOVA de una vía seguido de un test LSD para comparaciones múltiples. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa SGPlus 7.1.

10. REACTIVOS.

El lipopolisacárido obtenido de *Escherichia coli* serotipo 026:BC fue proporcionado por Sigma Chemical Co, EE.UU.

El Monastral[®]Blue se obtuvo de Sigma Chemical Co, EE.UU.

El inhibidor de la tirosina hidroxilasa, α -metil-p-tirosina, la L-3,4-dihidroxifenil-alanina (L-DOPA), el benserazida (DL-serina-2-[2, 3, 4-trihidroxifenilhidracina]), el ácido kinurénico (4-hidroxiquinolina-2-acido carboxílico) y el sulpiride ([-]-N-1-[etilpirrolidin-2-il-metil]-2-metoxi-5-sulfamoilbenzamida) se obtuvieron de Sigma Chemical Co, EE.UU.

En las determinaciones inmunocitoquímicas de tirosina hidroxilasa (TH), astrogliá y microgliá se utilizaron los siguientes productos: como anticuerpos primarios se usaron anti-OX-6 (1:200) hecho en ratón (Serotec, Reino Unido) que reacciona con el determinante monomórfico del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II); anti-proteína fibrilar ácida de gliá hecha en ratón (1:300) (GFAP, Chemicon, EE.UU) y anti-TH (1:200) obtenida en ratón (Boehringer-Mannheim). El secundario utilizado fue en los tres casos un anti-IgG biotinilado de Vector (Reino Unido) contra ratón obtenido en caballo, mientras que como sistema de revelado se utilizó el Kit ABC (ExtraAvidin[®]-Peroxidase) de Vector (Reino Unido). El suero empleado fue suministrado por Vector (Reino Unido). El agua oxigenada para la destrucción de la peroxidasa endógena se obtuvo de Merck, Alemania, mientras que la utilizada para el revelado con diaminobenzidina fue proporcionada por Sigma Chemical.Co, EE.UU. Para el revelado de las técnicas inmunocitoquímicas se

utilizó tetracloruro de 3,3'-diaminobencidina (DAB), de Sigma Chemical Co, EE.UU. El Tritón X-100 fue suministrado por Sigma Chemical Co, EE.UU.

Para la deshidratación y montaje de las secciones se utilizó Histolemon de Carlo Erba y DPX de BDH.

Como líquido de centelleo se empleó Formula-989 LSC Cocktail de New England Nuclear.

La perfusión de los animales para las técnicas de inmunocitoquímica se realizó con paraformaldehído de Carlo Erba.

Para la elaboración de las ribosondas empleadas en la hibridación *in situ*, el medio para el desarrollo y mantenimiento de *Escherichia coli* fue la Base de Caldo de Luria suministrada por Cultimed y el Agar Bacteriológico adquirido a Biolife Italiana. El antibiótico empleado fue ampicilina (Sigma Chemical Co). El ADN plasmídico fue obtenido mediante un Plasmid Midi de Quiagen. Los plásmidos fueron linearizados con las enzimas de restricción *EcoRI*, *XbaI* y *Sall* proporcionadas por Amersham Pharmacia Biotech. Tanto el fenol como el cloroformo utilizados en la precipitación del ADN fueron suministrados por Sigma Chemical Co. Para visualizar el ADN plasmídico tras cada paso se realizaron electroforesis en geles de agarosa (Pronadisa) teñidos con bromuro de etidio (Merck).

En los estudios de hibridación *in situ* se usó dietilpirocarbamato de Serva como inhibidor de las ribonucleasas a lo largo de todo el ensayo y uridina 5' [α -tio] [^{35}S] trifosfato (UTP) de Amersham Pharmacia Biotech como marcador del ARNm. Para la transcripción de la sonda se empleó la polimerasa de ARN T3 y T7 de Promega, así como microcolumnas ProbeQuant G-50 de Amersham

Pharmacia Biotech para la separación del UTP no incorporado a la sonda. Los reactivos de uso en el ensayo de hibridación *in situ* fueron de calidad para biología molecular. Los demás solventes y reactivos fueron de alto grado de pureza, obteniéndose todos ellos de los proveedores habituales.

RESULTADOS

1. MEDIDA DE LA TEMPERATURA CORPORAL BAJO DISTINTOS TRATAMIENTOS.

Para determinar si el efecto protector observado tras la administración de α -MPT era debido a la hipotermia que esta droga puede llegar a inducir, se midieron las temperaturas corporales (rectales) de los animales bajo distintas condiciones (Fig.15). En animales controles (inyectados con vehículo) la temperatura corporal osciló entorno a los 38 °C. En el resto de grupos monitorizados, la temperatura corporal se mantuvo en valores próximos a los normales, con la excepción del grupo tratado con 200 mg/kg de α -MPT, en el que la temperatura fue disminuyendo a lo largo de la semana de tratamiento hasta el día 4. A partir de ese momento, la temperatura se estabilizó en torno a los 32.7 °C hasta el final del tratamiento. Los animales tratados con 200 mg/kg de α -MPT pero mantenidos en una alta temperatura ambiental (33 °C) mantuvieron los valores normales de temperatura hasta el final del tratamiento.

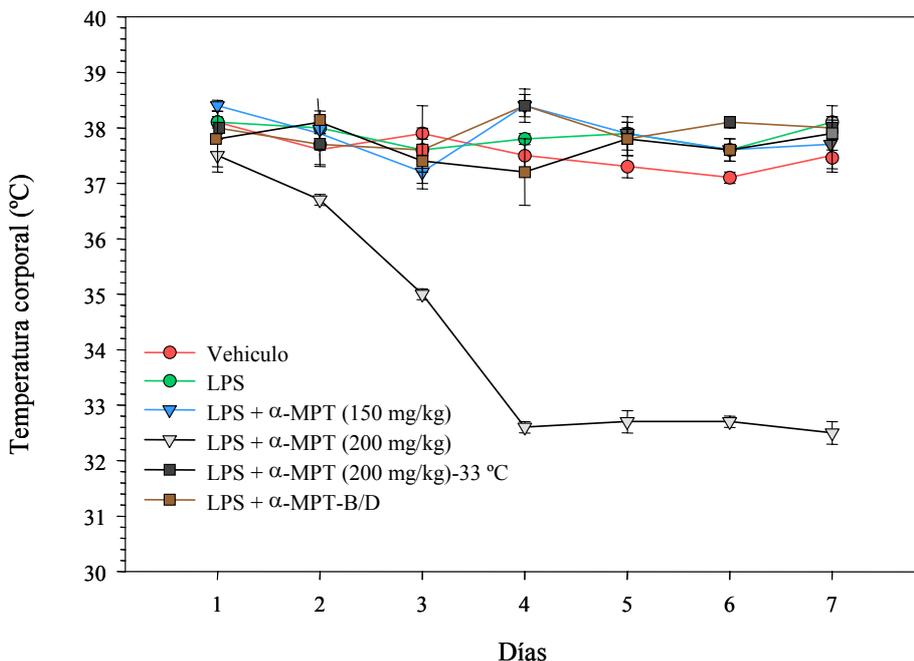


Fig. 15. Temperatura corporal registrada para los distintos tratamientos. Las temperaturas rectales se midieron con un termómetro digital cada 2 h a lo largo de 8 h al día durante todo el tratamiento. Los valores se promediaron y se expresaron como media \pm DE.

2. EFECTO DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS SOBRE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS.

Para determinar el daño producido sobre las neuronas dopaminérgicas de la SN se usaron técnicas de inmunocitoquímica frente a la tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de dopamina y un buen marcador de este tipo de neuronas. Sin embargo, este tipo de técnica podría originar resultados erróneos ya que se sabe que las neuronas en estado de degeneración pueden poseer un incremento en la tinción de TH debido a que el anticuerpo puede unirse a fragmentos de esta enzima. Para corroborar los resultados obtenidos por inmunocitoquímica también se realizaron técnicas de hibridación *in situ* frente al ARNm de la TH y del transportador de dopamina.

2.1. Efecto de la inyección de vehículo.

El efecto del vehículo (salino en Monastral Blue al 1%) cuando fue inyectado en la SN se midió contando la población neuronal TH-positiva y se expresó como número de neuronas por sección (Fig. 20). La inyección de vehículo no produjo, como era de esperar, la muerte de neuronas dopaminérgicas en la SN siendo el número de neuronas promedio por sección de 112 ± 23 .

Las técnicas de hibridación *in situ* mostraron resultados similares, de manera que se encontraron cuerpos neuronales y fibras rodeando el sitio de la inyección (Fig. 21A, 22A). La expresión de los ARNm de TH y DAT se midió

contando los granos de plata de las neuronas supervivientes alrededor del sitio de inyección (23A, B).

2.2. Efecto de la inyección de LPS.

La inyección de 2 µg de LPS en la SN redujo el número de cuerpos celulares TH-positivos en un 59.3% (Fig. 20) con respecto al vehículo (63 ± 15 células por sección, $p < 0.01$) y alteró claramente el patrón de tinción tanto para los cuerpos celulares como para las fibras (Fig. 16). También se midieron los niveles de expresión de TH (Fig. 21) y DAT (Fig. 22) contando los granos de plata en las neuronas supervivientes alrededor del sitio de inyección usando técnicas de hibridación *in situ*. El patrón normal de expresión de ARNm de TH (Fig 21A, B) y DAT (Fig. 22A, B) se alteró claramente tras la inyección de LPS (Fig 21C, D y 22C, D). La cuantificación a través del recuento de granos de plata (Fig. 23A) mostró un claro descenso de la expresión del ARNm de TH en los animales tratados con LPS respecto al control con vehículo ($76.6 \pm 11.1\%$; $p < 0.001$). Los niveles de expresión del ARNm del DAT (Fig. 23B) también disminuyeron claramente en los animales tratados con LPS ($87.6 \pm 2.6\%$ respecto al control; $p < 0.001$).

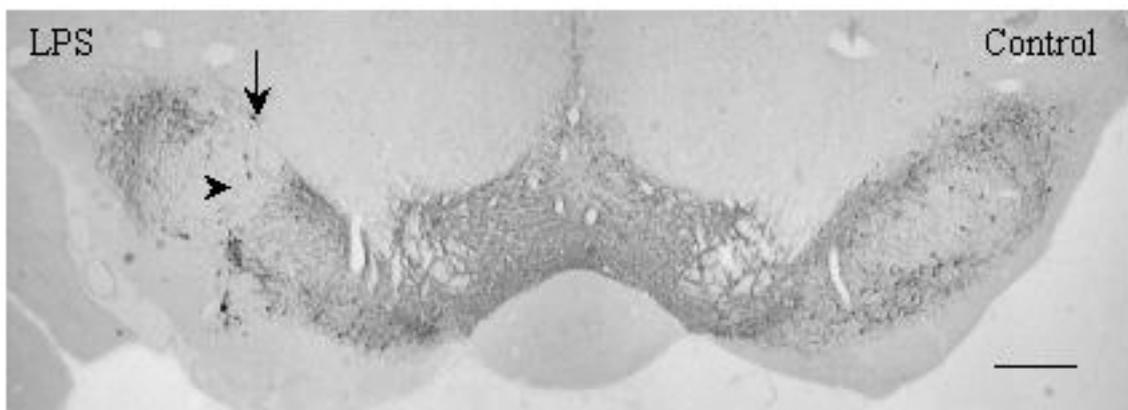


Fig. 16. Efecto sobre las neuronas TH-positivas del tratamiento con LPS. Inmunorreactividad frente a la TH en animales inyectados con LPS. La flecha indica el lugar de la inyección de 2 μ g de LPS. El trazador inerte es visible en el área lesionada (cabeza de flecha), donde la tinción TH aparece reducida comparada con el lado derecho de la foto, correspondiente a una SN control. Barra de escala: 500 μ m.

2.3. Efecto del tratamiento con LPS y α -MPT.

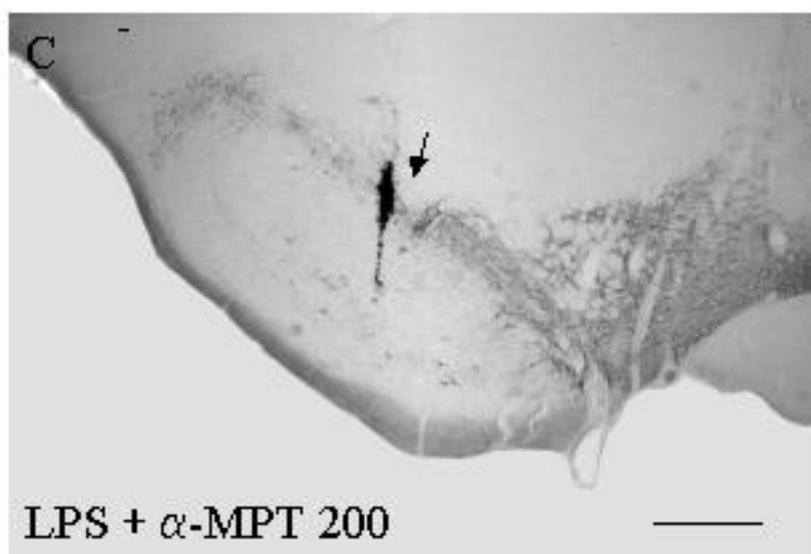
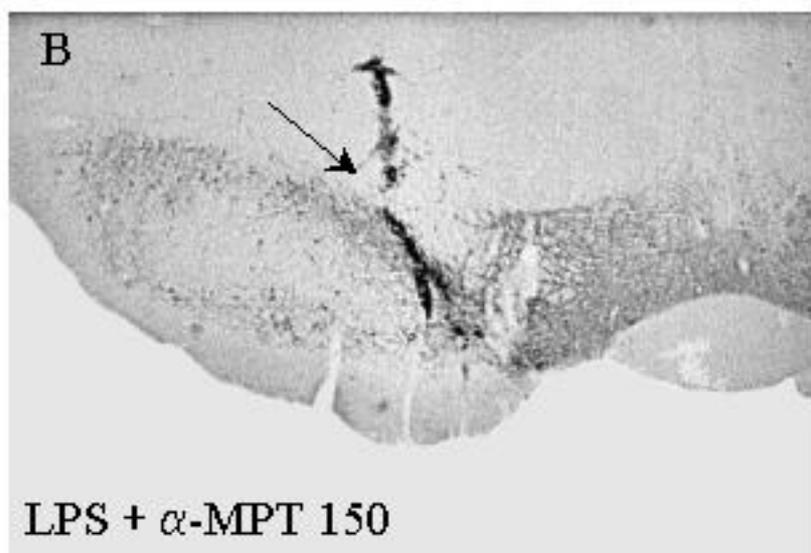
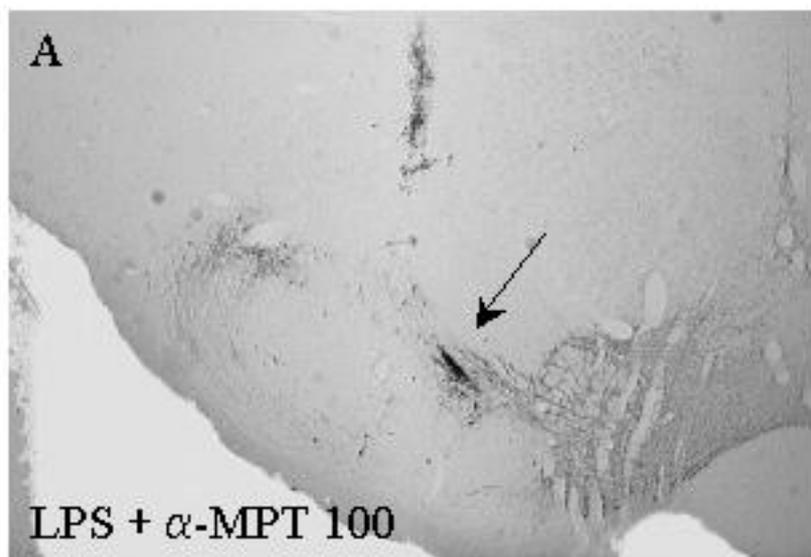
El daño producido en las neuronas dopaminérgicas por la inyección intranigral de LPS fue claramente prevenido por el tratamiento con α -MPT de una forma dependiente de la dosis (Fig. 17).

La dosis de 100 mg/kg (Fig. 17A) produjo un ligero aumento en el número de neuronas TH-positivas (86 ± 21) en comparación con el grupo de animales tratados sólo con LPS. Sin embargo este aumento no resultó ser significativo (Fig. 20). Las dosis de 150 y 200 mg/kg recuperaron el número de cuerpos neuronales (102 ± 22 y 101 ± 9 células por sección respectivamente) hasta niveles próximos a los valores control (Fig. 20). Tanto los cuerpos neuronales como las fibras rodearon de cerca el sitio de la inyección (Fig. 17B, C).

El grupo de animales tratados con α -MPT y mantenidos a 33 °C también recuperó la población de neuronas TH-positivas (Fig. 20) hasta los valores control (109 ± 25 células por sección), demostrando así que la protección ejercida por la α -MPT no se debe a su efecto hipotérmico.

Los resultados de la hibridación *in situ* también mostraron una recuperación en la expresión del ARNm de TH en animales tratados con 150 mg/kg de α -MPT (Fig. 21E, F) alcanzando un $121,7 \pm 5.2\%$ ($p < 0,001$) de los valores control (Fig. 23A). Asimismo el tratamiento con 150 mg/kg de α -MPT (Fig. 22E, F) recuperó el patrón normal de expresión del ARNm del DAT (94.6 ± 0.4 ; Fig. 23B).

Fig. 17. Efecto sobre las neuronas TH-positivas del tratamiento con LPS y α -MPT. **(A)** Inmunorreactividad frente a TH de un animal inyectado con LPS y tratado con 100 mg/kg de α -MPT. La flecha indica el lugar de inyección de 2 μ g de LPS. El Monastral Blue es visible cerca del área lesionada, donde se observa una pérdida de cuerpos neuronales y fibras alrededor del lugar de inyección. **(B)** Inmunorreactividad frente a TH de un animal inyectado con LPS y tratado con 150 mg/kg de α -MPT. La flecha indica el lugar de inyección de 2 μ g de LPS. La inmunorreactividad frente a TH es muy similar a una SN control. El Monastral está rodeado de cerca por cuerpos neuronales y fibras. **(C)** Tinción frente a TH de un animal inyectado con LPS y tratado con 200 mg/kg de α -MPT. La flecha indica el lugar de inyección de 2 μ g de LPS. La inmunorreactividad frente a TH es de nuevo muy similar a una SN control. El trazador inerte está rodeado de cerca por cuerpos neuronales y fibras. Barra de escala: 500 μ m.



2.4. Efecto del tratamiento con LPS, α -MPT y L-DOPA/benserazida.

Cuando la inhibición de la TH fue soslayada por el tratamiento con L-DOPA/benserazida (Fig. 18), el número de neuronas TH-positivas se asemejó al encontrado en los animales del grupo tratado con LPS sólo (68 ± 18 células por sección, $p < 0,001$ comparado con el grupo inyectado con vehículo; Fig. 20), sugiriendo así la implicación de la dopamina en el daño inducido por el LPS. Los niveles de expresión de los ARNm de TH y DAT (Fig. 21G, H y Fig. 22G, H) también disminuyeron respecto a los controles tras el tratamiento con L-DOPA/benserazida hasta niveles próximos a los observados en los animales tratados con LPS sólo ($83,2 \pm 4,2\%$; $p < 0,001$ y $77,8 \pm 5,6\%$; $p < 0,001$ para la TH y el DAT respectivamente; Fig. 23).

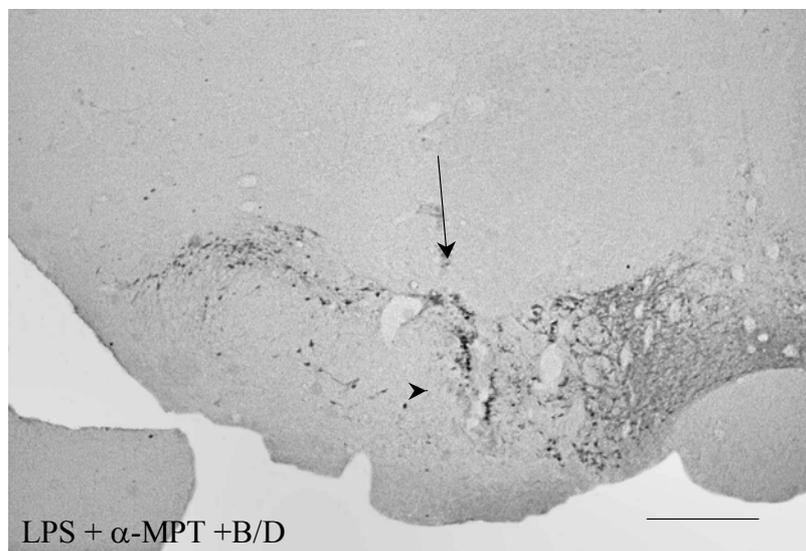


Fig. 18. Efecto sobre las neuronas TH-positivas del tratamiento con LPS y α -MPT/L-DOPA/benserazida. Inmunorreactividad frente a TH en animales tratados con LPS/ α -MPT/L-DOPA/benserazida. La flecha indica el sitio de inyección de 2 μ g de LPS. La recuperación de los niveles de DA conduce a una reducción en los cuerpos y fibras TH-positivos alrededor del sitio de inyección (cabeza de flecha). Barra de escala: 500 μ m.

2.5. Efecto del tratamiento con LPS y sulpiride.

Cuando se bloquearon los receptores D2 de dopamina con el antagonista sulpiride (Fig. 19A), el número de neuronas TH-positivas fue algo menor al encontrado en los animales del grupo tratado con LPS sólo (80 ± 9 células por sección, $p < 0,001$ comparado con el grupo inyectado con vehículo). Sin embargo este número no llegó a ser significativo (Fig. 20), sugiriendo así que la implicación de la dopamina en el daño inducido por el LPS no está mediado por los receptores D2.

2.6. Efecto del tratamiento con LPS y ácido kinurénico.

La coinyección de LPS y el antagonista de glutamato ácido kinurénico (Fig. 19B) originó unos resultados similares a los encontrados en los animales inyectados sólo con LPS, siendo el número de neuronas supervivientes incluso algo menor que en el grupo de LPS (49 ± 11 , $p < 0,001$ comparado con el grupo inyectado con vehículo; Fig. 20).

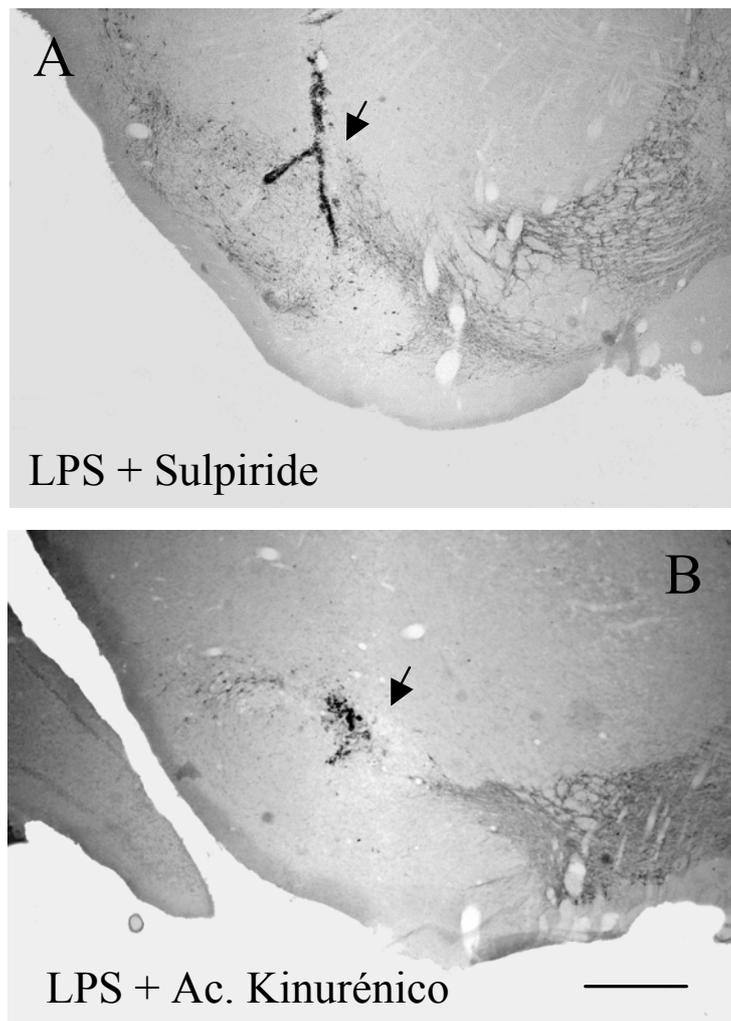


Fig. 19. Efecto sobre las neuronas TH-positivas de los tratamientos con LPS y sulpiride y LPS con ácido kinurénico. **(A)** Inmunorreactividad frente a la TH en animales inyectados con LPS y tratados con 80 mg/kg de sulpiride. La flecha indica el lugar de la lesión de 2 μ g de LPS. El trazador inerte es visible en el área lesionada. **(B)** Inmunorreactividad frente a TH de un animal inyectado con LPS y ácido kinurénico. La flecha indica el lugar de inyección de 2 μ g de LPS y 30 nmoles de ac. kinurénico. La inmunorreactividad frente a TH es muy similar a una SN tratada sólo con LPS. Barra de escala: 500 μ m.

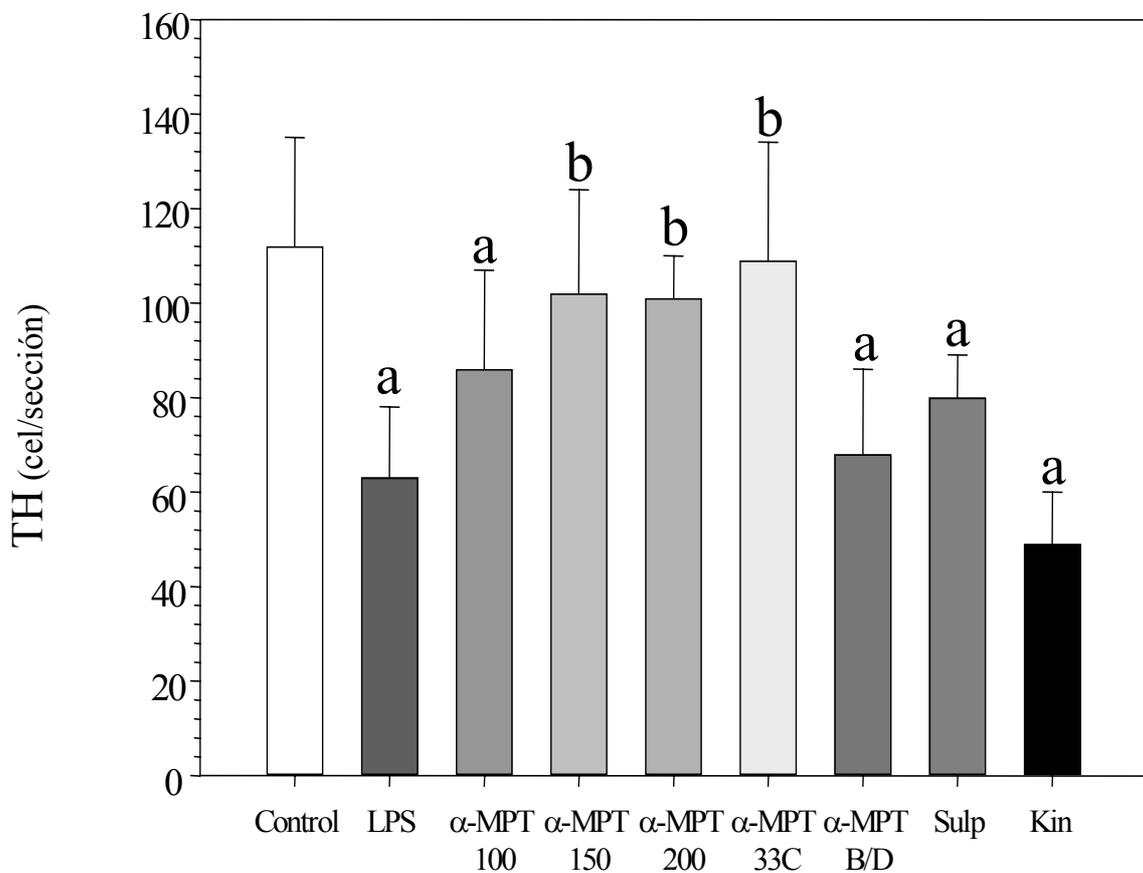


Fig. 20. Cuantificación del número de neuronas TH-positivas tras los distintos tratamientos. Cuantificación de las células TH-positivas en la SN izquierda de ratas tras los tratamientos mostrados en la figura 14. Los resultados se expresaron como medias \pm DE de al menos 5 experimentos independientes y se expresaron como células TH-positivas por sección. Significación estadística. ANOVA de una vía seguido de un test LSD para comparaciones múltiples. $\alpha=0.05$. a, comparado con el grupo inyectado con vehículo; b, comparado con el grupo inyectado con LPS; $p<0.001$.

Fig. 21. Hibridación *in situ* del ARNm de TH en la SN de las ratas tras los diferentes tratamientos. **(A)** Animal inyectado con vehículo. Fotografía en campo oscuro de los portaobjetos emulsionados. La flecha muestra el sitio de inyección. **(B)** Fotografía a alta magnificación en campo claro del área marcada con la flecha blanca en la fotografía A, mostrando la expresión normal del ARNm de la TH (flecha). **(C)** Animal inyectado con LPS. La flecha muestra el sitio de inyección. **(D)** Alta magnificación del área marcada con la flecha en la fotografía C. El área dañada contiene células supervivientes que expresan ARNm de TH (flechas) con una disminución en los niveles de expresión. **(E)** Animales tratados con LPS y 150 mg/kg de α -MPT. La flecha muestra el sitio de inyección. Las células que expresan ARNm de TH son claramente visibles cerca del sitio de inyección. **(F)** Alta magnificación del área marcada con flecha en la fotografía E. Las células que rodean al trazador inerte (flechas) muestran unos niveles de expresión similares a los animales inyectados con vehículo. **(G)** Animales tratados con LPS + α -MPT/L-DOPA/benserazida. La flecha muestra el sitio de inyección. La pérdida de células que expresan ARNm de TH se asemeja a la mostrada por los animales inyectados con LPS. **(H)** Alta magnificación del área marcada con flecha en la fotografía G. La expresión del ARNm de la TH (flechas) se ve reducida a niveles similares a los mostrados por animales inyectados con LPS. Barras de escala: fotografías A, C, E y G, 250 μ m; fotografías B, D, F y H, 25 μ m.

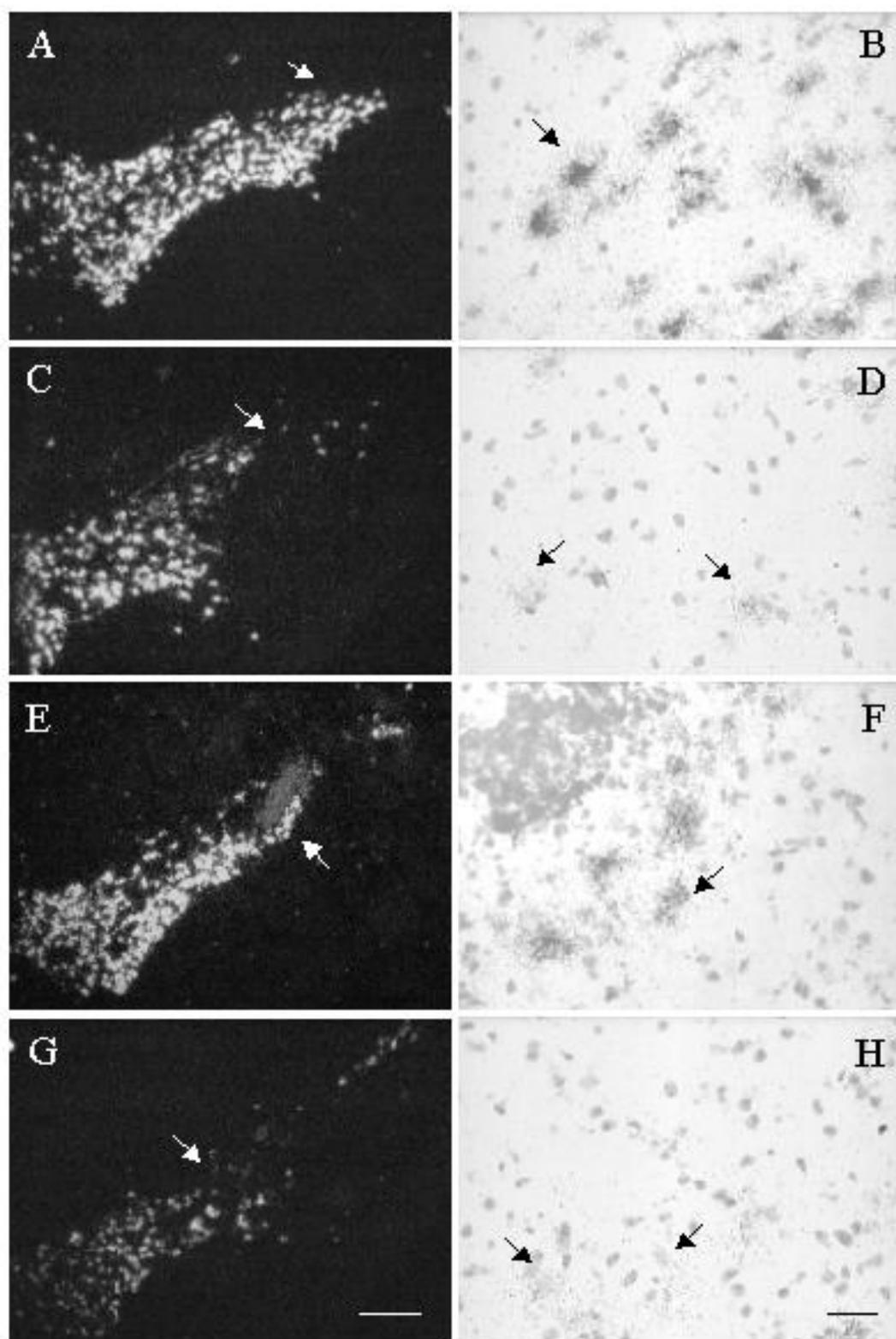
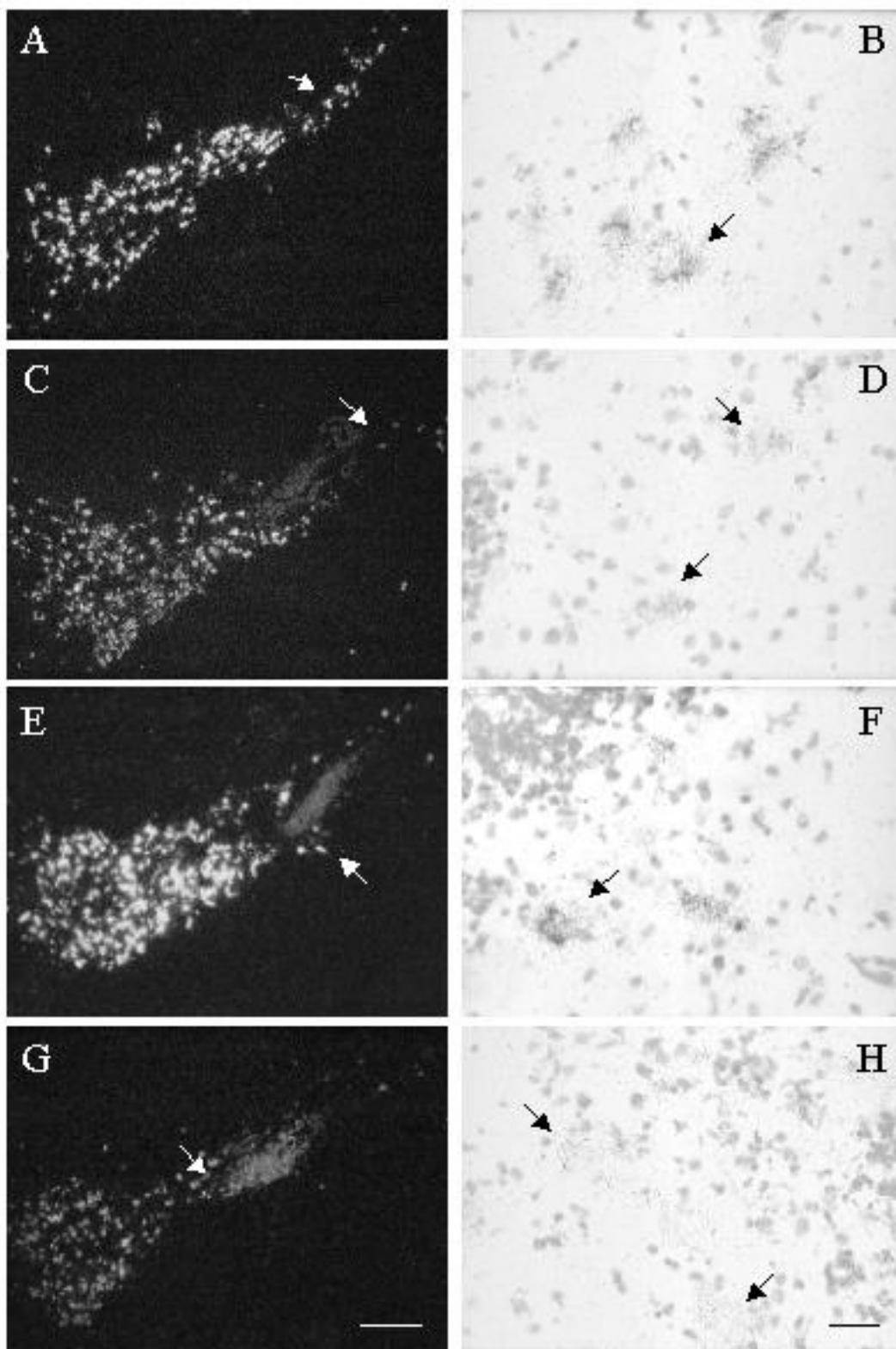


Fig. 22. Hibridación *in situ* del ARNm del transportador de dopamina en la SN tras los distintos tratamientos. **(A)** Animales tratados con vehículo. Fotografía en campo oscuro de los portaobjetos emulsionados. La flecha muestra el sitio de la inyección. **(B)** Alta magnificación de fotografías en campo claro del área marcada con la flecha blanca en la fotografía A, mostrando la expresión normal del ARNm del DAT (flecha). **(C)** Animales inyectados con LPS. La flecha muestra el sitio de inyección. **(D)** Alta magnificación del área marcada con flecha en la fotografía C. El área dañada contiene células supervivientes que expresan ARNm de DAT (flechas) con un descenso en los niveles de expresión. **(E)** Animales inyectados con LPS y tratados con 150 mg/kg de α -MPT. La flecha muestra el sitio de inyección. Las células que expresan ARNm de DAT son claramente visibles próximas al sitio de inyección. **(F)** Alta magnificación del área marcada con flecha en la fotografía E. Las células alrededor del monastral (flecha) muestran unos niveles de expresión similares a los animales inyectados con vehículo. **(G)** Animales inyectados con LPS y tratados con α -MPT/L-DOPA/benserazida. La flecha muestra el sitio de inyección. La pérdida de células que expresan ARNm de DAT se asemejan a los animales inyectados con LPS. **(H)** Alta magnificación del área marcada con flecha en la fotografía G. La expresión del ARNm de DAT (flechas) se reduce a niveles similares a los animales inyectados con LPS. Barras de escala: fotografías A, C, E y G, 250 μ m; fotografías B, D, F y H, 25 μ m.



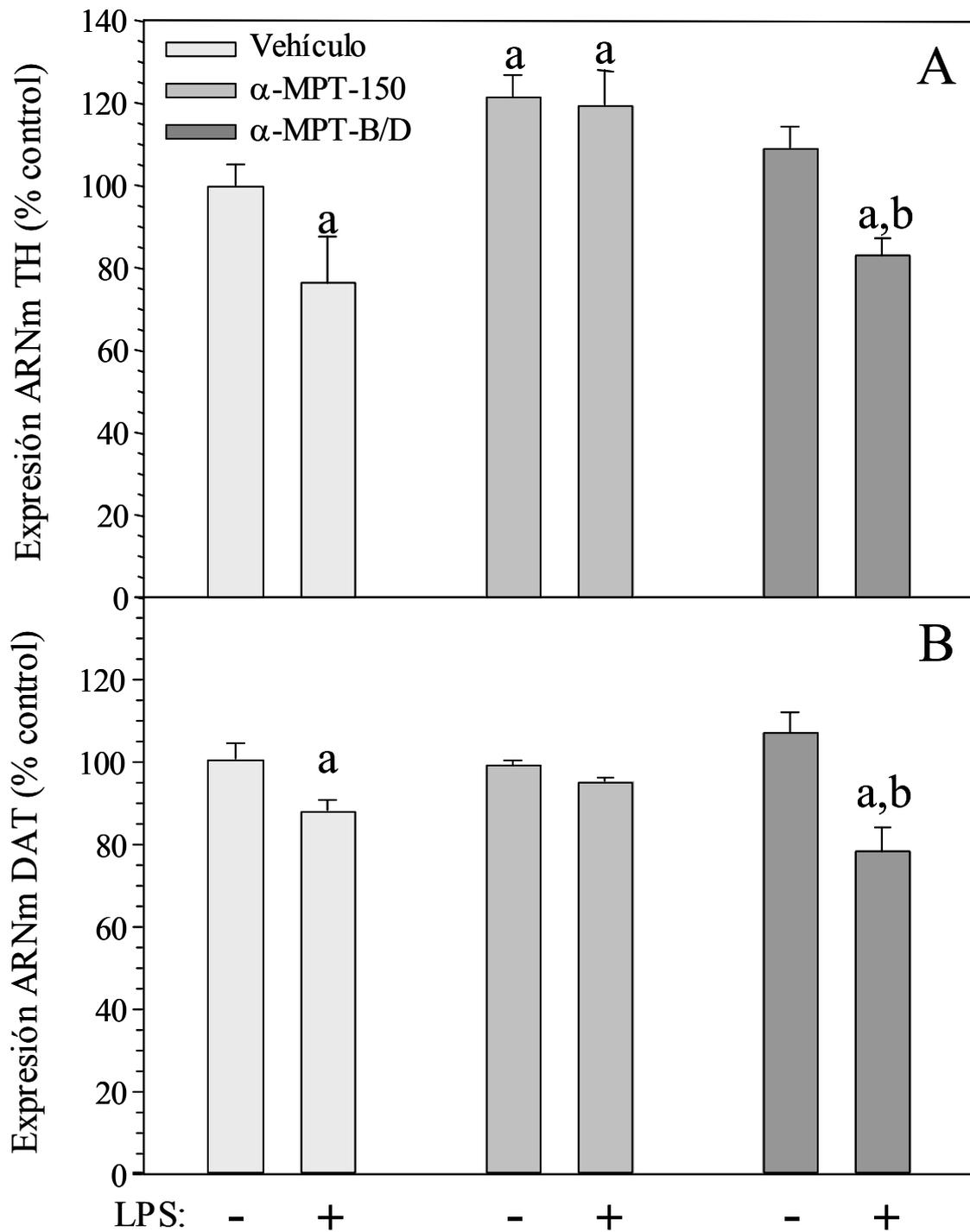


Fig. 23. Cuantificación de los niveles celulares de la expresión de ARNm de TH y DAT en la SN tras los distintos tratamientos. **(A)** Expresión del ARNm de TH. **(B)** Expresión del ARNm de DAT. Los números se expresan en medias \pm DE de al menos 5 experimentos independientes, expresados como porcentaje del control. Significación estadística: ANOVA de una vía seguida de un test LSD para comparaciones múltiples; $\alpha=0,05$. a, comparado con el vehículo; b, comparado con el lado contralateral (no inyectado con LPS); $p<0,001$.

3. EFECTO DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS SOBRE LAS NEURONAS GABAÉRGICAS.

En estudios previos realizados en el laboratorio se había demostrado que la inyección de LPS en la SN de la rata no producía ningún efecto sobre la población de neuronas GABAérgicas en términos de expresión del ARNm del GAD₆₇ (Herrera y col., 2000).

En esta ocasión, se comprobó la expresión de dicho marcador tras los distintos tratamientos ensayados. Como era de esperar, la población de neuronas GABAérgicas no resultó alterada por la inyección de LPS en ninguno de los casos. Así, las fotografías de las películas autorradiografiadas mostraron que no se produjo una pérdida de expresión del ARNm de GAD₆₇ alrededor del tracto de inyección, observándose células que expresaban este ARNm muy cerca del trazador inerte (Fig. 24A, B y C)

La cuantificación de los niveles de expresión del ARNm de GAD₆₇ en cada uno de los tratamientos reveló un ligero descenso en los niveles de expresión de este ARNm cuando se inyectó LPS, pero estas diferencias en ningún caso resultaron ser estadísticamente significativas (Fig 24D).

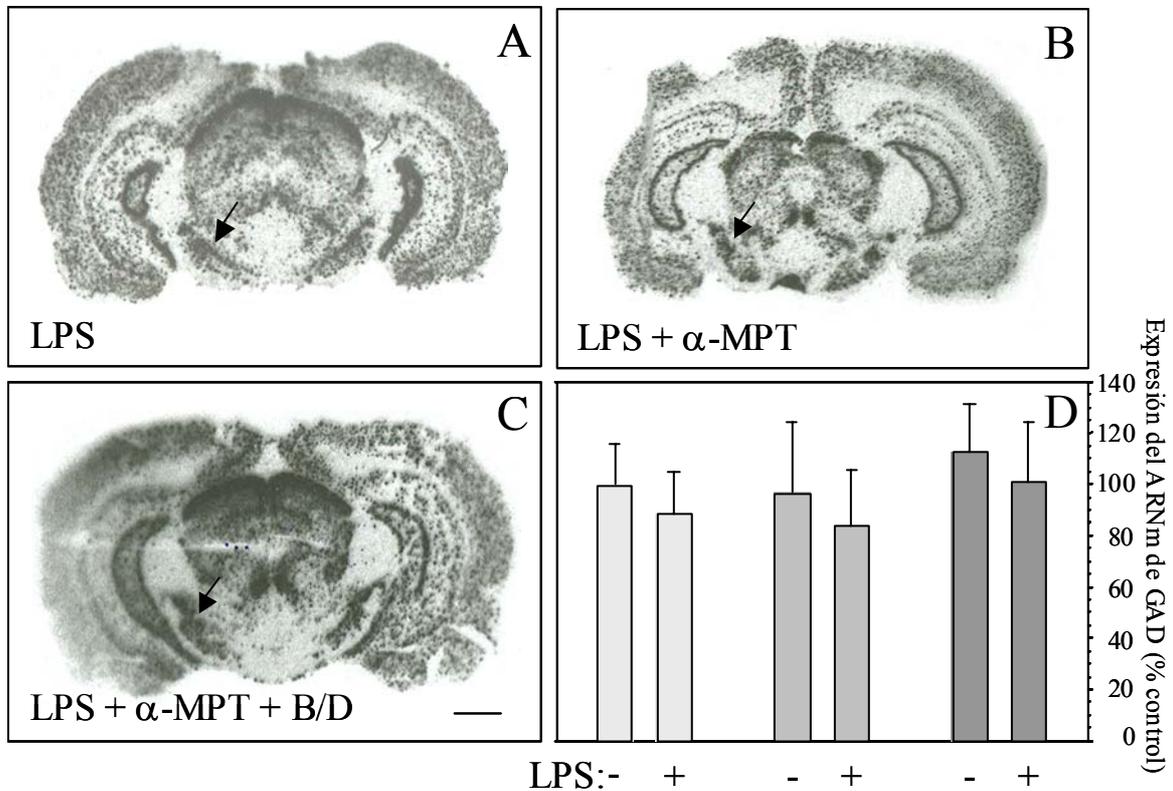


Fig. 24. Hibridación *in situ* del ARNm de GAD₆₇ en la SN tras los diferentes tratamientos. **(A)** Animales inyectados con LPS. La fotografía de la película autorradiografiada muestra la expresión del ARNm de GAD₆₇ después de la inyección de 2 µg de LPS en la SN izquierda. La flecha muestra el sitio de inyección. La expresión es similar a la del lado contralateral (no tratado). **(B)** Animales tratados con α-MPT (150 mg/kg)-LPS. La flecha muestra el lugar de inyección de 2 µg de LPS. La expresión del ARNm de GAD₆₇ es también similar a la de la SN contralateral (no tratada). **(C)** Animales tratados con α-MPT (150 mg/kg)-B/D-LPS. La flecha muestra el sitio de inyección de 2 µg de LPS. Las células que expresan GAD₆₇ son claramente visibles próximas al sitio de inyección. Barra de escala: 2mm. **(D)** Cuantificación de los niveles celulares de expresión del ARNm de GAD₆₇ en la SN tras los distintos tratamientos. Los números representan medias ± DE de al menos cinco experimentos independientes, expresados como porcentaje de los controles (para más detalle de la metodología usada para la cuantificación mirar en Materiales y Métodos). Los análisis estadísticos (ANOVA de una vía seguido de un test LSD para comparaciones múltiples) muestran que no hay diferencia significativa entre los distintos tratamientos.

4. EFECTO DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS SOBRE LA ASTROGLÍA.

Para la tinción de las células astrogliales se usaron técnicas de inmunocitoquímica con un anticuerpo monoclonal contra el GFAP. Aunque la astrogliosis es una reacción esperada tras la inyección de inflamógenos, se ha descrito previamente que tras diferentes daños se puede observar una pérdida de tinción de GFAP (Herrera y col., 2000) por lo que en nuestro sistema, una pérdida de tinción de GFAP es un buen marcador de daño celular causado por neurotoxinas, mientras que por el contrario, se considera que hay protección cuando se encuentra una disminución en la pérdida de GFAP inducida por la neurotoxina.

4.1. Efecto de la inyección de vehículo.

La inyección de 2 μ l de vehículo en la SN izquierda (Fig. 25A) no alteró la inmunoreactividad de GFAP, mostrando una distribución homogénea a lo largo de toda la sección. No hubo por tanto pérdida de tinción apreciable, lo que se indicó como “no detectable” en el proceso de cuantificación de las áreas carentes de inmunoreactividad. Alrededor del sitio de inyección sólo se observó una débil reacción caracterizada por un incremento de los astrocitos reactivos (Fig. 25B).

4.2. Efecto de la inyección de LPS.

La inyección de 2 μ g de LPS en la SN izquierda (Fig. 25C) produjo un área carente de inmunoreactividad frente a GFAP alrededor del sitio de

inyección ($1.38 \pm 0.48 \text{ mm}^2$; Fig. 29). Además el área dañada contenía restos GFAP-positivos procedentes de astrocitos degenerados e hipertróficos (Fig. 25D).

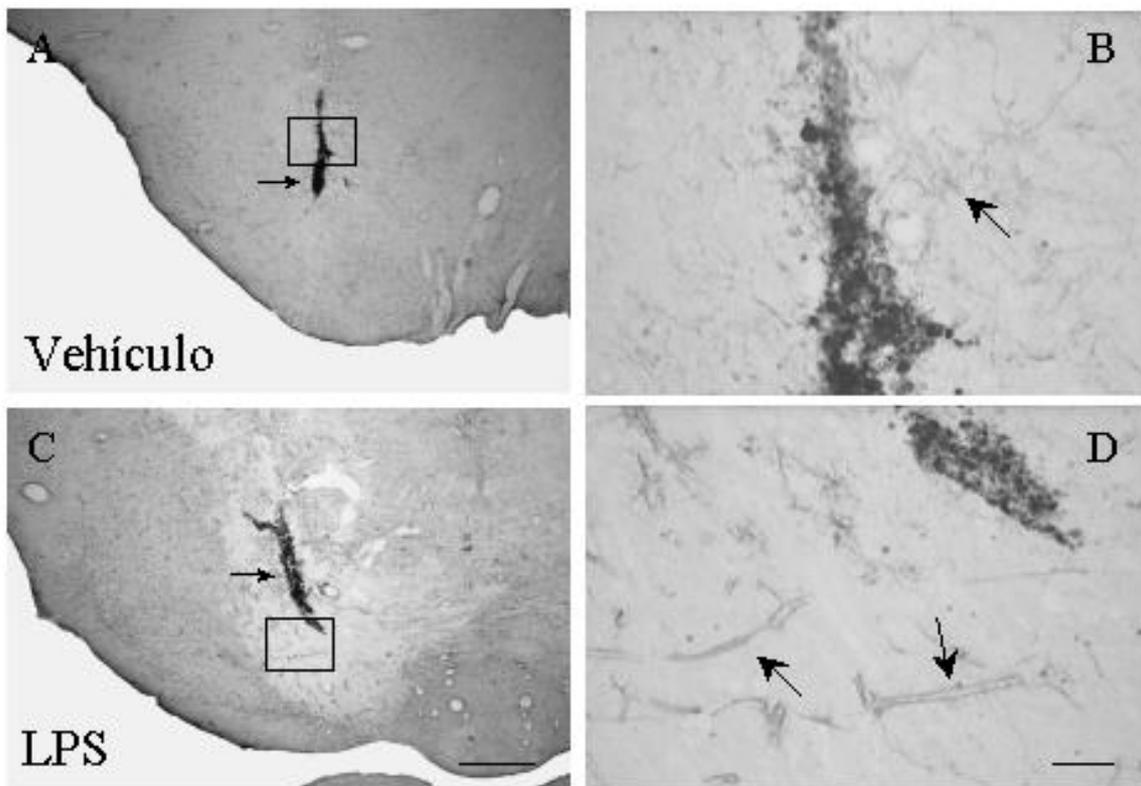


Fig 25. Efecto sobre la población astrocitaria de la inyección de vehículo y LPS en la SN. **(A)** Animal inyectado con vehículo. La flecha muestra el sitio de inyección. **(B)** Alta magnificación del recuadro marcado en la fotografía A. Se puede observar una leve reacción alrededor del tracto de inyección, caracterizada por un incremento en los astrocitos reactivos (flecha). **(C)** Inmunorreactividad frente al GFAP en un animal inyectado con LPS. La flecha muestra el lugar de inyección de $2 \mu\text{g}$ de LPS. El trazador inerte es claramente visible dentro del área carente de tinción GFAP. La expresión de GFAP es más intensa alrededor del área carente de inmunorreactividad. **(D)** Alta magnificación del recuadro marcado en la fotografía C. El área dañada contiene restos GFAP-positivos derivados de astrocitos degenerados e hipertróficos (flechas). Barra de escala: fotografías A y C, $500 \mu\text{m}$; fotografías B y D, $50 \mu\text{m}$.

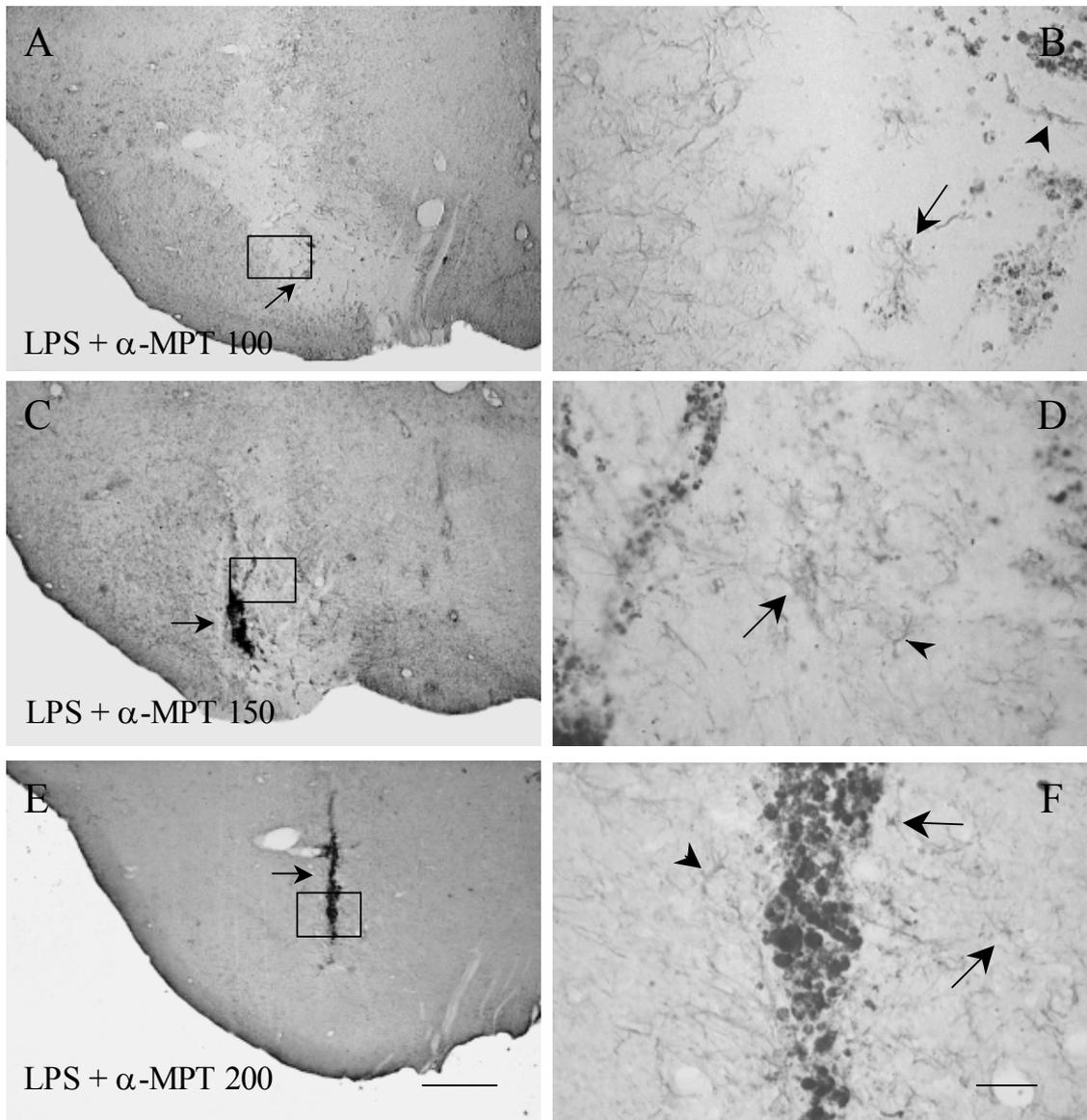
4.3. Efecto del tratamiento con LPS y α -MPT.

El tratamiento con α -MPT (Fig. 26) redujo significativamente la pérdida de inmunorreactividad de GFAP de una manera dependiente de la dosis. El tratamiento con la dosis de 100 mg/kg (Fig. 26A) no produjo un efecto protector frente a la pérdida de tinción GFAP, siendo el área de pérdida de $1.41 \pm 0.32 \text{ mm}^2$ (Fig. 29). Además el área dañada contenía restos GFAP-positivos procedentes de astrocitos degenerados e hipertróficos (Fig. 26B).

Los tratamientos de 150 y 200 mg/kg ejercieron un efecto protector frente a la pérdida de la población astrocitaria (Fig. 26C, E). El área de pérdida de GFAP fue de $0.82 \pm 0.14 \text{ mm}^2$ y $0.17 \pm 0.07 \text{ mm}^2$ para 150 y 200 mg/kg de α -MPT respectivamente (Fig. 29 para la significación estadística), y además previno la formación de restos GFAP-positivos derivados de astrocitos hipertróficos y degenerados que fueron inducidos por el LPS (Fig. 26D, F). La reacción astrocitaria alrededor del tracto de inyección fue mayor que la mostrada en animales tratados con salino, aunque no hubo restos degenerados.

Al igual que lo observado para la población neuronal TH-positiva, la pérdida de inmunorreactividad de GFAP también se redujo en el grupo de animales tratados con 200 mg/kg de α -MPT y mantenidos a 33 °C ($0.42 \pm 0.24 \text{ mm}^2$, $p < 0.001$ comparado con el grupo tratado con LPS; Fig. 29), mostrando de nuevo que la protección ejercida por la α -MPT no es debida a su efecto hipotérmico.

Fig. 26. Efecto sobre la población astrocitaria del tratamiento con distintas dosis de α -MPT y LPS. **(A)** Animal tratado con 100 mg/kg de α -MPT y LPS. La flecha muestra el sitio de inyección. **(B)** Alta magnificación del recuadro marcado en la fotografía A. El área dañada contiene restos GFAP-positivos (flechas). **(C)** Animal tratado con 150 mg/kg de α -MPT y LPS. La flecha muestra el sitio de inyección de 2 μ g de LPS. El área carente de inmunotinción de GFAP es claramente inferior a la observada en la fotografía A. **(D)** Alta magnificación correspondiente al recuadro de la fotografía C. Se pueden observar algunas estructuras GFAP-positivas hipertróficas (flecha) y normales (cabeza de flecha). **(E)** Animal tratado con 200 mg/kg de α -MPT y LPS. La flecha muestra el sitio de inyección. El área carente de inmunorreactividad es muy reducida en comparación con la observada en la fotografía A. **(F)** Alta magnificación del recuadro marcado en la fotografía E. Los perfiles GFAP-positivos se asemejan a astrocitos normales (cabeza de flecha) y también se pueden observar algunos astrocitos hipertróficos (flecha). Barra de escala: fotografías A, C y E, 500 μ m; fotografías B, D y F, 50 μ m.



4.4. Efecto del tratamiento con LPS, α -MPT y L-DOPA/benserazida.

Al igual que ocurría en el caso de la población neuronal TH-positiva, cuando la inhibición de la enzima TH fue soslayada con el tratamiento con L-DOPA + Benserazida (Fig. 27A), la pérdida de inmunorreactividad de GFAP ($1.21 \pm 0.09 \text{ mm}^2$; Fig. 29) se asemejó a la encontrada en el grupo tratado sólo con LPS, sugiriendo que la dopamina estaría involucrada en el daño producido por el LPS. Al igual que en el grupo tratado sólo con LPS en el lugar de la lesión aparecen algunos astrocitos hipertróficos (Fig. 27B).

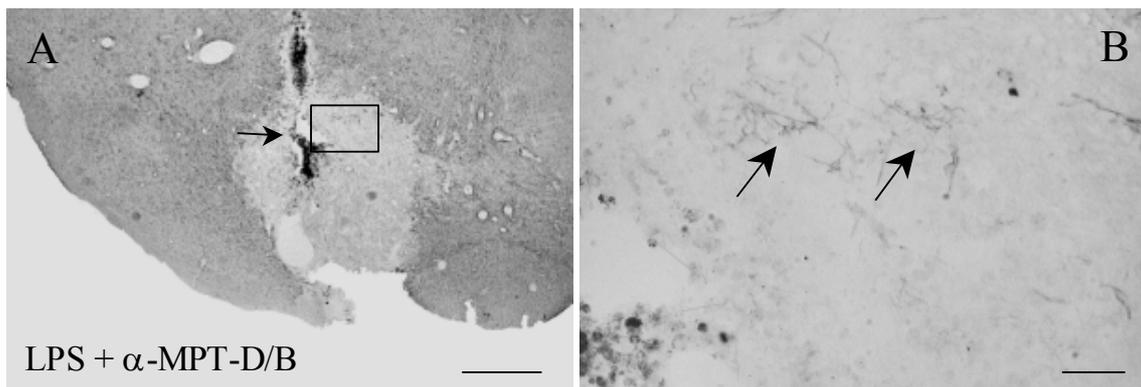


Fig. 27. Efecto sobre la población astrocítica del tratamiento con LPS, α -MPT y L-DOPA/Benserazida. **(A)** Inmunorreactividad de GFAP en un animal tratado con LPS- α -MPT-B/D. La flecha muestra el sitio de inyección de 2 μg de LPS. El área carente de tinción es similar a la observada en animales tratados con LPS. **(B)** Alta magnificación correspondiente al recuadro marcado en la fotografía A. Se pueden observar algunos perfiles GFAP-positivos hipertróficos (flechas). Barra de escala: fotografía A, 500 μm ; fotografía B, 50 μm .

4.5. Efecto del tratamiento con LPS y sulpiride.

El tratamiento con 80 mg/kg del antagonista D2 sulpiride (Fig. 28A) consiguió reducir el área de pérdida de tinción GFAP hasta $0.48 \pm 0.1 \text{ mm}^2$; $p < 0,001$ comparado con el grupo inyectado con vehículo (Fig. 29), sugiriendo así una posible implicación de la dopamina a través de los receptores D2 en el daño inducido por el LPS sobre las población astrocítica.

4.6. Efecto del tratamiento con LPS y ácido kinurénico.

La coinyección de 2 μg de LPS y 30 nmoles del antagonista de glutamato ácido kinurénico (Fig. 28B) produjo una disminución en el área de pérdida de inmunorreactividad frente al GFAP en comparación con el grupo de LPS (0.67 ± 0.12 , $p < 0,001$ comparado con el grupo inyectado con vehículo; Fig. 29).

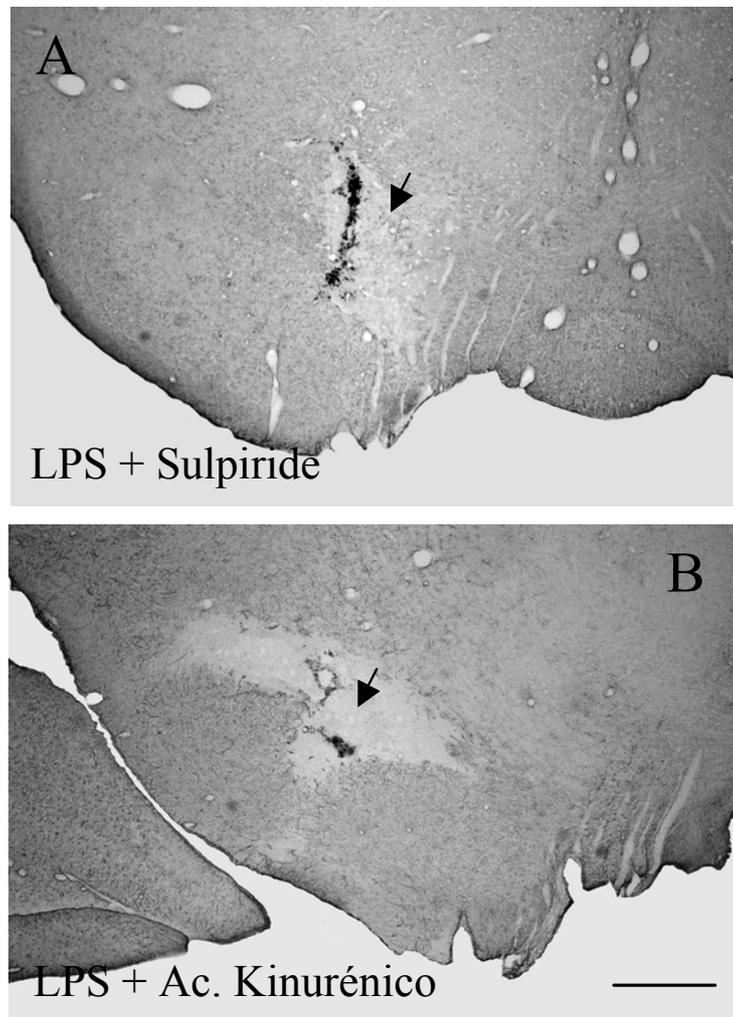


Fig. 28. Efecto sobre la población astrocitaria del tratamiento con LPS y Sulpiride/Ácido kinurénico. **(A)** Inmunorreactividad de GFAP en un animal tratado con LPS y 80 mg/kg de sulpiride. La flecha muestra el sitio de inyección de 2 μ g de LPS. Se puede observar un área carente de tinción GFAP alrededor del tracto de inyección. Sin embargo esta área resulta menor que la mostrada en animales tratados sólo con LPS. **(B)** Inmunorreactividad de GFAP en un animal coinyectado con LPS y ácido kinurénico. La flecha muestra el sitio de inyección de 2 μ g de LPS y 30 nmoles de ácido kinurénico. De nuevo puede observarse una zona carente de tinción GFAP alrededor del tracto de inyección.

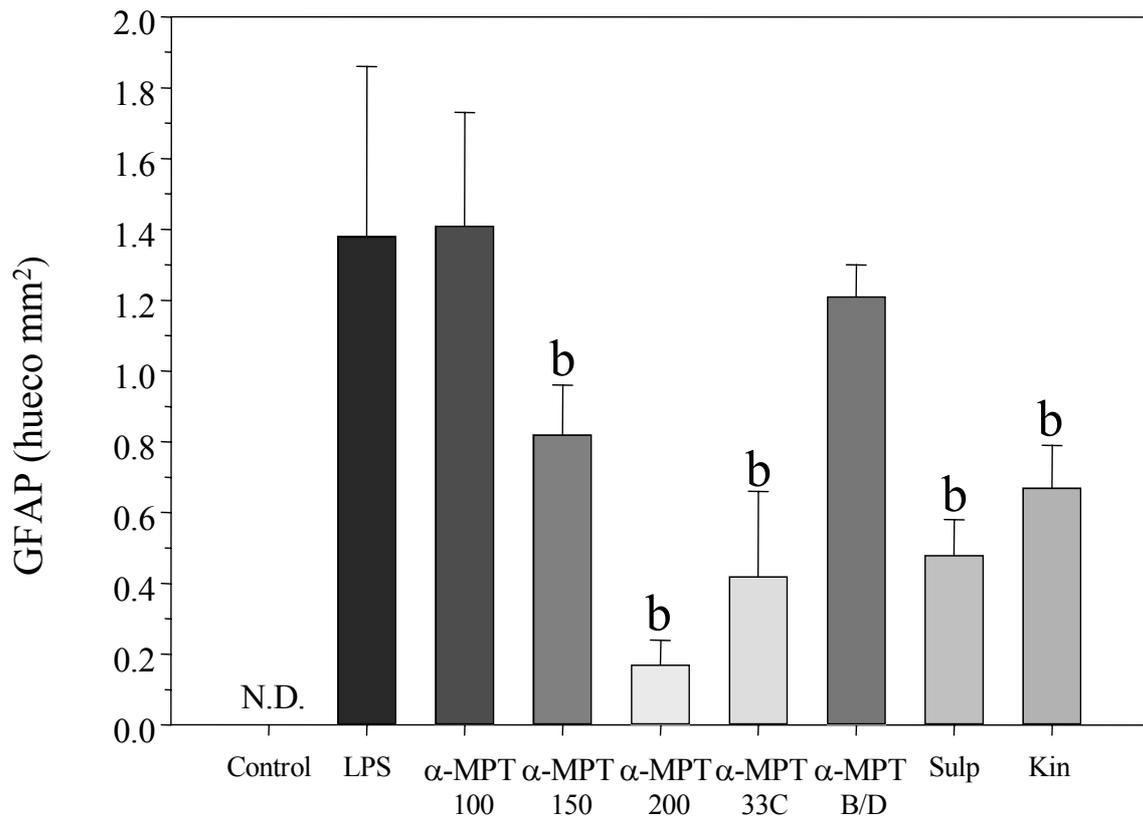


Fig. 29. Cuantificación de las áreas carentes de tinción GFAP tras los distintos tratamientos. Cuantificación de las áreas carentes de tinción GFAP en la SN de ratas tras los tratamientos mostrados en la figura 14. Los resultados se expresaron como medias \pm DE de al menos 5 experimentos independientes y se expresaron en mm². Significación estadística. ANOVA de una vía seguido de un test LSD para comparaciones múltiples. $\alpha=0.05$. Todos los grupos son diferentes al inyectado con vehículo; b, comparado con el grupo inyectado con LPS; $p<0.001$. N.D.: No detectable, queriendo decir que la inyección de salino no produce pérdida en la tinción de GFAP.

Con el fin de estudiar el efecto de los distintos tratamientos sobre la activación de la microglía inducida por el LPS se realizaron técnicas de inmunocitoquímica de OX-6. El OX-6 es un anticuerpo directamente contra un determinante monomórfico del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II de la rata, expresado por la microglía reactiva pero no por la microglía residente. De esta manera podemos visualizar células “activadas”, caracterizadas por procesos más gruesos y cuerpos celulares mayores a los de células de cerebros controles, así como microglía fagocítica, con una morfología de pseudopódica a globular, y en su mayoría carentes de procesos que recuerdan a células cargadas de lípidos. En nuestro sistema un incremento en la expresión de OX-6 es un marcador de muerte celular causado por neurotoxinas. Por el contrario se considera neuroprotección cuando aparece una disminución en la expresión de OX-6.

5.1. Efecto de la inyección de vehículo.

La inyección de 2 μ l de vehículo en la SN izquierda no produjo activación microglial fuera del tracto de inyección, donde aparece algún daño mecánico e inespecífico (no mostrado).

5.2. Efecto de la inyección de LPS.

La inyección de 2 μ g de LPS en la SN izquierda (Fig. 30A) produjo una activación microglial a lo largo de una extensa área fuera del tracto de inyección, y produjo un incremento en el número de células OX-6-positivas de 15 veces el control con vehículo (2983 ± 756 y 194 ± 18 células por mm^2 ,

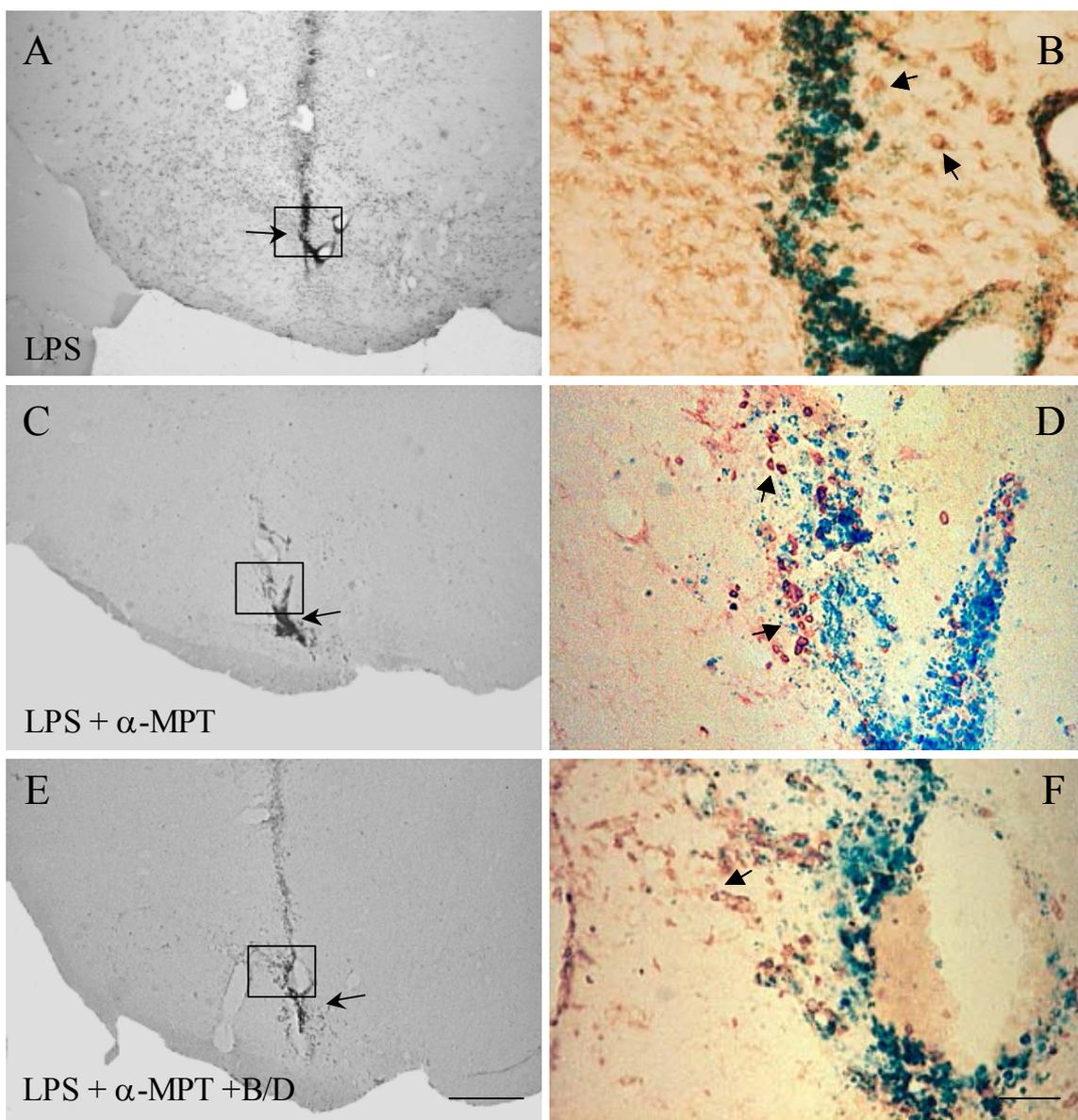
$p < 0.001$ para los animales inyectados con LPS y vehículo respectivamente; Fig. 33 para la significación estadística). La microglía fagocítica se agrupó densamente alrededor del tracto de inyección y quedó ocultada por el trazador inerte. Fuera del tracto la morfología predominante fue la de microglía activada (Fig. 30B), aunque también pueden observarse algunas células fagocíticas.

5.3. Efecto del tratamiento con LPS y α -MPT.

El tratamiento con α -MPT (Fig. 30C y 31) redujo claramente la activación glial alrededor del sitio de inyección de una manera que fue dependiente de la dosis. La microglía activada y fagocítica quedó restringida en su mayoría al tracto de inyección y quedó ocultada por el trazador inerte (Fig. 30D), mientras que el resto de la sección quedó libre de células activadas.; la densidad de microglía OX-6-positiva se redujo a 807 ± 176 , 309 ± 23 y 358 ± 109 células por mm^2 tras los tratamientos con 100, 150 y 200 mg/kg de α -MPT respectivamente (Fig. 33; $p < 0.001$ comparado con los animales tratados sólo con LPS).

La activación microglial en el grupo de animales tratados con 200 mg/kg de α -MPT y mantenidos a 33 °C fue mayor a la encontrada en los grupos de α -MPT, pero aún bastante más pequeña que la encontrada en el grupo tratado sólo con LPS (Fig. 33), sugiriendo así que la hipotermia causada por la disminución en las catecolaminas no es la responsable de la disminución de la activación de la microglía causada por la dosis de 200 mg/kg de α -MPT.

Fig. 30. Efecto sobre la inmunorreactividad de OX-6 en la SN de ratas tras los distintos tratamientos. **(A)** Inmunorreactividad de OX-6 en un animal inyectado con LPS. La flecha muestra el sitio de inyección de 2 μ g de LPS. La reacción glial es fuerte y ampliamente distribuida a lo largo de toda la sección. **(B)** Alta magnificación correspondiente al recuadro marcado en la fotografía A. La microglía activada cubre todo el campo. La microglía fagocítica queda oculta tras el trazador, pero algunas son visibles (flechas). **(C)** Inmunorreactividad de OX-6 en un animal tratado con LPS y 150 mg/kg de α -MPT. La flecha muestra el sitio de inyección de 2 μ g de LPS. La reacción glial es fuerte en el sitio de inyección, pero el área que muestra una intensa inmunorreactividad parece restringida fundamentalmente al tracto de inyección. **(D)** Alta magnificación correspondiente al recuadro marcado en la fotografía C. La microglía fagocítica (flechas) queda restringida al tracto de inyección. La microglía reactiva queda ausente en todo el campo. **(E)** Inmunorreactividad de OX-6 en un animal tratado con LPS, 200 mg/kg de α -MPT y L-DOPA/benserazida. La flecha muestra el sitio de inyección de 2 μ g de LPS. La reacción glial es intensa en el sitio de inyección, pero el área que muestra una intensa inmunorreactividad parece quedar restringida a un área cercana al tracto de inyección. **(F)** Alta magnificación correspondiente al recuadro marcado en la fotografía E. La microglía fagocítica (flecha) queda restringida al tracto de inyección. La microglía reactiva estuvo ausente a lo largo de todo el campo. Barras de escala: fotografías A, C y E, 500 μ m; fotografías B, D y F, 50 μ m.



LPS + α -MPT

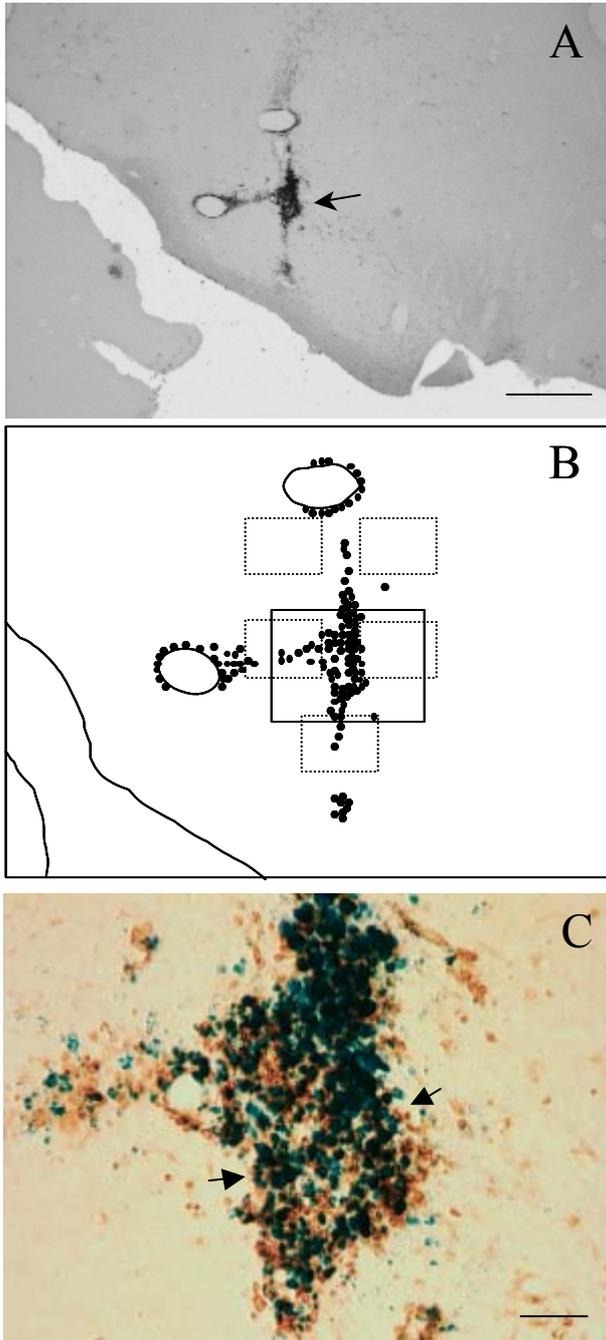


Fig. 31. Diagrama explicativo del método de recuento de la células OX-6-positivas.

(A) Inmunorreactividad de OX-6 en un animal tratado con LPS y 200 mg/kg de α -MPT. La flecha muestra el sitio de inyección de 2 μ g de LPS. La reacción glial es fuerte en el sitio de inyección pero el área con una fuerte inmunorreactividad parece restringida fundamentalmente al tracto de inyección.

(B) Diagrama representativo del sitio de inyección mostrado en la fotografía A. Los puntos representan el trazador inerte. Los recuadros de líneas punteadas representan los campos donde se realizó la cuantificación de la microglía.

(C) Alta magnificación correspondiente al recuadro de líneas sólidas en la fotografía B. La microglía fagocítica (flechas) quedó restringida al tracto de inyección, mientras que la microglía reactiva estuvo ausente de todo el campo. Barras de escala: fotografía A, 500 μ m; fotografía C, 50 μ m.

5.3. Efecto del tratamiento con LPS, α -MPT y L-DOPA/benserazida.

Cuando se evitó la inhibición de la TH por la α -MPT a través del tratamiento con L-DOPA y benserazida (Fig. 30E) la activación microglial resultó ser más similar a los valores encontrados en los grupos con α -MPT que a los encontrados en el grupo con LPS (557 ± 155 células por mm^2 ; Fig. 33).

5.4. Efecto del tratamiento con LPS y sulpiride.

El tratamiento con LPS y 80 mg/kg del antagonista D2 sulpiride (Fig. 32A) resultó en una disminución de la densidad de expresión de microglía activada hasta 1282 ± 204 células por mm^2 ; $p < 0.001$ comparado con el grupo inyectado con vehículo; Fig. 33 para significación estadística).

5.5 Efecto del tratamiento con LPS y ácido kinurénico.

La coinyección de 2 μg de LPS y 30 nmoles del antagonista de glutamato ácido kinurénico (Fig. 32B) produjo una disminución en la densidad de expresión de células OX-6-positivas en comparación con el grupo de LPS (1044 ± 270 , $p < 0,001$ comparado con el grupo inyectado con vehículo; Fig. 33 para significación estadística).

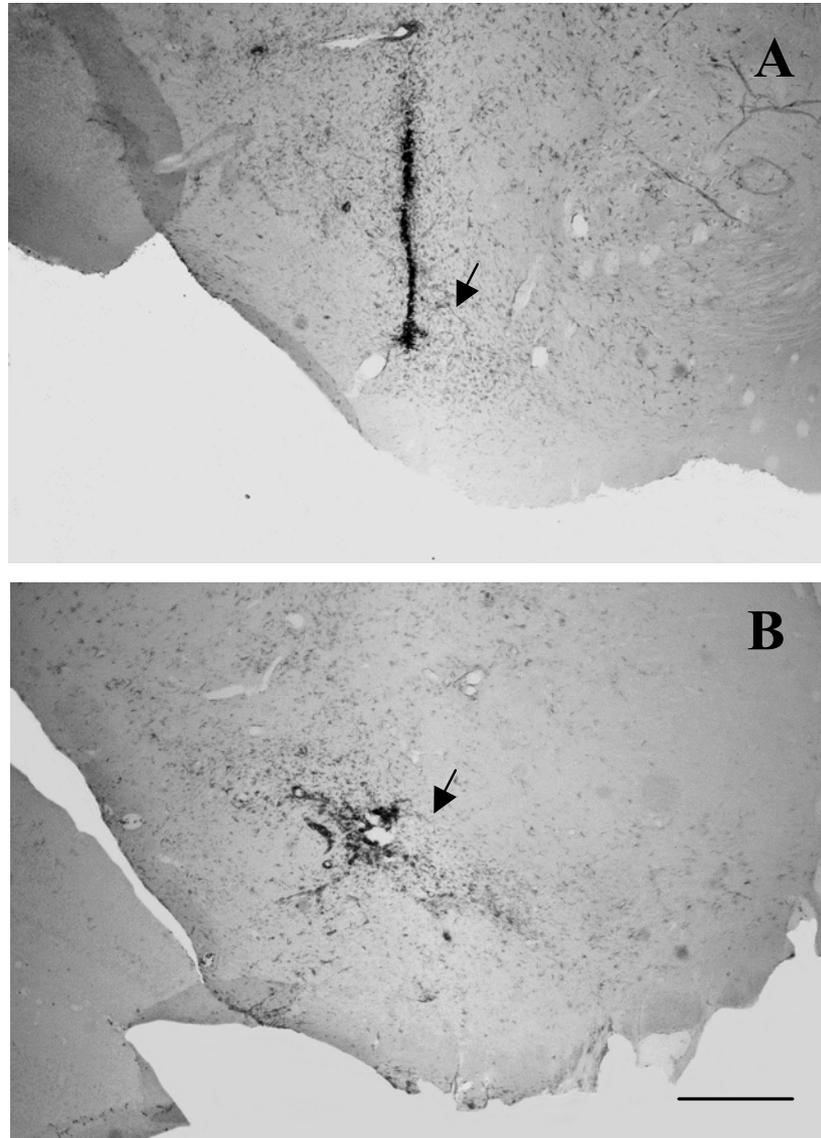


Fig. 32. Efecto sobre la inmunoreactividad de OX-6 de animales tratados con LPS y Sulpiride/Ac. kinurénico. **(A)** Inmunoreactividad de OX-6 en un animal tratado con LPS y sulpiride. La flecha muestra el sitio de inyección de 2 μ g de LPS. La reacción glial es intensa a lo largo de un amplio campo dentro de la sección. **(B)** Inmunoreactividad de OX-6 en un animal tratado con LPS y ácido kinurénico. La flecha muestra el sitio de inyección de con 2 μ g de LPS y 30 nmoles de ácido kinurénico. Las células OX-6-positivas se agrupan cerca del tracto de inyección aunque también ocupan un amplio campo dentro de la sección. Barra de escala: 500 μ m.

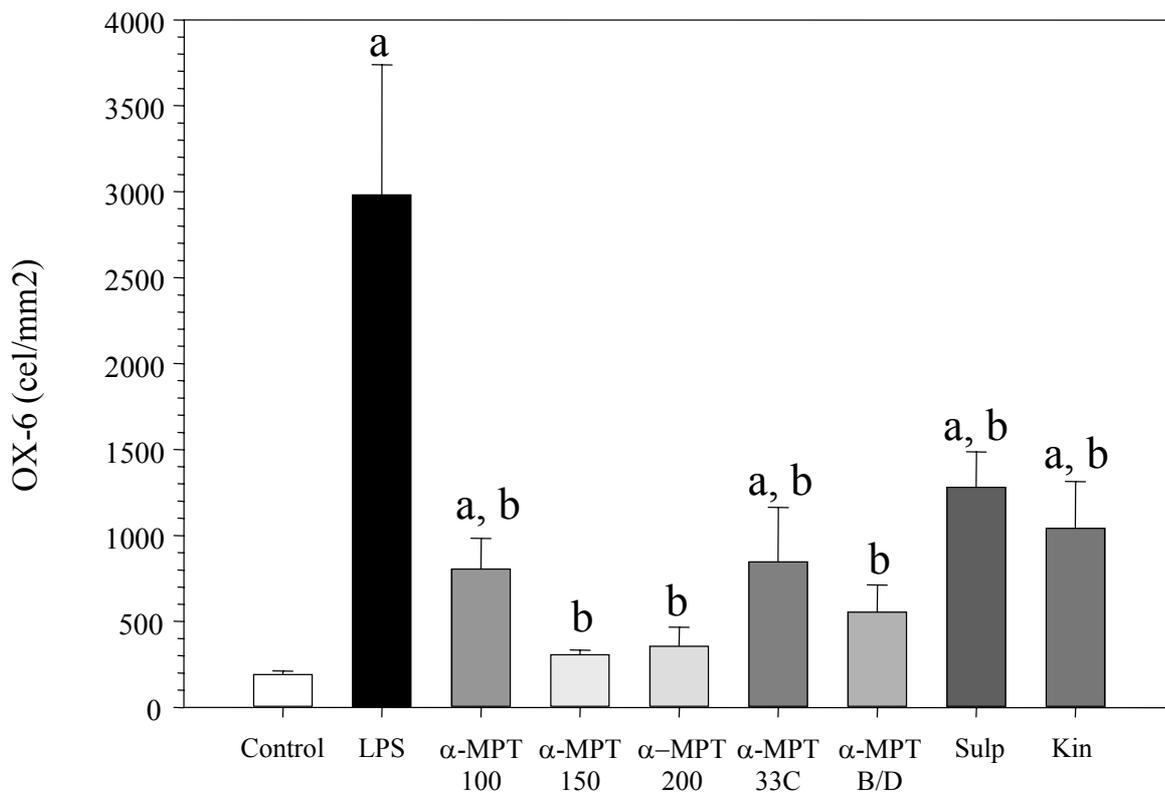


Fig. 33. Cuantificación del número de células OX-6-positivas tras los distintos tratamientos. Cuantificación de las células OX-6-positivas tras los tratamientos mostrados en la figura 14. Los resultados se muestran como medias \pm DE de al menos 5 experimentos independientes y se expresaron como células por mm². Significación estadística. ANOVA de una vía seguido de un test LSD para comparaciones múltiples. $\alpha=0.05$. a, comparado con el grupo inyectado con vehículo; b, comparado con el grupo inyectado con LPS; $p<0.001$.

6. EFECTO DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BDNF.

Para comprobar el efecto que tenían los distintos tratamientos en la expresión de factores de crecimiento se realizaron técnicas de hibridación *in situ* del ARNm de BDNF. Los factores neurotróficos como el BDNF son péptidos de secreción que actúan como factores de crecimiento durante el desarrollo fenotípico y contribuyen al mantenimiento de las poblaciones neuronales específicas en el SNC, tanto en el estado adulto como durante el desarrollo. Estas proteínas pueden actuar a través de una vía de señalización retrógrada a partir de neuronas diana, o por mecanismos paracrinós o autocrinos, controlando así numerosos aspectos relacionados con la estructura neuronal y glial (Siegel y Chauchan, 2000). Existe un gran número de trabajos que estudian cambios en la expresión de BDNF mediante el uso de modelos de enfermedades del movimiento, como la EP. De hecho, varios autores han demostrado que las células microgliales pueden expresar factores neurotróficos tras diferentes tipos de daño (Elkabes y col., 1996; Miwa y col., 1997)

6.1. Efecto de la inyección de LPS.

La inyección de 2 µg de LPS en la SN izquierda de las ratas (Fig. 34A, B) alteró el patrón normal de expresión del ARNm de BDNF produciéndose un incremento en el número de células que expresaron este factor neurotrófico (58 ± 35 células por sección; Fig. 35).

6.2. Efecto del tratamiento con LPS y α -MPT.

Cuando los niveles de dopamina endógena se disminuyeron a través del tratamiento con 150 mg/kg de α -MPT (Fig. 34C, D), se produjo un incremento significativo en la expresión del ARNm de BDNF en la SN de las ratas inyectadas con LPS (98 ± 38 células por sección; $p < 0.001$; Fig. 35).

6.3. Efecto del tratamiento con LPS, α -MPT y L-DOPA/Benserazida.

Cuando la inhibición de la TH fue soslayada por el tratamiento con L-DOPA/benserazida (Fig. 34E, F) los niveles de expresión del ARNm de BDNF se mantuvieron algo superiores a los mostrados en el grupo de LPS sólo, aunque esta diferencia no llegó a ser significativa (84 ± 57 células por sección; Fig. 35).

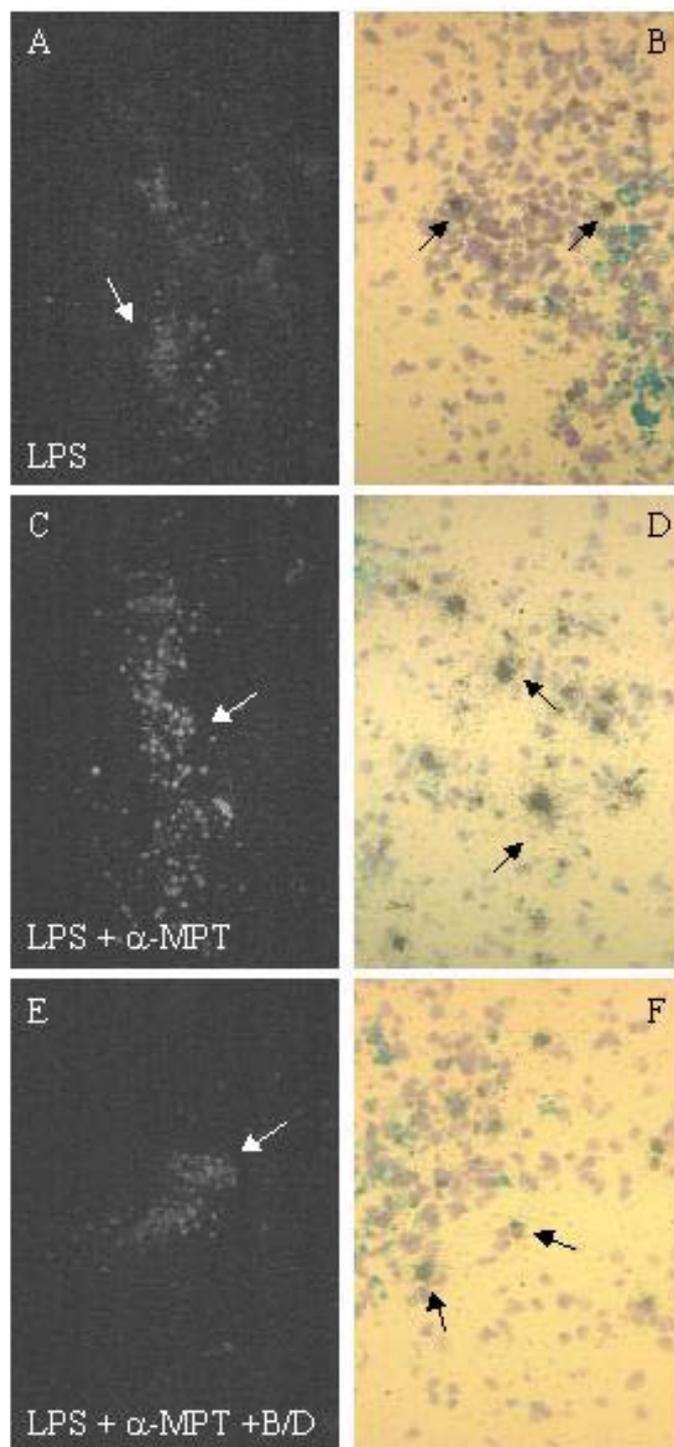


Fig. 34. Hibridación *in situ* del ARNm del BDNF en la SN tras los distintos tratamientos. **(A)** Animales inyectados con LPS. La flecha muestra el sitio de inyección. **(B)** Alta magnificación de fotografías en campo claro del área marcada con la flecha blanca en la fotografía A, mostrando la expresión del ARNm del BDNF. El área dañada contiene células supervivientes que expresan ARNm de BDNF (flechas) con un descenso en los niveles de expresión. **(C)** Animales inyectados con LPS y tratados con 150 mg/kg de α -MPT. La flecha muestra el sitio de inyección. **(D)** Alta magnificación del área marcada con flecha en la fotografía C. **(E)** Animales inyectados con LPS y tratados con α -MPT/L-DOPA/benserazida. La flecha muestra el sitio de inyección. La cantidad de células que expresan ARNm de BDNF se asemejan a los animales inyectados con LPS. **(F)** Alta magnificación del área marcada con flecha en la fotografía E. Barras de escala: fotografías A, C y E, 250 μ m; fotografías B, D y F, 25 μ m.

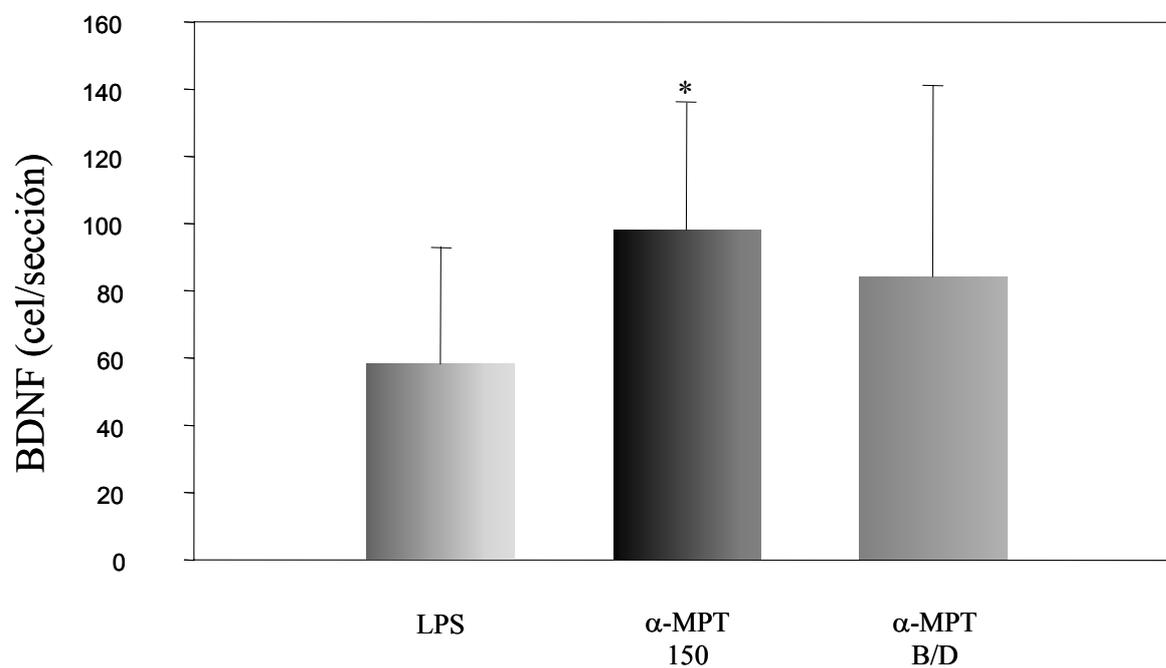


Fig. 35. Cuantificación de la expresión del ARNm de BDNF tras los distintos tratamientos. Los resultados se muestran como medias \pm DE de al menos 5 experimentos independientes y se expresaron como células por sección. Significación estadística. ANOVA de una vía seguido de un test LSD para comparaciones múltiples. $\alpha=0.05$. $p<0.001$.

DISCUSIÓN

El modelo de degeneración del sistema dopaminérgico desarrollado por nuestro grupo, mediante la inyección en distintas estructuras del cerebro del proinflamatorio LPS, ha demostrado la especial vulnerabilidad de los cuerpos neuronales dopaminérgicos de la sustancia negra. Este hecho ha sido justificado por la especial sensibilidad a la inducción de los procesos inflamatorios de esta estructura. Cuando se inyecta LPS en la sustancia negra se produce una fuerte respuesta inflamatoria, significativamente mayor a la producida en las demás estructuras estudiadas, en las que la inyección de LPS no produce daño o produce una respuesta inflamatoria muy pequeña. Esta especial sensibilidad se justifica por el hecho de que la SN contiene la mayor densidad de células microgliales del SNC (Lawson y col., 1990). En estas condiciones, el LPS producía la activación de la microglía con la consiguiente inflamación y producción de distintos compuestos inflamatorios como el TNF- α , las interleukinas o los RLO. Finalmente esto llevaría a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. Este hecho explicaría la especial sensibilidad a la inflamación de la SN. Sin embargo, teniendo en cuenta la coexistencia de distintos tipos de neuronas en esta estructura, la mayor densidad de microglía en la SN no sería suficiente para explicar la especial vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas. Esto obliga a pensar que estas neuronas deben tener una característica especial que justifique dicho comportamiento. Entre las posibles características que pudieran justificar este hecho podríamos considerar la menor capacidad de protección frente al estrés oxidativo inducido por los radicales libres de la SN (Jenner, 1998) y/o las altas concentraciones endógenas de dopamina en dicha estructura.

Es conocida la capacidad neurotóxica de la dopamina así como el que se encuentre implicada en la producción/formación de radicales libres, tanto a nivel de su proceso degradativo a través de la enzima MAO, como en su proceso de autooxidación con la formación de aldehídos y quinonas (Graham y col., 1978; Dexter y col., 1989; Gotz y col., 1994).

Nosotros nos hemos decantado por el estudio de la posible implicación de la dopamina en la sensibilidad a la inflamación inducida por la inyección intranigral de LPS de los cuerpos neuronales, estudiando la influencia de la DA en los procesos de degeneración inducidos por la inyección del LPS en la SN. Para dicho estudio hemos reducido la síntesis de la DA mediante la inhibición de la enzima TH a través de la α -MPT.

1. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA TH A TRAVÉS DE LA α -MPT EN LAS CARACTERÍSTICAS INFLAMATORIAS INDUCIDAS POR LA INYECCIÓN INTRANIGRAL DEL LPS.

En nuestro trabajo reproducimos, en primer lugar, el proceso inflamatorio mediante la inyección del LPS en la SN de las ratas. Este efecto se mostró a través del estudio de una serie de parámetros de daño celular, tales como la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, la inducción de microglía reactiva, la pérdida de astrocitos y la producción de factores neurotróficos. La inyección de 2 μ g de LPS en la SN de la rata produjo una pérdida significativa en el número de cuerpos celulares TH-positivos y alteró claramente el patrón de tinción tanto para los cuerpos celulares como para las fibras. Las técnicas

de hibridación in situ revelaron que las neuronas supervivientes alrededor del sitio de inyección mostraban un patrón de expresión de ARNm de TH y DAT claramente alterado tras la inyección de LPS. Además la inyección intranigral de LPS fue capaz de inducir un proceso inflamatorio caracterizado por la activación de la microglía (con cambio morfológico que acaba volviéndose fagocítico) y también la pérdida de astrocitos acompañado con la formación de restos GFAP-positivos derivados de astrocitos degenerados e hipertróficos. Estos son efectos idénticos a los descritos en estudios previos en nuestro laboratorio (Castaño y col., 1998; Herrera y col., 2000). Por último, en nuestro estudio la inyección de LPS produjo la expresión de BDNF en la SN y alrededor del tracto de inyección.

Puesto que la TH es la enzima limitante en la síntesis de DA, su inhibición resulta ser una buena herramienta para los estudios sobre la importancia de la DA en el sistema nervioso central. En 1964 Nagatsu y col. consiguieron aislar la TH del cerebro y tejido nervioso simpático, y demostraron que existen distintos compuestos, incluidos análogos de la tirosina, que resultan ser potentes inhibidores de la enzima TH in vitro. Entre ellos se encuentra la α -MPT, un inhibidor competitivo de la tirosina hidroxilasa con un índice de inhibición de algo más de 1.0, es decir, un 50% de inhibición cuando el sustrato y el inhibidor se encuentran en igual concentración (Nagatsu y col., 1964). Puesto que las concentraciones normales de tirosina en suero son de alrededor de 5×10^{-5} M, se decidió administrar el inhibidor en suficiente cantidad para mantener una concentración in vivo superior a 10^{-4} . Una vez administrada la droga, ésta se mantiene varias horas a concentraciones

suficientes para inhibir a la enzima. Tratamientos previos con α -MPT han demostrado disminuir el contenido de DA hasta un 79% (White y col., 1988). Nuestros resultados mostraron que la α -MPT previene de manera dependiente de la dosis la pérdida de neuronas dopaminérgicas inducida por el LPS (medido como número de neuronas TH-positivas que sobreviven tras el daño inducido por el LPS, y también como la expresión del ARNm de la TH y el transportador de dopamina). Además, es importante resaltar que la inyección intranigral del LPS en los animales tratados con α -MPT también fue incapaz de inducir un proceso inflamatorio (activación de la microglía caracterizada por un cambio morfológico) y también la pérdida de astrocitos. Por último, el tratamiento con α -MPT produjo un aumento significativo en la expresión de BDNF.

Los efectos neuroprotectores de algunas drogas parecen estar más relacionadas con su influencia sobre la termorregulación que con sus efectos farmacológicos primarios (Bowyer y col., 1992; Bowyer y col., 1993; Bowyer y col., 1994; Miller y O'Callaghan, 1994; Albers y col., 1995; Ali y col., 1996; Yuan y col., 2001). Así, se sabe que la metanfetamina produce un efecto tóxico en las terminales nerviosas dopaminérgicas que parece estar, al menos en parte, relacionado con su capacidad para producir hipertermia. Este efecto dañino se puede reducir a través de la manipulación farmacológica con drogas que atenúen esta hipertermia, tales como antagonistas de receptores de DA, fenfluramina, dizolcipina, fenitoina, ácido aminooxiacético, propranolol o la α -MPT, o bien disminuyendo la temperatura ambiente. Se sabe que los agentes causantes de una disminución en los niveles de catecolaminas, como la α -MPT

producen hipotermia. Este efecto hipotérmico podría ejercer una neuroprotección no específica frente a los efectos inducidos por la microinfusión de LPS. Sin embargo, los efectos neuroprotectores de esta droga observados en nuestro estudio parecen ser el resultado de la disminución de la síntesis de DA endógena debida a la inhibición de la TH, más bien que a su efecto hipotérmico. Esta aseveración se basa en diversos factores:

- a) La concentración de 150 mg/kg de α -MPT no produjo diferencias significativas en la temperatura corporal y sin embargo, mostró un efecto neuroprotector en todos los parámetros estudiados.
- b) Se llevaron a cabo dos conjuntos de experimentos a una dosis de 200 mg/kg de α -MPT: uno de ellos a temperatura ambiente (22 °C) y otro aumentando la temperatura ambiente desde 22 °C hasta 33 °C con el fin de mantener la temperatura corporal de los animales dentro de sus valores normales. Ambos grupos de animales no mostraron ninguna diferencia en los resultados, especialmente en lo que se refiere a la protección de las neuronas dopaminérgicas.
- c) La respuesta de la SN frente a la inyección de LPS tras la inhibición de la TH fue similar a la descrita para otras áreas cerebrales como el estriado o el rafe, donde el LPS tuvo muy poco o ningún efecto en la degeneración neuronal y los procesos inflamatorios (Herrera y col., 2000).

Estos resultados parecen indicar fuertemente que la dopamina endógena estaría implicada en la especial sensibilidad demostrada por las neuronas dopaminérgicas a la degeneración inducida por la inyección

intranigral de LPS, así como la sensibilidad de la sustancia negra al proceso de inflamación ya que este es también inhibido cuando se inhibe la enzima TH.

2. EFECTO DE LA RESTAURACIÓN DE LOS NIVELES DE DA, DISMINUIDOS POR EL TRATAMIENTO CON α -MPT, MEDIANTE EL TRATAMIENTO SIMULTANEO CON L-DOPA/BENSERAZIDA SOBRE LA ACCIÓN DE LA INYECCIÓN INTRANIGRAL DEL LPS.

Con el fin de demostrar de una forma más segura la implicación de la DA en el proceso degenerativo inducido por la inyección intranigral de LPS y en especial para disipar dudas sobre algún posible efecto indirecto del tratamiento con α -MPT se llevaron a cabo experimentos en los que se restauró la producción de DA, sin desinhibir la TH, mediante el tratamiento con L-DOPA/benzarezida.

Se sabe que el tratamiento con 25 mg/kg de L-DOPA y 10 mg/kg de benserazida incrementa los niveles extracelulares de DA en la sustancia negra aproximadamente en 4 veces los valores basales, producidos a través de la actuación de la enzima L-DOPA descarboxilasa (Jonkers y col., 2000). Por tanto, este tratamiento sobrepasa la inhibición de la TH producida por la α -MPT (200 mg/kg).

El tratamiento con L-DOPA y benserazida recupera el efecto degenerativo inducido por el LPS en las neuronas dopaminérgicas y también la pérdida de astrocitos medido como inmunotinción de GFAP, aunque no produce la activación de la microglía. En cuanto al BDNF, el tratamiento con L-

DOPA/benserazida produjo niveles de expresión de BDNF semejantes a los producidos por el LPS.

Este resultado corrobora la implicación de la DA en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas inducida por la inyección intranigral de LPS así como en la pérdida de los astrocitos producida en estas mismas condiciones. Sin embargo, el tratamiento con L-DOPA/benserazida no produjo la activación de la microglía, lo cual resulta bastante sorprendente. Sin embargo, recientemente Pawate y col. (2004) han puesto de manifiesto que la respuesta inflamatoria frente al LPS y al interferón- γ se encuentra bajo regulación redox y que es el peróxido de hidrógeno el RLO implicado en este proceso. Esto sugiere que en la SN, la DA (como uno de los principales productores de peróxido de hidrógeno) podría ejercer un efecto sinérgico con compuestos proinflamatorios como el LPS. La principal diferencia entre astrocitos y microglía en relación con la ruta de la DA podría ser que en las células microgliales no están descritas las enzimas dopamina descarboxilasa y monoamino oxidasa (MAO). Esto podría explicar por qué el tratamiento con LPS + α -MPT + L-DOPA/benserazida no es capaz de inducir la activación microglial ya que la microglía no sería capaz ni de sintetizar ni de catabolizar la DA a través de la MAO. Sin embargo, esto no explicaría por qué la DA sintetizada fisiológicamente es capaz de interactuar con el LPS para inducir la activación microglial. Esto significaría que la dopamina "fisiológica", en contraste con la sintetizada a partir de L-DOPA/benserazida, puede interactuar con el LPS de una manera especial para inducir la activación microglial.

3. EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS CON SULPIRIDE Y ÁCIDO KINURÉNICO.

Nuestro estudio demuestra la implicación de la DA endógena en la neurotoxicidad del LPS y su posible implicación en la inducción de la degeneración del sistema dopaminérgico. Sin embargo, estos datos no nos permiten suponer cual podría ser su mecanismo de actuación. Con el fin de profundizar en dicho mecanismo, se realizó un estudio sobre los efectos que sobre su acción pueden producir: el supiride, un antagonista del receptores de dopamina D2, y el ácido kinurenico, por su actuación a través de los mecanismos de excitotoxicidad del glutamato.

3.1. Tratamiento con sulpiride.

Puesto que la reducción en los niveles de DA endógena produjo un efecto protector frente a la inyección de LPS, y para comprobar si el mayor daño ejercido por la DA era debido a la acción de ésta sobre sus receptores, se decidió usar un antagonista de los receptores D2 de dopamina, el sulpiride.

Existen varios mecanismos por los que el uso de antagonistas D2 podría atenuar el daño originado por diversas toxinas. El bloqueo de los receptores de dopamina D2 atenúa el daño por excitotoxicidad producido en el estriado por agonistas del receptor NMDA en la misma medida que lo hace la depleción de dopamina por acción de la 6-OHDA (Garside y col., 1996). La activación de los agonistas D2 produce un incremento en la concentración de calcio intracelular que puede ser bloqueado reversiblemente a través de antagonistas D2

(Hernández-Lopez y col 2000), de manera que este incremento del calcio intracelular activa enzimas, como proteasas, fosfolipasas, quinasas o NO sintasa (Knowles y Moncada, 1994), produciendo la acumulación de ácido araquidónico, prostaglandinas, NO y varios radicales (Dumuis y col., 1988; Dugan y col., 1995; Troy y col., 1996) con la consiguiente destrucción de las membranas celulares y de receptores del citoesqueleto. Los agonistas D2 inducen la producción de radicales libres de NO en las neuronas que contienen somatostatina/neuropéptido Y/NOS (Garside y col., 1996), así como la liberación de ácido araquidónico dependiente de calcio (Felder y col., 1991; Kanterman y col., 1991; Piomelli y col., 1991) cuyos metabolitos son potentes inhibidores de la NA^+/K^+ ATPasa (McGiff, 1991; Schulz y col., 1995 a,b).

Por otro lado, los receptores D2 parecen estar implicados en la regulación de la actividad del transportador de dopamina (Meiergerd y col., 1993; Parsons y col., 1993; Rothblat y Schneider, 1997; Hoffman y col., 1999). Estudios *in vivo* muestran que los incrementos en la recaptación de la dopamina en el estriado inducida por la cocaína son atenuados por el tratamiento previo con un antagonista selectivo de los receptores D2 (Parsons *et al.*, 1993). Asimismo, la administración local de haloperidol reduce la recaptación de dopamina *in vivo* (Meiergerd y col., 1993; Rothblat y Schneider, 1997). El aclaramiento de la dopamina *in vivo* también decrece en el cuerpo estriado, núcleo accumbens y corteza prefrontal a través del raclopride (antagonista D2) pero no con el SCH-23390 (antagonista D1) (Cas y Gerhardt, 1994). Además, en las suspensiones estriatales, la activación de los receptores D2 incrementa la velocidad de recaptación de la dopamina, un efecto que se

bloquea con antagonistas selectivos de los receptores D2 (Meiergerd y col.,1993). Mayfield y Zahnised (2001) demostraron que tanto la actividad del DAT expresado en los oocitos de *Xenopus laevis* como la expresión de moléculas de DAT funcionales en la superficie celular se ven significativamente incrementados con la activación de los receptores D2.

Todos estos datos sugieren que el sulpiride, un antagonista D2, podría inhibir la actividad del DAT. Puesto que la recaptación de dopamina parece ser la principal fuente de radicales libres, el efecto tóxico de determinados compuestos podría prevenirse con la inhibición del sistema de recaptación de la dopamina a través de antagonistas D2.

Sin embargo, nuestros estudios muestran que si bien el sulpiride protege a las poblaciones astrogliales y microgliales de la inyección con el LPS, no es capaz de proteger a las neuronas dopaminérgicas de dicho daño. De nuevo, por tanto, la disminución en la activación de la microglía no parece ser el punto clave en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, debiendo haber algún otro mecanismo ejercido directamente por la DA endógena sobre las neuronas dopaminérgicas de la SN que las haga más susceptibles al daño con el LPS.

3.2. Tratamiento con ácido kinurénico.

Aunque el tratamiento con L-DOPA es el más usado en la actualidad, su uso crónico se complica debido a la aparición de fluctuaciones motoras. Por eso, la identificación de nuevas drogas que retarden la progresión del daño nigroestriado será un avance importante en el tratamiento de la EP,

especialmente si estas drogas pueden aliviar los síntomas motores (Lange y Riederer, 1994; Battaglia y col., 2004).

En condiciones normales, la descarga de aminoácidos excitatorios juega un papel central en la neurotransmisión. Sin embargo, la liberación de aminoácidos excitatorios, como el glutamato y el aspartato, bajo condiciones no fisiológicas puede inducir efectos dañinos en las células. Esto da lugar a la base de la hipótesis de la excitotoxicidad en la degeneración neuronal (Sian y col., 1999). Esta forma de toxicidad celular también parece mediada por la generación del radical hidroxilo (Gerlach y col., 1996). Así, se ha sugerido una asociación entre mecanismos excitotóxicos y un escenario de estrés oxidativo en los procesos que operan en la degeneración celular de la EP.

Así pues, se sabe que la alteración en la neurotransmisión glutamatérgica juega un papel central en la fisiopatología de la EP (Blandini y col., 1996). La reducida capacidad para hacer frente a las demandas metabólicas, posiblemente relacionada con el fallo en la función mitocondrial, podría hacer a la SN más vulnerable a los efectos del glutamato que, en presencia de un fallo energético en el metabolismo celular, actuaría como una neurotoxina. En este sentido, el glutamato podría participar en la patogénesis de la EP. Con la disminución en los niveles de DA nigroestriatal las proyecciones glutamatérgicas procedentes del núcleo subtalámico hacia los núcleos de los ganglios basales se vuelven más activas (DeLong y col., 1990; Greenamyre, 1993) y existen cambios en la regulación de los receptores de glutamato en estas regiones (Klockgether y Turski, 1993). Es posible que exista un mecanismo de retroalimentación positiva entre el glutamato y la DA en la

SN. La DA estimularía los receptores D1 en las terminales subtalomonigrales, lo que induciría la liberación de glutamato. El glutamato por su parte, incrementaría la liberación de DA a través de los receptores NMDA en los cuerpos celulares dopaminérgicos. El bloqueo de los receptores NMDA prevendría así la retroalimentación positiva y el incremento de la liberación nigral de DA (Blandini y col., 1996).

El uso de antagonistas de receptores de glutamato ha demostrado que los mecanismos de excitotoxicidad endógenos contribuyen al desarrollo del daño nigroestriado producido por algunas toxinas, como el MPTP (Turski y col., 1991; Kupsch y col., 1992; Michel y Agid, 1992; Sonsalla y col., 1992; Brouillet y Beal, 1993; Lange y col., 1993; Srivastava y col., 1993; Lange y Riederer, 1994; Loschmann y col., 1994; Ossowska y col., 1994; Vaglini y col., 1994; Kanthasamy y col., 1997; Sonsalla y col., 1998; Araki y col., 2001). También se sabe que el ácido kinurénico, un antagonista del receptor ionotrópico del glutamato, ejerce un efecto antiparkinsoniano cuando se administra intraestriatalmente en ratas lesionadas con 6-OHDA (Brotchie y col., 1991). Además, Miranda y col. (1997) han demostrado que altos niveles endógenos de ácido kinurénico protegen las neuronas dopaminérgicas de la parte compacta de la sustancia negra del daño excitotóxico mediado por el ácido quinolínico. Por su parte, Merino y col., (1999) demostraron que el efecto tóxico del MPP⁺ en las terminales dopaminérgicas no es mediado por la interacción directa con los receptores de glutamato de tipo NMDA, sino con los de AMPA-kainato.

Para comprobar si el glutamato y la excitotoxicidad estaban implicados en el daño producido por el LPS, se administraron 30 nmoles de ácido kinurénico junto con 2 µg LPS en la SN de las ratas. En estas condiciones, se produjo una clara disminución del daño originado sobre la población astrogliad con una disminución importante en la pérdida de astrocitos GFAP-positivos. Igualmente se encontró una disminución en el número de células OX-6-positivas, indicando un efecto protector sobre la activación de la microglía. Sin embargo, esta protección no se encontró en el caso de la población dopaminérgica, donde el número de neuronas se asemejó al de los animales tratados sólo con LPS. Por lo tanto el daño ejercido por el LPS en presencia de dopamina debe tener otro mecanismo de actuación independiente, al menos en parte, de la excitotoxicidad del glutamato.

4. LA DOPAMINA ENDÓGENA Y EL LPS PUEDEN EJERCER UN EFECTO SINÉRGICO EN LA DEGENERACIÓN NEURONAL.

Todos estos resultados demuestran que la DA está implicada en la especial sensibilidad de la SN frente al LPS. Varios estudios han investigado la razón de esta especial vulnerabilidad, de manera que la sensibilidad de esta estructura ha sido relacionada con el hecho de que contiene la mayor densidad de células microgliales del cerebro (Lawson y col., 1990) y consecuentemente una alta concentración de factores inflamatorios producidos por estas células, tales como el TNF- α y el NO. Gao y col. (2002b) demostraron que la activación de la microglía es el primer paso inducido por el LPS, de manera que dicha

activación ocurre sólo algunas horas después de la inyección de LPS, mientras que la pérdida de neuronas TH-positivas se observa al cabo de varios días. Esta relación temporal entre la activación microglial y la neurodegeneración sugiere que la neurodegeneración es producida por la inflamación (activación de la microglía). Las rutas de señalización del LPS a través de la membrana celular implica su unión a un complejo receptor que incluye al LPS, la proteína de unión al LPS, el CD14, y uno de los receptores de tipo Toll, lo que lleva a la localización nuclear del factor de transcripción nuclear NF κ B y la consiguiente activación de genes de factores proinflamatorios (Wright y col., 1990; Triantafilou y Triantafilou, 2002).

Esta idea también se apoya en el hecho de que varios compuestos antiinflamatorios protegen a las neuronas dopaminérgicas del daño inducido por el LPS. Entre ellos se encuentra la dexametasona (Castaño y col., 2002), un conocido antiinflamatorio glucocorticoide. La silimarina inhibe significativamente la activación microglial inducida por el LPS, la producción de mediadores inflamatorios, como el TNF- α y el NO, y reduce el daño sobre las neuronas dopaminérgicas (Wang y col., 2002). La naloxona inhibe la activación de la microglía inhibiendo la unión del LPS a la superficie celular y también reduce significativamente la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SN inducida por el LPS (Liu y col., 2000a, b). Por último, el dextrometorfano, cuyo efecto neuroprotector se atribuye a la interferencia en la unión del LPS a su receptor en la superficie celular, produce la inhibición de la activación microglial estimulada por el LPS, y la producción de TNF- α , NO y radicales libres superóxido inducidos por el LPS (Liu y col., 2003).

Sin embargo, nuestros resultados muestran que la cantidad de microglía no es el único factor que pudiera estar implicado en la mayor vulnerabilidad de estas neuronas, sino que la DA endógena, una obvia característica del sistema dopaminérgico, se encuentra implicada en la vulnerabilidad de este sistema. De hecho, los animales tratados con L-DOPA tenían menos cantidad de microglía que los tratados con LPS sólo y sin embargo se mantuvo el daño sobre las neuronas no observándose protección en este caso.

El efecto sinérgico entre la DA y otras toxinas ya ha sido descrito. La DA produce un incremento sinérgico de la acción tóxica del hierro (III), de manera que el incremento en los niveles de DA endógena extracelular a través de la inhibición de su mecanismo de recaptación con nomifensina incrementa el efecto neurotóxico del hierro (III) de manera dependiente de la dosis. (Santiago y col., 2000). Por otro lado, Sakka y col. (2003) demostraron que la rotenona, un inhibidor del complejo I mitocondrial, reduce la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas y no dopaminérgicas cuando se administra a altas dosis en períodos cortos de tiempo. Esta toxicidad se previene significativamente con una superóxido dismutasa permeable a la membrana y con α -MPT. Sin embargo, con tratamientos crónicos de rotenona a bajas concentraciones la toxicidad se hacía selectiva frente a las neuronas dopaminérgicas y de nuevo era atenuada por la α -MPT.

Además, se ha descrito que la acción tóxica de distintos compuestos dependen de la DA. Así, Xu y col. (2002) mostraron que la acumulación de α -sinucleína en cultivos de neuronas dopaminérgicas humanas que acaban en apoptosis requieren la producción de DA endógena y que este efecto era

mediado por RLO. Por el contrario, la α -sinucleína no es tóxica en neuronas corticales humanas no dopaminérgicas, sino que en este caso tiene una acción neuroprotectora.

Un efecto muy similar fue el observado por Dong y col. (2003) a través del estudio de la toxicidad del CDCrel-1 en las neuronas dopaminérgicas. El CDCrel-1 es una de las proteínas de cuya degradación se encarga la parkina (Shimura y col., 2000; Zhang y col., 2000). Se trata de una proteína que se expresa fundamentalmente en el cerebro y se localiza en las terminales axónicas de neuronas inhibitorias (Honer y col., 1993; Kinoshita y col., 2000). Su función parece estar relacionada con el reconocimiento vesicular (Caltagarene y col., 1998; Beites y col., 1999). Mutaciones en la parkina llevarían a la no degradación de esta y otras proteínas cuya acumulación resultaría tóxica para las neuronas de DA. Dong y col. (2003) mostraron que la transferencia génica de CDCrel-1 a través de la recombinación con un virus adeno-asociado en la SN de la rata produjo un rápido incremento de la expresión nigral y estriatal de CDCrel-1, lo que fue seguido por una progresiva pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SN y un descenso de los niveles de DA estriatal. Sin embargo, las neuronas del GP se salvaron de la toxicidad del CDCrel-1. Esta toxicidad selectiva frente a las neuronas de DA pudo ser bloqueada por la inhibición de la TH y la biosíntesis de DA a través de la α -MPT, sugiriendo así que la toxicidad inducida por el CDCrel-1 estaba mediada por la DA endógena. Dong y col. (2003) justifican este efecto en relación con la inhibición de la secreción de DA producida por el CDCrel-1 de manera que al

interferir en la liberación de la DA almacenada en vesículas, habría más cantidad de DA libre en el citoplasma.

Por otro lado, la tetrahidrobiopterina (BH₄), un cofactor imprescindible de la TH y por tanto un requerimiento absoluto para la actividad de esta enzima, resulta tóxica de manera selectiva para las células que producen DA y esta toxicidad se incrementa en proporción a la cantidad de DA celular (Choi y col., 2003). Puesto que este efecto tóxico se previene con el uso de antioxidantes y que la BH₄ produce peroxidación lipídica, se piensa que el estrés oxidativo puede estar implicado en esta toxicidad.

Todos estos resultados ponen de manifiesto la importante contribución de la DA endógena a la vulnerabilidad y degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SN. Estos datos muestran que la presencia de DA endógena en las neuronas dopaminérgicas hacen que compuestos no tóxicos (como la α -sinucleína, la parkina, la BH₄ o el LPS) se hagan tóxicos. Además, la DA endógena (probablemente a través de su acción sinérgica con procesos inflamatorios) incrementa la toxicidad y especificidad de diferentes toxinas.

A pesar de las diferencias entre los distintos trabajos todos ellos llegan a la conclusión común de que la DA citosólica es neurotóxica. Las razones de esta toxicidad pueden ser varias. Por un lado, se sabe que la DA puede alterar la función mitocondrial, otro mecanismo asociado a la patogénesis de la EP (Pérez y Hastings 2004). El metabolismo de la DA, a través de la MAO, produce un descenso en el estado 3 de la respiración en mitocondrias aisladas de cerebro que es revertido por el bloqueante de la MAO pargilina (Berman y Hastings, 1999; Gluck y col., 2002). La oxidación de la DA a DA-quinona

produce un incremento en el estado 4 de la respiración (desacoplado) en la mitocondria y una apertura de la permeabilidad del poro de transición mitocondrial (Berman y Hastings, 1999). La disfunción mitocondrial suele acabar en liberación del citocromo c como paso inicial de la cascada apoptótica.

Sin embargo, la principal causa de toxicidad de la DA parece estar relacionada con su capacidad de generar RLO. Se sabe que las neuronas dopaminérgicas de la SN están particularmente sometidas a estrés oxidativo debido al metabolismo de la DA que incrementa los niveles de varias especies tóxicas. Debido a su anillo catecol inestable, la DA puede dar lugar a oxidaciones espontáneas en presencia de oxígeno molecular lo cual daría lugar a peróxido de hidrógeno, superóxido y dopamina-o-quinona (Graham, 1978). Alternativamente, también puede ser desaminada enzimáticamente por la MAO para producir DOPAC y peróxido de hidrógeno, que a su vez puede ser convertido en radicales hidroxilos en presencia de hierro (Maker y col., 1981). Esta neurotoxicidad de la DA, en teoría, también acelera la autooxidación de la DA liberada, lo que llevaría a la generación de RLO *in vivo*. El incremento en la autooxidación de la DA y de los RLO puede iniciar una cascada de estrés oxidativo que llevaría al daño y pérdida de las neuronas de la SNc en la EP. Esto se corrobora con el incremento en los niveles basales de formación de malonaldehído (peroxidación lipídica) y el contenido en hierro de las neuronas pigmentadas supervivientes de la SN (Dexter y col., 1989; Gerlach y col., 1994; Gotz y col., 1994). Además, las neuronas dopaminérgicas de la SN parecen ser más vulnerables al daño que otros fenotipos neuronales y también a aquellas

de otras áreas cerebrales probablemente debido al alto contenido en hierro y DA en la SN (Jenner y Olanow, 1998) y a su reducida capacidad antioxidante (Jenner y Olanow, 1996), un posible regulador de la sensibilidad celular a los daños (Liu y col., 1998).

El aumento del estrés oxidativo debido a la oxidación de la DA parece jugar un papel importante en la toxicidad inducida sobre las neuronas dopaminérgicas por numerosos modelos (Pérez y Hastings, 2004). Así, la toxicidad inducida por la metanfetamina parece estar relacionada con la presencia de DA y el incremento de proteínas modificadas por DA-quinonas para formar residuos cisteil-DA (LaVoie y Hastings, 1999; Larsen y col., 2002). También parece que la oxidación de la DA juega un papel importante en el estrés oxidativo asociado a la toxicidad del MPP⁺ *in vitro* (Lotharius y O'Malley, 2000). Por su parte, Lotharius y Brundin (2002), sugieren que la α -sinucleína produce la inhibición de la fosfolipasa D2 lo que lleva a una incompleta recirculación de la DA vesicular con el consiguiente aumento de DA libre y radicales libres.

Se sabe que el LPS, por su parte, también es capaz de generar radicales libres. La microglía activada por el LPS produce un incremento en la actividad de la iNOS que produciría NO en mayores cantidades (Possel y col., 2000; Arimoto y col., 2003). Por otro lado, las células microgliales, a través de la enzima NADPH-oxidasa, son capaces de generar superóxido (Qin y col., 2004). La NADPH-oxidasa es la enzima productora de superóxido más importante en las células fagocíticas del sistema periférico y del cerebro (Babior, 1999). Aunque el NO no parece ser, en bajas cantidades, tóxico para

las neuronas, cuando reacciona con el radical superóxido forma peroxinitrito, el oxidante más potente y tóxico (Beckman y col., 1993; Xie y col., 2002).

Por todo ello, la DA endógena y el LPS podrían actuar de forma sinérgica para inducir la liberación de RLO con el consecuente incremento en la toxicidad y especificidad de las diferentes toxinas sobre las neuronas dopaminérgicas. Este sinergismo mediado por radicales libres también ha sido descrito para otros modelos de neurodegeneración. Así, el MPTP y el LPS también podrían actuar de manera sinérgica a través de la activación de la NADPH-oxidasa y la consecuente producción de RLO (Gao y col., 2003a, b). En nuestro estudio, la combinación de las características intrínsecas de las neuronas dopaminérgicas, con su reducida capacidad para detoxificar los RLO, junto con la producción de estas especies por parte tanto de la DA como del LPS, justificarían la mayor toxicidad inducida por el lipopolisacárido en las neuronas dopaminérgicas de la SN en presencia de DA.

En conclusión, nuestro trabajo aporta varios datos de interés clínico. Una de las características más sorprendentes de la EP es que inicialmente sólo afecta a una población neuronal restringida en el cerebro. Aunque otras neuronas también se ven afectadas, las neuronas dopaminérgicas de la parte compacta de la sustancia negra son las más vulnerables a este proceso degenerativo. La razón de esta pérdida celular selectiva aún no se conoce con exactitud aunque, como aquí se describe, los altos niveles de DA en estas neuronas puede producir un aumento significativo de la acción tóxica de distintos compuestos. Por todo ello, nuestros resultados, junto con los de otros autores, defienden los posibles efectos tóxicos de la DA que podría ser “el

asesino en casa” en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (Chesselet, 2003). El conocimiento de la manera en que la DA está implicada en este proceso podría abrir la posibilidad de nuevas estrategias de protección frente a este importante proceso degenerativo.

5.- EFECTOS SECUNDARIOS DESCRITOS EN EL TRATAMIENTO CRONICO CON L-DOPA.

Otros datos de especial interés desde el punto de vista clínico son algunos de los obtenidos con el tratamiento de L-DOPA. El tratamiento con L-DOPA en la EP es uno de los más utilizados en la actualidad. Aunque el tratamiento con este fármaco produce una mejoría bastante notable en los síntomas iniciales de la enfermedad, su uso continuado hace que al cabo de unos años el estado de los pacientes empeore de manera notoria y que la incapacidad funcional sea igual o mayor que el nivel de incapacidad anterior al tratamiento. De hecho, existen sospechas de que su uso puede acelerar la progresión de la degeneración neuronal (Jenner y Brin, 1998). No hay evidencias clínicas que sugieran que la L-DOPA tenga efectos adversos en las células dopaminérgicas en individuos sanos o en la viabilidad de las células supervivientes en pacientes con EP. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la L-DOPA, al generar elevados niveles de DA, mantiene la situación de riesgo de estas neuronas y de los astrocitos, por lo que la enfermedad podría seguir empeorando.

Estos datos permiten suponer que la L-DOPA podría representar un candidato para incrementar la muerte celular mediada por estrés oxidativo debido a su capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (Fahn, 1996). Así, la autooxidación de la L-DOPA causa un estrés oxidativo que llevaría a la destrucción neuronal por necrosis o apoptosis. Estudios recientes muestran que la L-DOPA causa una inhibición reversible del complejo I de la mitocondria en la SN y el estriado de la rata. La extrapolación de estos resultados permitiría sugerir que el tratamiento crónico con L-DOPA podría incrementar la disfunción en el complejo I mitocondrial en la SN ya existente en la EP. Por otro lado, la L-DOPA y la DA han sido implicadas en el déficit nigral de glutatión reducido encontrado en la EP junto con especies radicales de superóxido. Además estudios con PET han mostrado que el tratamiento crónico con L-DOPA produce una pérdida de recaptación de fluorodopa en el estriado (Fanh, 1996a, b). En cualquier caso, el tema de la neurotoxicidad de la L-DOPA continúa sin resolverse, pero nuestros datos apuntan la posibilidad de su toxicidad en aquellas circunstancias donde conviva con un factor tóxico, como es el caso del LPS.

Estos datos junto con los anteriores indican que la acción degenerativa del LPS, que parece mediada por la presencia de DA endógena, presenta un mecanismo específico. El descubrimiento de este mecanismo que podría ser semejante al que produce la acumulación de α -sinucleína en la EP es de gran importancia para el desarrollo de nuevos fármacos que nos permitan luchar contra este proceso degenerativo y por tanto contra la aparición de dicha enfermedad.

CONCLUSIONES

1. El tratamiento con α -MPT previene de manera dependiente de la dosis la pérdida de neuronas TH positivas en la SN de la rata tras una única inyección intranigral de LPS. Este efecto fue revertido con el tratamiento simultáneo de α -MPT y L-DOPA/benserazida.
2. El tratamiento con α -MPT previene la pérdida de expresión del ARNm de la TH y del transportador de dopamina. Este efecto también fue revertido con el tratamiento simultáneo de α -MPT y L-DOPA/benserazida.
3. La inyección de LPS solo o en combinación con los tratamientos ensayados no produjo alteración en la población de neuronas GABAérgicas de la SN.
4. El tratamiento con α -MPT previene de manera dependiente de la dosis la pérdida de astrocitos GFAP positivos en la SN de la rata tras una única inyección intranigral de LPS. Este efecto de nuevo fue revertido con el tratamiento simultáneo de α -MPT y L-DOPA/benserazida.
5. El tratamiento con α -MPT previene de manera dependiente de la dosis la activación de la microglía en la SN de la rata tras una única inyección intranigral de LPS. Este efecto sin embargo no fue revertido con el tratamiento simultáneo de α -MPT y L-DOPA/benserazida.
6. El tratamiento con α -MPT produjo un aumento en la expresión de BDNF en la SN de la rata tras la inyección de LPS. Este efecto fue revertido con el tratamiento simultáneo de α -MPT y L-DOPA/benserazida.
7. La temperatura corporal de las ratas sólo disminuyó a valores por debajo de los normales en el grupo tratado con 200 mg/kg de α -MPT.

8. El grupo de animales tratados con α -MPT y mantenidos a una temperatura ambiente de 33 °C no mostró ninguna diferencia en los resultados con el grupo mantenido a 22 °C, especialmente en lo que se refiere a la protección de las neuronas dopaminérgicas, indicando que la protección ejercida por esta droga no se debe a su efecto hipotérmico.
9. Los tratamientos con sulpiride y ácido kinurénico consiguen proteger en parte las poblaciones astrocíticas y microgliales pero no ejercen protección sobre las neuronas dopaminérgicas tras la inyección de LPS en la SN de las ratas.
10. Todos estos datos sugieren que la dopamina endógena está implicada en la especial sensibilidad del sistema nigroestriado.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott N. J. (2000) Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell Mol. Neurobiol.* **20**, 131-147.
- Akiyama H. y McGeer P. (1989) Microglial response to 6-hydroxydopamine-induced substantia nigra lesions. *Brain Res.* **489**, 247-253.
- Akiyama H., Itagaki S. y McGeer P. L. (1988) Major histocompatibility complex antigen expression on rat microglia following epidural kainic acid lesions. *J. Neurosci. Res.* **20**, 147-157.
- Alam Z. I., Daniel S. E., Lees A. J., Marsden D. C., Jenner P. y Halliwell B. (1997a) A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease. *J. Neurochem.* **69**, 1326-1239.
- Alam Z. I., Jenner A., Daniel S. E., Lees A. J., Cairns N., Marsden C. D., Jenner P. y Halliwell B. (1997b) Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J. Neurochem.* **69**, 1196-1203.
- Albers D. S. y Sonsalla P. K. (1995) Methamphetamine-induced hyperthermia and dopaminergic neurotoxicity in mice: pharmacological profile of protective and nonprotective agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275**, 1104-1114.
- Ali S. F., Newport G. D. y Slikker W. Jr. (1996) Metamphetamine-induced dopaminergic toxicity in mice. Role of environmental temperature and pharmacological agents. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **801**, 187-198.
- Anderson D. C. y Cranford R. E. (1979) Corticosteroids in ischemia stroke. *Stroke.* **10**, 68-71.
- Anderson K. V. (2000) Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 13-19.
- Andersson K. K., Vassort C., Brennan B. A., Que L., Haavik J., Flatmark T., Gros F. y Thibault J. (1992) Purification and characterization of the blue-green rat pheochromocytoma (PC12) tyrosine hydroxylase with a dopamine-Fe (III) complex. *Biochem.* **284**, 687-695.
- Andrew R., Watson D. G., Best S. A., Midgley J. M., Wenlong H. y Petty R. K. (1993) The determination of hydroxydopamines and other trace amines in

- the urine of parkinsonian patients and normal controls. *Neurochem. Res.* **18**, 1175-1177.
- Araki T., Kumagai T., Tanaka K., Matsubara M., Kato H., Itoyama Y. y Imai Y. (2001) Neuroprotective effect of riluzole in MPTP-treated mice. *Brain Res.* **18**, 176-181.
- Arditi M., Zhou J., Torres M., Durden D. L., Stins M. y Kim K. S. (1995) Lipopolysaccharide stimulates the tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinases p44, p42, and p41 in vascular endothelial cells in a soluble CD14-dependent manner. Role of protein tyrosine phosphorylation in lipopolysaccharide-induced stimulation of endothelial cells. *J. Immunol.* **155**, 3994-4003.
- Arimoto T. y Bing G. (2003) Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* **12**, 35-45.
- Arvin K. L., Han B. H., Du Y., Lin S. Z., Paul S. M. y Holtzman D. M. (2002) Minocycline markedly protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Ann. Neurol.* **52**, 54-61.
- Ayata C. y Ropper A. H. (2002) Ischaemic brain oedema. *J. Clin. Neurosci.* **9**, 113-124.
- Azzaro A., King J., Kotzu D., Schoepp D., Frost J. y Schochet S. (1985) Guinea pig striatum as a model of human dopamine deamination: the role of monoamine oxidase isozyme ratio, localization and affinity for substrate in synaptic dopamine metabolism. *J. Neurochem.* **45**, 949-956.
- Babior B. M. (1999) NADPH oxidase : an update. *Blood* **93**, 1464-1476.
- Banati R. B., Gehrmann J., Schubert P. y Kreutzberg G. W. (1993) Cytotoxicity of microglia. *Glia.* **7**, 111-118.
- Banon M. J. y Roth R. H. (1983) Pharmacology of mesocortical dopamine neurons. *Pharmacol.* **35**, 53-68.
- Barbeau A. (1985) Lecture at 8th International Symposium on Parkinson's Disease. New York, June.

- Barone F. C. y Feuerstein G. Z. (1999) Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **19**, 819-834.
- Battaglia G., Busceti C. L., Molinaro G., Biagioni .F, Storto M., Fornai F., Nicoletti F. y Bruno V. (2004) Endogenous activation of mGlu5 metabotropic glutamate receptors contributes to the development of nigro-striatal damage induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *J. Neurosci.* **24**, 828-835.
- Baydoun A. R., Wileman S. M., Wheeler-Jones C. .P, Marber M. S., Mann G. E., Pearson J. D. y Closs E. I. (1999) Transmembrane signalling mechanisms regulating expression of cationic amino acid transporters and inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. J.* **344**, 265-72.
- Beal M. F. (1998) Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1366**, 211–223.
- Beal M. F. (2003) Bioenergetic approaches for neuroprotection in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* **53** Suppl 3:S39-47; discussion S47-8.
- Bean A. J. y Roth R. H. (1991) Expression of acidic and basic fibroblast growth factors in the substantia nigra of rat, monkey, and human. *J. Neurosci.* **11**, 2694-2670.
- Beckman J. S., Carson M., Amith C. D. y Koppenol W. H. (1993) ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature.* **364**, 584.
- Beckstead R. M., Domesick V. B. y Nauta W. J. (1979) Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Res.* **175**, 191-217.
- Beites C. L., Xie H., Bowser R. y Trimble W. S. (1999) The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. *Nat. Neurosci.* **2**, 434-439.
- Benveniste E. N. (1992) Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. *Am. J. Physiol.* **263**, 1-16.

- Berman S. B. y Hastings T. G. (1999) Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **73**, 1127-1137.
- Bjorklund H., Olson L., Dahl D. y Schwarcz R. (1986) Short- and long-term consequences of intracranial injections of the excitotoxin, quinolinic acid, as evidenced by GFA immunohistochemistry of astrocytes. *Brain Res.* **371**, 267-277.
- Blandini F., Porter R. H. y Greenamyre J. T. (1996) Glutamate and Parkinson's disease. *Mol. Neurobiol.* **12**, 73-94.
- Bourdiol F., Toulmond S., Serrano A., Benavides J. y Scatton B. (1991) Increase in omega 3 (peripheral type benzodiazepine) binding sites in the rat cortex and striatum after local injection of interleukin-1, tumour necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *Brain Res.* **543**, 194-200.
- Bowyer J. F., Davies D. L., Schmued L., Broening H. W., Newport G. D., Slikker W. Jr. y Holson R. R. (1994) Further studies of the role of hyperthermia in methamphetamine neurotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **268**, 1571.
- Bowyer J. F., Gough B., Slikker W. Jr, Lipe G. W., Newport G. D. y Holson R. R. (1993) Effects of a cold environment or age on methamphetamine-induced dopamine release in the caudate putamen of female rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **44**, 87-98.
- Bowyer J. F., Tank A. W., Newport G. D., Slikker W. Jr, Ali S. F. y Holson R. R. (1992) The influence of environment temperature on the transient effects of methamphetamine on dopamine levels and dopamine release in rat striatum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **260**, 817-824.
- Braak H., Braak E., Yilmazer D., de Vos R. A., Jansen E. N. y Bohl J. (1996) Pattern of brain destruction in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J. Neural Transm.* **103**, 455-490.
- Bracken M. B., Shepard M. J., Collins W. F., Holford T. R., Young W., Baskin D. S., Eisenberg H. M., Flamm E., Leo-Summers L., Maroon J., y col. (1990) A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N. Engl. J. Med.* **322**, 1405-1411.

- Bronstein D. M., Perez-Otano I., Sun V., Mullis Sawin S. B., Chan J., Wu G. C., Hudson P. M., Kong L. Y., Hong J. S. y McMillian M. K. (1995) Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures. *Brain Res.* **704**, 112-116.
- Brotchie J. M., Mitchell I. J., Sambrook M. A. y Crossman A. R. (1991) Alleviation of parkinsonism by antagonism of excitatory amino acid transmission in the medial segment of the globus pallidus in rat and primate. *Mov. Disord.* **6**, 133-138.
- Brouillet E. y Beal M. F. (1993) NMDA antagonists partially protect against MPTP induced neurotoxicity in mice. *Neuroreport.* **4**, 387-390.
- Butcher S. P., Fairbrither I. S., Kelly J. S. y Arbutnott G. W. (1988) Amphetamine-induced dopamine release in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.* **50**, 346-355.
- Butcher S. P., Fairbrother I. S., Kelly J. S. y Arbuthnott G. W. (1990) Effects of selective monoamine oxidase inhibitors on the in vivo release and metabolism of dopamine in the rat striatum. *J. Neurochem.* **55**, 981-988.
- Calingasan N. Y., Park L. C., Calo L. L., Trifiletti R., R., Gandy S. E. y Gibson G. E. (1998) Induction of nitric oxide synthase and microglial responses precede selective cell death induced by chronic impairment of oxidative metabolism. *Am. J. Pathol.* **153**, 599-610.
- Caltagarone J., Rhodes J., Honer W. G. y Bowser R. (1998) Localization of a novel septin protein, hCDCrel-1, in neurons of human brain. *Neuroreport.* **9**, 2907-2912.
- Campbell D. G., Hardie D. G. y Vulliet P. R. (1986) Identification of four phosphorylation sites in the N-terminal region of tyrosine hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **261**, 10489-10492.
- Carreño-Muller E., Herrera A. J., de Pablos R. M., Tomas-Camardiel M., Venero J. L., Cano J. y Machado A. (2003) Thrombin induces in vivo degeneration of nigral dopaminergic neurones along with the activation of microglia. *J. Neurochem.* **84**, 1201-14.
- Cass W. A. y Gerhardt G. A. (1994) Direct in vivo evidence that D2 dopamine receptors can modulate dopamine uptake. *Neurosci. Lett.* **176**, 259-263.

- Castaño A., Herrera A. J., Cano J. y Machado A. (2002) The degenerative effect of a single intranigral injection of LPS on the dopaminergic system is prevented by dexamethasone, and not mimicked by rh-TNF-alpha, IL-1beta and IFN-gamma. *J. Neurochem.* **81**, 150-157.
- Castaño, A., Herrera, A. J., Cano, J. and Machado, A. (1998) Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. *J. Neurochem.* **70**, 1584-1592.
- Celio M.R. (1990) Calbindin D_{28k} and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* **35**, 375-475.
- Chang Z. L., Novotney A. y Suzuki T. (1990) Phospholipase C and A₂ in tumoricidal activation of murine macrophage-like cell lines. *FASEB J.* **4**, A1753.
- Chen M., Ona V. O., Li M. Ferrante R. J., Fink K B., Zhu S., Bian J., Guo L., Farrell L. A., Hersch S. M., Hobbs W., Vonsattel J. P., Cha J. H. y Friedlander R. M. (2000) Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat. Med.* **6**, 797-801.
- Chen N. H., Xu C., Coffey L. L. y Reith M. E. (1996) [3H] WIN 35,428 [2 beta-carbomethoxy-3-beta-(4-fluorophenyl)tropane] binding to rat brain membranes. Comparing dopamine cell body areas with nerve terminal regions. *Biochem. Pharmacol.* **51**, 563-566.
- Cheramy A., Leviel V. y Glowinsky J. (1981) Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature.* **289**, 537-542.
- Chesselet M. F. (2003) Dopamine and Parkinson's disease: is the killer in the house? *Mol. Psychiatry* **8**, 369-370.
- Chiba K., Trevor A. J. y Castagnoli N. Jr. (1985) Active uptake of MPP⁺, a metabolite of MPTP, by brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **128**, 1228-1232.
- Choi H. J., Kim S. W., Lee S. Y. y Hwang O. (2003) Dopamine-dependent cytotoxicity of tetrahydrobiopterine: a possible mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **86**, 143-152.

- Chung E. S., Joe E. H., Ryu J. K., Kim J., Lee Y. B., Cho K. G., Oh Y. J., Maeng S. H., Baik H. H., Kim S. U. y Jin B. K. (2001) GT1b ganglioside induces death of dopaminergic neurons in rat mesencephalic cultures. *Neuroreport*. **12**, 611-614.
- Cohen G. y Heikkila R. E. (1974) The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J Biol. Chem.* **249**, 2447-2452.
- Cragg S., Rice M. E. y Greenfield S. A. (1997) Heterogeneity of electrically evoked dopamine release and reuptake in substantia nigra, ventral tegmental area, and striatum. *J. Neurosci.* **77**, 5738-5746.
- Czlonkowska A., Kurkowska-Jastrzebska I., Czlonkowski A., Peter D. y Stefano G. (2002) Immune processes in the pathogenesis of Parkinson's disease: a potential role for microglia and nitric oxide. *Med. Sci. Monit.* **8**, 165-177.
- DeLong M. R. (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* **13**, 281-285.
- Deutch A. Y., Goldstein M. y Roth R. H. (1986) The ascending projections of the dopaminergic neurons of the substantia nigra, zona reticulata: a combined retrograde tracer-immunohistochemical study. *Neurosci Lett.* **71**, 257-263.
- Dexter D. T., Carter C. J., Wells F. R., Javoy-Agid F., Agid Y., Lees A., Jenner P. y Marsden C. D. (1989) Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *Neurochem.* **52**, 381-389.
- Díaz J., Levesque D., Lammers C. H., Griffon N., Martres M. P., Schwartz J. C. y Sokoloff P. (1995) Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain. *Neuroscience.* **45**, 54154-54159.
- Dix T. A., Kuhn D. M. y Benkovic S. J. (1987) Mechanism of oxygen activation by tyrosine hydroxylase. *Biochemistry* **26**, 3354-3361.
- Dong Z., Ferger B., Paterna J. C., Vogel D., Furler S., Osinde M., Feldon J. y Bueler H. (2003) Dopamine-dependent neurodegeneration in rats induced by viral vector-mediated overexpression of the parkin target protein, CDCrel-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12438-12443.

- Downey J. S. y Han J. (1998) Cellular activation mechanisms in septic shock. *Front. Biosci.* **3**, d468-476.
- Du Y., Ma Z., Lin S., Dodel R. C., Gao F., Bales K. R., Triarhou L. C., Chernet E., Perry K. W., Nelson D. L., Luecke S., Phebus L. A., Bymaster F. P. y Paul S. M. (2001). Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 14669–14674.
- Dugan, L.L., Sensi, S.L., Canzoniero, L.M., Handran, S.D., Rothman, S.M., Lin, T.S., Goldberg, M.P. y Choi, D.W. (1995) Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J. Neurosci.* **15**, 6377-6388.
- Dumuis, A., Sebben, M., Haynes, L., Pin, J.P. y Bockaert, J. (1988) NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature.* **336**, 68-70.
- Dusart I., Marty S. y Peschanski M. (1991) Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS--II. Astrocytes. *Neuroscience.* **45**, 541-549.
- Eriksdotter-Nilsson M., Bjorklund H., Dahl D., Olson L. y Ingvar M. (1987) Sustained seizures cause circumscribed cerebral changes in glial fibrillary acidic protein, neurofilament and laminin immunofluorescence. *Exp. Brain Res.* **69**, 155-166.
- Elkabes S., DiCicco-Bloom E. M. y Black I. B. (1996) Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J. Neurosci.* **16**: 2508–2521.
- Erlander M. G., Tillakaratne N. J., Feldblum S., Patel N. y Tobin A. J. (1991) Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron.* **7**, 91-100.
- Fahn S. (1996a) Controversies in the therapy of Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* **69**, 477-486.
- Fahn S. (1996b) Is levodopa toxic? *Neurology.* **47** (sup.3), 184-195.
- Fallon J. H, Wang C., Kim Y., Canepa N., Loughlin S. y Seroogy K. (1983) Dopamine- and cholecystokinin-containing neurons of the crossed mesostriatal projection. *Neurosci. Lett.* **40**, 233-238.

Fallon J. H. (1981) Collateralization of monoamine neurons: mesotelencephalic dopamine projections to caudate, septum, and frontal cortex. *J. Neurosci.* **1**, 1361-1368.

Fallon J. H. y Seroogy K. B. (1985) The distribution and some connections of cholecystinin neurons in the rat brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **448**, 121-132.

Faull R. L y Mehler W. R. (1978) The cells of origin of nigrotectal, nigrothalamic and nigrostriatal projections in the rat. *Neurosci.* **3**, 989-1002.

Felder C. C., Williams HL. y Axelrod J. (1991) A transduction pathway associated with receptors coupled to the inhibitory guanine nucleotide binding protein Gi that amplifies ATP-mediated arachidonic acid release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 6477-6480.

Fernaund-Espinosa I., Nieto-Sampedro M. y Bovolenta P. (1993) Differential activation of microglia and astrocytes in aniso- and isomorphic gliotic tissue. *Glia.* **8**, 277-291.

Fleming I., Bara A. y Busse R. (1996) Calcium signalling and autacoid production in endothelial cells are modulated by changes in tyrosine kinase and phosphatase activity. *J. Vasc. Res.* **33**, 225-234.

Forno L.S. (1982) Pathology of Parkinson's disease. En: Movement disorders. Ed. Marsden C. D. Fahn S. vol 2. Butterworth Scientific, London, pp 25-40.

Fossom L. H., Sterling C. R. y Tank A. W. (1992) Regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription rate and 5444 tyrosine hydroxylase mRNA stability by cyclic AMP and glucocorticoid. *Mol Pharmacol.* **42**, 898-908.

Frey E. A., Miller D. S., Jahr T. G., Sundan A., Bazil V., Espevik T., Finlay B. B. y Wright S. D. (1992) Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **176**, 1665-1671.

Gao H. M., Jiang J., Wilson B., Zhang W., Hong J. S. y Liu B. (2002) Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons:relevance to Parkinson's disease. *J. Neuroche.* **81**, 1285-1297.

Gao H. M., Liu B., Zhang W. y Hong J. S. (2003a) Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease. *FASEB J.* **17**, 1954-1956.

Gao H. M., Liu B., Zhang W. y Hong J. S. (2003b) Synergistic dopaminergic neurotoxicity of MPTP and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease. *FASEB J.* **17**, 1957-1959.

Garside S., Furtado J. C. y Mazurek M. F. (1996) Dopamine-glutamate interactions in the striatum: behaviourally relevant modification of excitotoxicity by dopamine receptor-mediated mechanisms. *Neuroscience.* **75**, 1065-1074.

Gerfen C. R. (1992) The nigrostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci.* **15**, 133-139.

Gerfen C. R., Baimbridge K. G. y Miller J. J. (1985) The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 8780-8784.

Gerlach M. y Riederer P. (1996) Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J. Neural Transm.* **103**, 987-1041.

Gerlach M., Ben-Shachar D., Riederer P. y Youdim M. B. (1994) Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J. Neurochem.* **63**, 793-807.

Gerlach M., Riederer P. Youdim M. B. (1996) Molecular mechanisms for neurodegeneration: synergism between reactive oxygen species, calcium and excitotoxic amino acids. *Adv. Neurol.* **69**, 177-194.

Ghosh S., May M. J. y Kopp E. B. (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 225-260.

Gingrich M. B. y Traynelis S. F. (2000) Serine proteases and brain damage—Is there a link?. *Trends Neurosci.* **23**, 399–407.

Giros B., El Mestikawy S., Bertrand L. y Caron M. G. (1991) Cloning and functional characterization of a cocaine-sensitive dopamine transporter. *FEBS Lett.* **295**, 149-154.

Giros B., El Mestikawy S., Godinot N., Zheng K., Han H., Yang-Fen T. y Caron M. G. (1992) Cloning, pharmacological characterization and chromosome

- assignment of the human dopamine transporter. *Mol. Pharmacol.* **42**, 383-390.
- Giulian D. (1993) Reactive glia as rivals in regulating neuronal survival. *Glia.* **7**, 102-110.
- Giulian D., Vaca K. y Corpuz M. (1993) Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. *J. Neurosci.* **13**, 29-37.
- Glover V., Eisworth J.D. y Sander M. (1980) Dopamine oxidation and its inhibition by (-) Deprenyl in man. *J. Neural Transm.* **16**, 163-172.
- Gluck M., Ehrhart J., Jayatilleke E. y Zeevalk G. D. (2002) Inhibition of brain mitochondrial respiration by dopamine: involvement of H₂O₂ and hydroxyl radicals but not glutathione-protein-mixed disulfides. *J. Neurochem.* **82**, 66-74.
- Good P. F., Olanow C. W. y Perl D. P. (1992) Neuromelanin-containing neurons of the substantia nigra accumulate iron and aluminum in Parkinson's disease: a LAMMA study. *Brain Res.* **593**, 343-346.
- Gotz M. E., Kunig G., Riederer P. y Youdim M. B. (1994) Oxidative stress: free radical production in neural degeneration. *Pharmacol. Ther.* **63**, 37-122.
- Graham D. G. (1978) Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol. Pharmacol.* **14**(4):633-643.
- Geenamyre T. (1993) Glutamate-dopamine interactions in the basal ganglia: relationship to Parkinson's disease. *J. Neural Trasm. Ge. Sect.* **91**, 255-269.
- Grenet H. E., Ledley F. D., Reed L. L y Woo S. L. (1987) Full-length cDNA for rabbit tryptophan hydroxylase: functional domains and evolution of aromatic aminoacid hydroxylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 5530-5534.
- Grimaldi M., Navarra P., Pozzoli G., Preziosi P. y Schettini G. (1998) Bacterial lipopolysaccharide increases interleukin-6 and prostaglandin release in rat cortical type I astrocytes by different mechanisms: role of anti-inflammatory agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **250**, 798-804.
- Gu M., Cooper J. M., Taanman J. W. y Schapira A. H. (1998) Mitochondrial DNA transmission of the mitochondrial defect in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **44**, 177-186.

- Haavik J. y Flatmark T. (1987) Isolation and characterization of tetrahydrobiopterin oxidation products generated in the tyrosine 3-monooxygenase (tyrosine hydroxylase) reaction. *Eur. J. Biochem.* **168**, 21-26.
- Haavik J., Le Bourdelles B., Martinez A., Flatmark T. y Mallet J. (1991) Recombinant human tyrosine hydroxylase isoenzymes. Reconstitution with iron and inhibitory effect of other metal ions. *Eur. J. Biochem.* **199**, 371-378.
- Haber S. N. (1968) Neurotransmitters in the human and nonhuman primate basal ganglia. *Human Neurobiol.* **5**:159-168.
- Han J., Thompson P. y Beutler B. (1990) Dexamethasone and pentoxifylline inhibit endotoxin-induced cachectin/tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signaling pathway. *J. Exp. Med.* **172**, 391-394.
- Hayakawa M., Jayadev S., Tsujimoto M., Hannun Y. A. y Ito F. (1996) Role of ceramide in stimulation of the transcription of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 681-686.
- Haycock J. W. (1990) Phosphorylation of tyrosine in situ at serine 8, 19, 31 and 40. *J. Biol. Chem.* **265**, 11682-11691.
- Hernandez-Lopez S., Tkatch T., Perez-Garci E., Galarraga E., Bargas J., Hamm H. y Surmeier D. J. (2000) D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[β]-IP3-calcineurin-signaling cascade. *J. Neurosci.* **20**, 8987-8995.
- Herrera A. J., Castaño A., Venero J. L., Cano J. and Machado A. (2000) The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. *Neurobiol. Dis.* **7**, 429-447.
- Herrera A. J., Tomás-Camardiel M., Venero J. L., Cano J y Machado A. (2004) Inflammatory process as a determinant factor for the degeneration of substantia nigra dopaminergic neurons. *J. Neural Transm.* En prensa.
- Hirsch E. C., Hunot S., Damier P. y Faucheux B. (1998) Glial cells y inflammation in Parkinson's disease: a role in neurodegeneration? *Ann. Neurol.* **44**, S115-120.

- Hoffman A. F., Zahniser N. R., Lupica C. R. y Gerhardt G. A. (1999) Voltage-dependency of the dopamine transporter in the rat substantia nigra. *Neurosci. Lett.* **260**, 105-108.
- Holz R. W. y Coyle J. T. (1977) The effects of various salts, temperature, and the alkaloids veratradine and batrachotoxin on the uptake of [³H]dopamine into synaptosomes from rat striatum. *Mol. Pharmacol.* **10**, 746-758.
- Honer W. G, Hu L. y Davies P. (1993) Human synaptic proteins with a heterogeneous distribution in cerebellum and visual cortex. *Brain Res.* **609**, 9-20.
- Hontanilla B., Parent A. y Gimenez-Amaya J. M. (1997) Parvalbumin and calbindin D-28k in the entopeduncular nucleus, subthalamic nucleus, and substantia nigra of the rat as revealed by double-immunohistochemical methods. *Synapse.* **25**, 9-67.
- Hu S., Martella A., Anderson W. R. y Chao C. C. (1994) Role of cytokines in lipopolysaccharide-induced functional and structural abnormalities of astrocytes. *Glia.* **10**, 227-234.
- Hunot S. y Hirsch, E. C. (2003) Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **53**, S49-58.
- Hunot S., Brugg B., Ricard D., Michel P P, Muriel M. P, Ruberg M, Faucheux B. A., Agid Y. y Hirsch E. C. (1997) Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 7531-7536.
- Hunot S., Dugas N., Faucheux B., Hartmann A., Tardieu M., Debre P., Agid Y., Dugas B. y Hirsch E. C. (1999) FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *J. Neurosci.* **19**, 3440-3447.
- Iravani M. M., Kashefi K., Mander P., Rose S. y Jenner P. (2002) Involvement of inducible nitric oxide synthase in inflammation-induced dopaminergic neurodegeneration. *Neuroscience.* **110**, 49-58.

- Isacson O., Fischer W., Victorin K., Dawbarn D. y Bjorklund A. (1987) Astroglial response in the excitotoxically lesioned neostriatum and its projection areas in the rat. *Neuroscience*. **20**, 1043-1056.
- Jarrot B. e Iversen L. L. (1971) Noradrenaline metabolising enzymes in normal and sympathetical denervated vas deferens. *J. Neurochem*. **25**, 360-368.
- Javitch J. A., D'Amato R. J., S. M. y Snyder S. H. (1985) Parkinsonism-inducing MPTP; uptake of the metabolite MMP+ by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **82**, 2173-2177.
- Jenner P. (1998) Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov. Disord*. **13**, 24-34.
- Jenner P. G y Brin M. F. (1998) Levodopa neurotoxicity: experimental studies versus clinical relevance. *Neurology*. **50**, S39-43.
- Jenner P. y Olanow C. W. (1998) Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann. Neurol*. **44**, S72-84.
- Jenner P. y Olanow C. W. (1996) Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology*. **47**, S161-170.
- Jeohn G. H., Kong L. Y., Wilson B. , Hudson P. y Hong J. S. (1998) Synergistic neurotoxic effects of combined treatments with cytokines in murine primary mixed neuron/glia cultures. *J. Neuroimmunol*. **85**, 1-10.
- Jones S. R., Garris P. A., Kilts C. D. y Wightman R. M. (1995) Comparison of dopamine uptake in the basolateral amygdaloid nucleus, caudate-putamen, and nucleus accumbens of the rat. *J. Neurochem*. **64**, 2581-2589.
- Jonkers N., Sarre S., Guy G. y Michotte Y. (2000) MK801 influences L-DOPA-induced dopamine release in intact and hemi-parkinson rats. *Eur. J. Pharmacol*. **407**, 281-291 .
- Jonsson G., Sundstrom E., Newanze H., Hallman H. y Luthman J. (1986) Mode of action of MPTP on catecholaminergic neurons in the mouse. En: MPTP- a neurotoxin producing a parkinsonian syndrome. Ed. Markey S. P., Castagnoli N. Jr., Trevor A. J. y Kopin I. J. Academic Press, New York. p. 253.

- Jorgensen M. B., Finsen B. R., Jensen M. B., Castellano B., Diemer N. H. y Zimmer J. (1993) Microglial and astroglial reactions to ischemic and kainic acid-induced lesions of the adult rat hippocampus. *Exp. Neurol.* **120**, 70-88.
- Joseph C. K., Wright S. D., Bornmann W. G., Randolph J. T., Kumar E. R., Bittman R., Liu J. y Kolesnick R. N. (1994) Bacterial lipopolysaccharide has structural similarity to ceramide and stimulates ceramide-activated protein kinase in myeloid cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 17606-17610.
- Justice J. B. Jr., Nicolaysen L. C. y Michael A. C. (1988) Modeling the dopaminergic nerve terminal. *J. Neurosci. Meth.* **22**, 239.
- Kanterman R. Y., Mahan L. C., Briley E. M., Monsma F.J. Jr., Sibley D. R., Axelrod J. y Felder C. C. (1991) Transfected D2 dopamine receptors mediate the potentiation of arachidonic acid release in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Pharmacol.* **39**, 364-369.
- Kanthasamy A. G., Kanthasamy A., Matsumoto R. R., Vu T. Q. y Truong D. D. (1997) Neuroprotective effects of the strychnine-insensitive glycine site NMDA antagonist (R)-HA-966 in an experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res.* **759**, 1-8.
- Kaufman S. (1977) Mixed function oxygenases. General considerations. In: Structure and Function of Monoamine Enzymes. Ed. Usdin E., Weiner N. y Youdim M. B. H. New York: Dekker. pp 3-22.
- Keller R. V. Jr., Kurh W. G., Wightman R. M. y Zigmond M. J. (1988) The effect of L-dopa on in vivo dopamine release from nigrostriatal bundle neurons. *Brain Res.* **447**, 191-194.
- Kern J. A., Lamb R. J., Reed J. C., Daniele R. P. y Nowell P. C. (1988) Dexamethasone inhibition of interleukin 1 beta production by human monocytes. Posttranscriptional mechanisms. *J. Clin. Invest.* **81**, 237-244.
- Kiefer R. y Kreutzberg G. W. (1991) Effects of dexamethasone on microglial activation in vivo: selective downregulation of major histocompatibility complex class II expression in regenerating facial nucleus. *J. Neuroimmunol.* **34**, 99-108.

- Kim W. G., Mohney R. P., Wilson B., Jeohn G. H., Liu B. y Hong J. S. (2000) Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J. Neurosci.* **20**, 6309–6316.
- Kimberlin D. W., Willis S. A., McCracken G. H. Jr. y Nisen P. D. (1995) Protein synthesis-dependent induction of interleukin-1 beta by lipopolysaccharide is inhibited by dexamethasone via mRNA destabilization in human astroglial cells. *J. Clin. Immunol.* **15**, 199-204.
- Kimerlberg H. K. y Ransom B. R. (1986) Physiological and pathological aspects of astrocytes swelling. En: *Astrocytes, Cell Biology and Pathology of Astrocytes*. Ed. Fedoroff S. y Vernadakis A. Academic Press, Orlando. Vol. 3, pp129-166.
- Kinoshita A., Noda M. y Kinoshita M. (2000) Differential localization of septins in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* **428**, 223-239.
- Kitayama S., Shimada S., Xu H., Markham L., Donovan D. M. y Uhl G. R. (1992) Dopamine transporter site-directed mutations differentially alter substrate transport and cocaine binding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 7782-7785.
- Klockgether T. y Turski L. (1993) Toward an understanding of the role of glutamate in experimental parkinsonism: agonist-sensitive sites in the basal ganglia. *Ann. Neurol.* **34**, 585-593.
- Knowles, R.G. y Moncada, S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* **298**, 249-258.
- Kozak W., Klir J. J., Conn C. A. y Kluger M. J. (1997) Attenuation of lipopolysaccharide fever in rats by protein kinase C inhibitors. *Am. J. Physiol.* **273**, R873-879.
- Krueger B. K. (1990) Kinetics and block of dopamine uptake in synaptosomes from rat caudate nucleus. *J. Neurochem.* **55**, 260-267.
- Kuczenski R. T. y Mandell A. J. (1972) Regulatory properties of soluble and particulate rat brain tyrosine hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **247**, 3114-3122.
- Kumer S. C. y Vrana K. E. (1996) Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene regulation. *J. Neurochem.* **67**, 443-462.
- Kupsch A., Loschmann P. A., Sauer H., Arnold G., Renner P., Pufal D., Burg M., Wachtel H., ten Bruggencate G. y Oertel W. H. (1992) Do NMDA

- receptor antagonists protect against MPTP-toxicity? Biochemical and immunocytochemical analyses in black mice. *Brain Res.* **592**, 74-83.
- Lange K. W. y Riederer P. (1994) Glutamatergic drugs in Parkinson's disease. *Life Sci.* **55**, 2067-2075.
- Lange K. W., Loschmann P. A., Sofic E., Burg M., Horowski R., Kalveram K. T., Wachtel H. y Riederer P. (1993) The competitive NMDA antagonist CPP protects substantia nigra neurons from MPTP-induced degeneration in primates. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **348**, 586-592.
- Larsen K. E., Fon E. A., Hastings T. G., Edwards R. H. y Sulzer D. (2002) Methamphetamine-induced degeneration of dopaminergic neurons involves autophagy and upregulation of dopamine synthesis. *J. Neurosci.* **22**, 8951-8960.
- LaVoie M. J. y Hastings T. G. (1999) Dopamine quinone formation and protein modification associated with the striatal neurotoxicity of methamphetamine: evidence against a role for extracellular dopamine. *J. Neurosci.* **19**, 1484-1491.
- Lawson L. J., Perry V. H., Dri P. y Gordon S. (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience.* **39**, 151-170
- Le W., Rowe D., Xie W., Ortiz I., He Y. y Appel S. H. (2001) Microglial activation and dopaminergic cell injury: an in vitro model relevant to Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **21**, 8447-8455.
- Lee J. C., Laydon J. T., McDonnell P. C., Gallagher T. F., Kumar S., Green D., McNulty D., Blumenthal M. J., Heys J. R. y Landvatter S. W. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. (1994) *Nature.* **372**, 739-46.
- Lee S. C., Liu W., Dickson D. W., Brosnan C. F. y Berman J. W. (1993) Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J. Immunol.* **150**, 2659-2667.
- Lees A. J. (1997) Trauma and Parkinson disease. *Rev. Neurol.* 1997 **153**, 541-6.

- Lew R., Patel A. M., Vaughn R. A., Wilson A. y Kuhar M. J. (1992) Microheterogeneity of dopamine transporters in rat striatum and nucleus accumbens. *Brain Res.* **584**, 266-271.
- Liu D., Smith C. L., Barone F. C., Ellison J. A., Lysko P. G., Li K. y Simpson I. A. (1999) Astrocytic demise precedes delayed neuronal death in focal ischemic rat brain. *Mol. Brain Res.* **68**, 29-41.
- Liu B., Du L. y Hong J. S. (2000a) Naloxone protects rat dopaminergic neurons against inflammatory damage through inhibition of microglia activation and superoxide generation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **293**, 607-617.
- Liu B., Andrieu-Abadie N., Levade T., Zhang P., Obeid L. M. y Hannun Y. A. (1998) Glutathione regulation of neutral sphingomyelinase in tumor necrosis factor-alpha-induced cell death. *J. Biol. Chem.* **273**, 11313-11320.
- Liu B., Jiang J. W., Wilson B. C., Du L., Yang S. N., Wang J. Y., Wu G. C., Cao X. D. y Hong J. S. (2000b) Systemic infusion of naloxone reduces degeneration of rat substantia nigral dopaminergic neurons induced by intranigral injection of lipopolysaccharide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **295**, 125-132.
- Liu G., Kleine L. y Hebert R. L. (1999) Advances in the signal transduction of ceramide and related sphingolipids. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **36**, 511-573.
- Liu Y., Qin L., Li G., Zhang W., An L., Liu B. y Hong J. S. (2003) Dextromethorphan protects dopaminergic neurons against inflammation-mediated degeneration through inhibition of microglial activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **305**, 212-218.
- Loschmann P. A., Lange K. W., Wachtel H. y Turski L. (1994) MPTP-induced degeneration: interference with glutamatergic toxicity. *J. Neural Transm. Suppl.* **4**, 133-143.
- Lotharius J. y Brundin P. (2002) Impaired dopamine storage resulting from alpha-synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2395-2407.
- Lotharius J. y O'Malley K. L. (2000) The parkinsonism-inducing drug 1-methyl-4-phenylpyridinium triggers intracellular dopamine oxidation. A novel mechanism of toxicity. *J. Biol. Chem.* **275**, 38581-38588.

- Loughlin A. J., Woodroffe M. N. y Cuzner M. L. (1992) Regulation of Fc receptor and major histocompatibility complex antigen expression on isolated rat microglia by tumour necrosis factor, interleukin-1 and lipopolysaccharide: effects on interferon-gamma induced activation. *Immunology*. **75**, 170-175.
- Loughlin S. E. y Fallon J. H. (1983) Dopaminergic and non-dopaminergic projections to amygdala from substantia nigra and ventral tegmental area. *Brain Res*. **262**, 334-338.
- Loughlin S. E. y Fallon J. H. (1984) Substantia nigra and ventral tegmental area projections to cortex: topography and collateralization. *Neuroscience*. **11**, 425-435.
- Lu X., Bing G. y Hagg T. (2000) Naloxone prevents microglia-induced degeneration of dopaminergic substantia nigra neurons in adult rats. *Neuroscience*. **97**, 285-291.
- Maker H. S., Weiss C., Silides D. J. y Cohen G. (1981) Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates. *J. Neurochem*. **36**, 589-593.
- Masserano J. M. y Weiner N. (1983) Tyrosine hydroxylase regulation in the central nervous system. *Molec. Cell. Biochem*. **53/54**, 129-152.
- Mattsson E., Van Dijk H., Van Kessel K., Verhoef J., Flier A. y Rollof J. (1996) Intracellular pathways involved in tumor necrosis factor-alpha release by human monocytes on stimulation with lipopolysaccharide or staphylococcal peptidoglycan are partly similar. *J. Infect. Dis*. **173**, 212-8.
- May M. J. y Ghosh S. (1998) Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol. Today*. **19**, 80-88.
- Mayeux R. P. (1997) Pathobiology of lipopolysaccharide. *J. Tox. Environm. Health*. **51**, 415-435.
- Mayfield R. D. y Zahniser N. R. (2001) Dopamine D2 receptor regulation of the dopamine transporter expressed in *Xenopus laevis* oocytes is voltage-independent. *Mol. Pharmacol*. **59**, 113-121.

- McGeer P. L., Itagaki S., Akiyama H. y McGeer E. G. (1988a) Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. *Ann. Neurol.* **24**, 574-576.
- McGeer P. L., Itagaki S., Boyes B. E. y McGeer E. G. (1988b) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* **38**, 1285-1291.
- McGiff J.C. (1991) Cytochrome P-450 metabolism of arachidonic acid. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **31**, 339-369.
- McNaught K. S. y Olanow C. W. (2003) Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **53**, 73.
- McRitchie D. A., Cartwright H., Pond S. M., van der Schyf C. J., Castagnoli N. Jr., van der Nest D. G. y Halliday G. M. (1998) The midbrain dopaminergic cell groups in the baboon *Papio ursinus*. *Brain. Res. Bull.* **47**, 611-623.
- Meiergerd S. M. y Schenk J. O. (1994) Striatal transporter for dopamine: catechol structure-activity studies and susceptibility to chemical modification. *J. Neurochem.* **62**, 998.
- Meiergerd S. M., Patterson T. A. y Schenk J. O. (1993) D2 receptors may modulate the function of the striatal transporter for dopamine: kinetic evidence from studies in vitro and in vivo. *J. Neurochem.* **61**, 764-767.
- Meister B. y Elde R. (1993) Dopamine transporter mRNA in neurons of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology.* **58**, 388-395.
- Merino M., Vizuite M. L., Cano J. y Machado A. (1999) The non-NMDA glutamate receptor antagonist 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione and 2, 3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo (*f*) quinoxaline, but not NMDA antagonist, block the intrastriatal neurotoxic effect of MPP⁺. *J. Neurochem.* **73**, 750-757.
- Michel P. P. y Agid Y. (1992) The glutamate antagonist, MK-801, does not prevent dopaminergic cell death induced by the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) in rat dissociated mesencephalic cultures. *Brain Res.* **97**, 233-240.
- Miller D. B. y O'Callaghan J. P. (1994) Environment-, drug- and stress-induced alterations in body temperature affect the neurotoxicity of substituted

- amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**, 752-760.
- Miller J. W., Kleven D. T., Domin B. A. y Fremeau Jr., A. (1997) Cloned sodium- (and chloride-) dependent high-affinity transporters for GABA, glycine, proline, betaine, taurine and creatine. En: Neurotransmitter Transporters: Structure, Function and Regulation. Ed. Reith M. E. A. Humana Press, Totowa, N.J. pp 101-149.
- Minghetti L., Polazzi E., Nicolini A., Greco A. y Levi G. (1999) Possible role of microglial prostanoids and free radicals in neuroprotection and neurodegeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* **468**, 109-19.
- Miranda A. F., Boegman R. J., Beninger R. J. y Jhamandas K. (1997) Protection against quinolinic acid-mediated excitotoxicity in nigrostriatal dopaminergic neurons by endogenous kynurenic acid. *Neuroscience.* **78**, 967-975.
- Miwa T., Furukawa S., Nakajima K., Furukawa Y. y Koshaka S. (1997) Lipopolysaccharide enhances synthesis of brain-derived neurotrophic factor in cultured rat microglia. *J. Neurosci. Res.* **50**, 1023–1029.
- Mogi M., Togari A., Ogawa M., Ikeguchi K., Shizuma N., Fan D., Nakano I. y Nagatsu T. (1998) Effects of repeated systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to mice on interleukin-1beta and nerve growth factor in the striatum. *Neurosci. Lett.* **250**, 25-28.
- Montero-Menei C. N., Sindji .L, Garcion E., Mege M., Couez D., Gamelin E. y Darcy F. (1996) Early events of the inflammatory reaction induced in rat brain by lipopolysaccharide intracerebral injection: relative contribution of peripheral monocytes and activated microglia. *Brain Res.*; **724**, 55-66.
- Montero-Menei C. N., Sindji L., Pouplard-Barthelaix A., Jehan F., Denechaud L. y Darcy F. (1994) Lipopolysaccharide intracerebral administration induces minimal inflammatory reaction in rat brain. *Brain Res.* **653**, 101-111.
- Moore S. y Thanos S. (1996) The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration. *Prog. Neurobiol.* **48**, 441-460.
- Morita K., Teraoka K. y Oka M. (1987) Interaction of cytoplasmic tyrosine hydroxylase with cromaffin granule. In vitro studies on association of soluble

- enzyme with granule membranes and alteration in enzyme activity. *J. Biol. Chem.* **262**, 5654-5658.
- Murphy S., Simmons M. L., Agullo L., Garcia A., Feinstein D. L., Galea E., Reis D. J., Minc-Golomb D. y Schwartz J. P. (1993) Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci.* **16**, 323-328.
- Murrin L. C., Morgenroth V. H. y Roth R. H. (1976) Dopaminergic neurons: effects of electrical stimulation on tyrosine hydroxylase. *Mol. Pharmacol.* **12**, 1070-1081.
- Nagatsu T., Levitt M. y Udenfriend S. (1964) Tyrosine hydroxylase: the initial step in norepinephrine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **239**, 2910-2917.
- Nakano M., Saito S., Nakano Y., Yamasu H., Matsuura M. y Shinomiya H. (1993) Intracellular protein phosphorylation in murine peritoneal macrophages in response to bacterial lipopolysaccharide (LPS): effects of kinase-inhibitors and LPS-induced tolerance. *Immunobiology.* **187**, 272-282.
- Nedergaard M., Ramson B. y Goldman S.A. (2003) New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* **10**, 523-530.
- Nissbrandt H., Engberg G. y Pileblad E. (1991) The effects of GBR 12909, a dopamine re-uptake inhibitor, on monoaminergic neurotransmission in rat striatum, limbic forebrain, cortical hemispheres and substantia nigra. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* **334**, 16.
- Norris J. W. y Hachinski V. C. (1986) High dose steroid treatment in cerebral infarction. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)*. **292**, 21-23.
- O'Neill L. A. y Greene C. (1998) Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J. Leukoc. Biol.* **63**, 650-657.
- Oertel W. H., Tappaz M. L., Berod A. y Mugnaini E. (1982) Two-color immunohistochemistry for dopamine and GABA neurons in rat substantia nigra and zona incerta. *Brain Res. Bull.* **9**, 463-74.
- Oreland L., Arau Y. y Stenstrom A. (1983) The effect of deprenyl (selegiline) on intra- and extraneuronal dopamine oxidation. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* **95**, 81-85.

- Ossowska K. (1994) The role of excitatory amino acids in experimental models of Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Park. Dis. Dement. Sect.* **8**, 39-71.
- Papadopoulos M. C., Saadoun S., Davies D. C. y Bell B. A. (2001) Emerging molecular mechanisms of brain tumour oedema. *Br. J. Neurosurg.* **15**, 101-108.
- Parsons L. H., Schad C. A. y Justice J. B. Jr. (1993) Co-administration of the D2 antagonist pimozide inhibits up-regulation of dopamine release and uptake induced by repeated cocaine. *J. Neurochem.* **60**, 376-379.
- Patt S., Gertz H. J., Gerhard L. y Cervos-Navarro J. (1991) Pathological changes in dendrites of substantia nigra neurons in Parkinson's disease: a Golgi study. *Histol. Histopathol.* **6**, 373-380.
- Pawate S., Shen Q., Fan F. y Bhat N. R. (2004) Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferongamma. *J. Neurosci. Res.* **77**, 540-551.
- Paxinos, G. and Watson, C. (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd edn. Academic Press, San Diego.
- Perez R. G. y Hastings T. G. (2004) Could a loss of alpha-synuclein function put dopaminergic neurons at risk? *J. Neurochem.* **89**, 1318-1324. Review.
- Piani D., Frei K., Do K. Q., Cuenod M. y Fontana A. (1991) Murine brain macrophages induced NMDA receptor mediated neurotoxicity in vitro by secreting glutamate. *Neurosci. Lett.* **133**, 159-162.
- Piomelli D., Pilon C., Giros B., Sokoloff P., Martres M. P. y Schwartz J. C. (1991) Dopamine activation of the arachidonic acid cascade as a basis for D1/D2 receptor synergism. *Nature.* **353**, 164-167.
- Popovic N., Schubart A., Goetz B. D., Zhang S. C., Lington C. y Duncan I. D. (2002) Inhibition of autoimmune encephalomyelitis by a tetracycline. *Ann. Neurol.* **51**, 215-223.
- Possel H., Noack H., Putzke J., Wolf G. y Sies H. (2000) Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia: in vitro and in vivo studies. *Glia.* **32**, 51-59.

- Qin L., Liu Y., Wang T., Wei S. J., Block M. L., Wilson B., Liu B. y Hong J. S. (2004) NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. *J. Biol. Chem.* **279**, 1415-1421.
- Ramsey A. J., Daubner S. C., Ehrlich J. I. y Fitzpatrick P. F. (1995) Identification of iron ligands in tyrosine hydroxylase by mutagenesis of conserved histidinyl residues. *Protein Sci.* **4**, 2082-2086.
- Ransom B., Behar T. y Nedergaard M. (2003) New roles for astrocytes (stars at last). *Trends Neurosci.* **10**, 520-522.
- Rao K. y Lund R. D. (1993) Optic nerve degeneration induces the expression of MHC antigens in the rat visual system. *J. Comp. Neurol.* **336**, 613-627.
- Reinier A. (1986) The co-occurrence of substance P-like immunoreactivity and dynorphin-like immunoreactivity in striatopallidal and striatonigral projection neurons in birds and reptils. *Brain Res.* **317**, 155-161.
- Reinier A. y Anderson K. D. (1990) The patterns of neurotransmitters and neuropeptide co-occurrence among striatal projections neurons: conclusion based on recent findings. *Brain Res.* **15**, 251-265.
- Riederer P., Youdim M. B. H., Rausch W. D., Birkmayer W., Jellinger K. y Seemann D. (1978) On the mode of action of L-Deprenyl in the Human Central Nervous System. *J. Neural. Transm.* **43**, 217-226.
- Rietschel E. T. y Brade H. (1992) Bacterial endotoxins. *Sci. Am.* **267**, 54-61.
- Rietschel E. T., Brade L., Schade F. U., Seydel U., Zahringer U., Kusumoto S. y Brade H. (1988) En: Surface og microorganisms and their interactions with the mammalian host. Ed. Schrinner E., Richmond M. H. Seibert G. y Schwarz U. Verlag Chemie, Weinheim. Pp 1-41.
- Rogove A. D. y Tsirka S. E. (1998) Neurotoxic responses by microglia elicited by excitotoxic injury in the mouse hippocampus. *Curr. Biol.* **8**, 19-25.
- Ross D. T. y Ebner F. F. (1990) Thalamic retrograde degeneration following cortical injury: an excitotoxic process? *Neuroscience.* **35**, 525-550.
- Roth R. H. y Elsworth J. D. (1995) Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress. Ed. Bloom E. y Kupfer D. Raven Press, New York: 227.

- Rothblat D. S. y Schneider J. S. (1997) Regionally specific effects of haloperidol and clozapine on dopamine reuptake in the striatum. *Neurosci. Lett.* **228**, 119-122.
- Ruetten H. y Thiemermann C. (1997) Effects of tyrphostins and genistein on the circulatory failure and organ dysfunction caused by endotoxin in the rat: a possible role for protein tyrosine kinase. *Br. J. Pharmacol.* **122**, 59-70.
- Ryu J. K., Shin W. H., Kim J., Joe E. H., Lee Y. B. Cho K. G., Oh Y. J., Kim S. U. y Jin B. K. (2002) Triasiloganglioside GT1b induces in vivo degeneration of nigral dopaminergic neurons: role of microglia. *Glia.* **38**, 15-23.
- Sakka N., Sawasa H., Izumi Y., Katsuki H., Kaneko S., Shimohama S. y Akaike A. (2003) Dopamine is involved in selectivity of dopaminergic neuronal death by rotenone. *Neuroreport.* **14**, 2425-2428.
- Santiago M. y Westerink B. H. C. (1991) Characterization and pharmacological responsiveness of dopamine release recorded by microdialysis in the substantia nigra of conscious rats. *J. Neurochem.* **57**, 738-747.
- Santiago M., Granero L., Machado A. y Cano J. (1995) Complex I inhibitor effect on the nigral and striatal release of dopamine in the presence and absence of nomifensine. *Eur. J. Pharmacol.* **280**, 251-256.
- Santiago M., Machado A. y Cano J. (1994) Effect of L-arginine/nitric oxide pathway on MPP(+)-induced cell injury in the striatum of rats. *Br. J. Pharmacol.* **111**, 837-842.
- Santiago M., Matarredona E. R., Granero L., Cano J. y Machado A. (2000) Neurotoxic relationship between dopamine and iron in the striatal dopaminergic nerve terminals. *Brain Res.* **858**, 26-32.
- Sawada H., Kawamura T., Shimohama S., Akaike A. y Kimura J. (1996) Different mechanisms of glutamate-induced neuronal death between dopaminergic and non-dopaminergic neurons in rat mesencephalic culture. *J. Neurosci. Res.* **43**, 503-510.
- Schletter J., Heine H., Ulmer A. J. y Rietschel E. T. (1995) Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch. Microbiol.* **164**, 383-389.
- Schulz J. B., Matthews R. T. y Beal M. F. (1995a) Role of nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Neurol.* **8**, 480-486.

- Schulz, J.B., Matthews, R.T., Jenkins, B.G., Ferrante, R.J., Siwek, D., Henshaw, D.R., Cipolloni, P.B., Mecocci, P., Kowall, N.W., Rosen, B.R. y col. (1995b). Blockade of neuronal nitric oxide synthase protects against excitotoxicity in vivo. *J. Neurosci.* **15**, 8419-8429.
- Seroogy K. B., Dangaran K., Lim S., Haycock J.W. y Fallon J. H. (1989) Ventral mesencephalic neurons containing both cholecystokinin- and tyrosine hydroxylase-like immunoreactivities project to forebrain regions. *J. Comp. Neurol.* **279**, 397–414.
- Shapira L., Takashiba S., Champagne C., Amar S. y Van Dyke T. E. (1994) Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced TNF-alpha and IL-1 beta production by human monocytes. *J. Immunol.* **153**, 1818-1824.
- Shimada S., Kitayama S., Lin C. L., Patel A., Nanthakumar E., Gregor P., Kuhar M. y Uhl G. (1991) Cloning and expression of a cocaine-sensitive dopamine transporter complementary DNA. *Science* **254**, 576-578.
- Shimura H., Hattori N., Kubo S., Mizuno Y., Asakawa S., Minoshima S., Shimizu N., Iwai K., Chiba T., Tanaka K. y Suzuki T. (2000) Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* **25**, 302-305.
- Shukla A., Dikshit M. y Srimal R.C. (1995) Nitric oxide modulates blood–brain barrier permeability during infections with an inactivated bacterium. *Neuroreport* **6**, 1629–1632.
- Sian J., Gerlach M., Youdim M. B. y Riederer P. (1999) Parkinson's disease: a major hypokinetic basal ganglia disorder. *J. Neural. Transm.* **106**, 443-476.
- Siegel G. J y Chauhan N. B. (2000) Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res. Rev.* **33**, 199-227.
- Sonsalla P. K., Albers D. S. y Zeevalk G. D. (1998) Role of glutamate in neurodegeneration of dopamine neurons in several animal models of parkinsonism. *Amino Acids.* **14**, 69-74.
- Sonsalla P. K., Zeevalk G. D., Manzino L., Giovanni A. y Nicklas W. J. (1992) MK-801 fails to protect against the dopaminergic neuropathology produced

- by systemic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice or intranigral 1-methyl-4-phenylpyridinium in rats. *J. Neurochem.* **58**, 1979-982.
- Srivastava R., Brouillet E., Beal M. F., Storey E. y Hyman B. T. (1993) Blockade of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) nigral toxicity in the rat by prior decortication or MK-801 treatment: a stereological estimate of neuronal loss. *Neurobiol. Aging.* **14**, 295-301.
- Staal R. G. y Sonsalla P. K. (2000) Inhibition of brain vesicular monoamine transporter (VMAT2) enhances 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity in vivo in rat striata. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **293**, 336-342.
- Stephens J. K., Masserano J. M., Vulliet P. R., Weiner N. and Nakane P. K. (1981) Immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in rat adrenal medulla by the peroxidase labeled antibody method: Effect of enzyme activation on ultrastructural distribution of the enzyme. *Brain Res.* **209**, 339-354.
- Stern E. L., Quan N., Proescholdt M. G. y Herkenham M. (2000) Spatiotemporal induction patterns of cytokine and related immune signal molecule mRNAs in response to intrastriatal injection of lipopolysaccharide. *J. Neuroimmunol.* **109**, 245-260.
- Stromberg I., Bjorklund H., Dahl D., Jonsson G., Sundstrom E. y Olson L. (1986) Astrocyte responses to dopaminergic denervations by 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine as evidenced by glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry. *Brain Res. Bull.* **17**, 225-236.
- Szabo J. (1962) Topical distribution of the striatal efferents in the monkey. *Exp. Neurol.* **5**, 21-36.
- Szczepanik A. M., Fishkin D. K., Rush D. K. y Wilmot C. A. (1996) Effects of chronic intrahippocampal infusion of lipopolysaccharide in the rat. *Neurosciencie.* **70**, 57-65.
- Sziráki I., Kardos V., Patthy M., Párfalusi M. y Budai G. (1994) Methamphetamine protects against MPTP neurotoxicity in C57BL. *Eur. J. Pharmacol.* **251**, 311-314.

- Tanaka M., Endo K., Suzuki T., Kakita A., Takahashi H. y Sata T. (2000) Parkinsonism in HIV encephalopathy. *Mov. Disord.* **15**, 1032-1033.
- Tanke T., van de Loo J. W., Rhim H., Leventhal P. S., Proctor R. A. y Bertics P. J. (1991) Bacterial lipopolysaccharide-stimulated GTPase activity in RAW 264.7 macrophage membranes. *Biochem. J.* **277**, 379-85.
- Tanner C. M. (1989) The role of environmental toxins in the etiology of Parkinson's disease. *TINS.* **12**, 49-54.
- Taylor C. A., Saint-Hilaire M. H., Cupples L. A., Thomas C. A., Burchard A. E., Feldman R. G. y Myers R. H. (1999) Environmental, medical, and family history risk factors for Parkinson's disease: a New England-based case control study. *Am. J. Med. Genet.* **88**, 742-749.
- Thanos S., Mey J. y Wild M. (1993) Treatment of the adult retina with microglia-suppressing factors retards axotomy-induced neuronal degradation and enhances axonal regeneration in vivo and in vitro. *J. Neurosci.* **13**, 455-466.
- Tikka T., Fiebich B. L., Goldsteins G., Keinanen R. y Koistinaho J. (2001) Minocycline a tetracycline derivative is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J. Neurosci.* **21**, 2580-2588.
- Timmerman W., Duvocobich M. L., Westerink B. H C., De Vries J. B., Tepper P. G. y Horn A. S. (1989a) The enantiomers of the dopamine agonist N-0437: in vivo and in vitro effects on the release of striatal dopamine. *Eur. J. Pharmacol.* **166**, 1-11.
- Timmerman W., Westerink B. H. C., De Vries J. B., Tepper P. G. y Horn A. S. (1989b) Microdialysis and striatal dopamine release: stereoselective actions of the enantiomers of N-0437. *Eur. J. Pharmacol.* **162**, 143-150.
- Tomás- Camardiel M., Herrera A. J., Venero J. L., Cano J. Y Machado A. (2004) Inflammatory process as a determinant factor for the degeneration of substantia nigra dopaminergic neurons: posible relevance to the etiology of Parkinson's disease. *Curr. Med. Chem.* **4**, 223-233.
- Tomas-Camardiel M., Rite I., Herrera A. J., de Pablos R. M., Cano J., Machado A. y Venero J. L. (2004) Minocycline reduces the lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction, peroxynitrite-mediated nitration of proteins, disruption

- of the blood-brain barrier, and damage in the nigral dopaminergic system. *Neurobiol. Dis.* **16**, 190-201.
- Torreilles F., Salman-Tabcheh S., Guerin M. y Torreilles J. (1999) Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite. *Brain Res. Rev.* **30**, 153–163.
- Tretiakoff C. (1919) Contribution a l'étude de l'anatomie pathologique du locus niger de soemmering avec quelques deductions relatives a pathogenic des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. Thesis, Paris
- Triantafilou M. y Triantafilou K. (2002) Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends. Immunol.* **23**, 301-304.
- Troy C. M., Deross I. D., Prochiantz A., Greene L. A. y Shelanski M. L. (1996) Downregulation of Cu/Zn superoxide dismutase leads to cell death via the nitric oxide-peroxynitrite pathway. *J. Neurosci.* **16**, 253-261.
- Turski L., Bressler K., Rettig K. J., Loschmann P. A. y Wachtel H. (1991) Protection of substantia nigra from MPP+ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature.* **349**, 414-418.
- Ulmer A. J., Rietschel E. T. Zähringer U. Y Heine H. (2002) Lipopolysaccharide: structure, Bioactivity, receptors, and signal transduction. *Trsnds. Glycos. Glycotech.* **14**, 53-68.
- Usdin T. B., Mezey E., Chen C., Brownstein M. J. y Hoffman B. J. (1991) Cloning of the cocaine-sensitive bovine dopamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 11168-11171.
- Vaglini F., Fascetti F., Fornai F., Maggio R. y Corsini G. U. (1994) (+)MK-801 prevents the DDC-induced enhancement of MPTP toxicity in mice. *Brain Res.* **668**, 194-203.
- Van der Kooy D., Coscina D. V., y Hattori T. (1981) Is there a non-dopaminergic nigrostriatal pathway? *Neuroscience.* **6**, 345-357.
- Vass K., Lassmann H., Wekerle H. y Wisniewski H. M. (1986) The distribution of la antigen in the lesions of rat acute experimental allergic encephalomyelitis. *Acta Neuropathol. (Berl).* **70**, 149-160.
- Venero J. L., Revuelta M., Cano J. y Machado A. (1997) Time course changes in the dopaminergic nigrostriatal system following transection of the medial

- forebrain bundle: detection of oxidatively modified proteins in substantia nigra. *J. Neurochem.* **68**, 2458-2568.
- Vincent S., Höckfelt T., Christenson I. y Terenius L. (1982) Immunohistochemical evidence for a dynorphin immunoreactive striatonigral pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **85**, 251-252.
- Vizuete M. L., Merino M., Venero J. L., Santiago M., Cano J. y Machado A. (2000) Histamine infusion induces a selective dopaminergic neuronal death along with an inflammatory reaction in rat substantia nigra. *J. Neurochem.* **75**, 540-552.
- Vrana K. E., Allhiser C. L. y Roskoski R. Jr. (1981) Tyrosine hydroxylase activation and inactivation by protein phosphorylation conditions. *J. Neurochem.* **36**, 92-100.
- Wang M. J., Lin W. W., Chen H. L., Chang Y. H., Ou H. C., Kuo J. S., Hong J. S. y Jeng K. C. (2002) Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. *Eur. J. Neurosci.* **16**, 2103-2112.
- Westerink B. H. C., Tuntler J., Damsma G., Rollema H. y de Vries J. B. (1987) The use of tetrodotoxin for the characterization of drug-enhanced dopamine release in conscious rats studied by brain dialysis. *Naunyn Schmied Arch. Pharmacol.* **336**, 502-507.
- Westlund K. N., Denney R. M., Kochersperger L. M., Rose R. M. y Abell C. W. (1985) Distinct monoamine oxidase A and B populations in primate brain. *Science.* **230**, 181-183.
- White F. J., Bednarz L. M., Wachtel S. R., Hjorth S. y Brooderson R. J. (1988) Is stimulation of both D1 and D2 receptors necessary for the expression of dopamine-mediated behaviors? *Pharmacol. Biochem. Behav.* **30**, 189-193.
- White T. D y Patton D. M. (1972) Effects of external Na⁺ and K⁺ on the initial rates of noradrenaline uptake by synaptosomes prepared from rat brain. *Biochim. Biophys. Acta.* **266**, 116-127.
- Wolf M. E. y Roth R. H. (1990) Autoreceptor regulation of dopamine synthesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **604**, 323-343.

- Wright S. D., Ramos R. A., Tobias P. S., Ulevitch R. J. y Mathison J. C. (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. **249**, 1431-1433.
- Wu D. C., Jackson-Lewis V., Vila M., Tieu K., Teismann P., Vadseth C., Choi D. K., Ischiropoulos H. y Przedborski S. (2002) Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J. Neurosci*. **22**, 1763-1771.
- Xie Z., Wei M., Morgan T. E., Fabrizio P., Han D., Finch C. E. y Longo V. D. (2002) Peroxynitrite mediates neurotoxicity of amyloid beta-peptide1-42- and lipopolysaccharide-activated microglia. *J. Neurosci*. **22**, 3484-3492.
- Xu G., Gonzales V. y Borchelt D. R. (2002) Rapid detection of protein aggregates in the brains of Alzheimer patients and transgenic mouse models of amyloidosis. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord*. **16**, 191-195.
- Youdim M. B. y Riederer P. (1993) The role of iron in senescence of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *J. Neural Trans Suppl*. **40**, 57-67.
- Yrjanheikki J., Keinanen R., Pellikka M., Hokfelt T. y Koistinaho J. (1998) Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. **95**, 15769-15774.
- Yrjanheikki J., Tikka T., Keinanen R., Goldsteins G., Chan P. H. y Koistinaho J. (1999) A tetracycline derivative minocycline reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. **96**, 13496-13500.
- Yu P. H. (1986) Monoamine oxidase. En: *Neuromethods 5: Neurotransmitters enzymes*. Ed. Boulton A. A., Baker G. B. y Yu P. H. Humana Press, Clifton, New Jersey, pp. 235-272.
- Yuan J., Callahan B. T., McCann U. D. y Ricaurte G. A. (2001) Evidence against an essential role of endogenous brain dopamine in methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. *J. Neurochem*. **77**, 1338-1347.

- Zhang G. y Ghosh S. (2000) Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J. Endotoxin. Res.* **6**, 453-457.
- Zhang Y., Gao J., Chung K. K., Huang H., Dawson V. L. y Dawson T. M. (2000) Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13354-13359.
- Zhao X., Ahram A., Berman R. F., Muizelaar J. P. y Lyeth B.G. (2003) Early loss of astrocytes after experimental traumatic brain injury. *Glia* **44**, 140–152.
- Zhu S., Stavrovskaya I. G. , Drozda M., Kim B. Y., Ona V., Li M., Sarang S., Liu A. S., Hartley D. M., Wu du C., Gullans S., Ferrante R. J., Przedborski S., Kristal B. S. y Friedlander R. M. (2002) Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature.* **417**, 74–78.