



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



EFFECTO DE L-DOPA, L-DEPRENIL, DICUMAROL EN LOS
NIVELES DE MONOAMINAS Y METABOLITOS EN
NEOSTRIADO DE RATAS CON HEMIPARKINSON
EXPERIMENTAL

MARCELA CORNEJO MORA

Memoria Para Optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA: DR. MARIO HERRERA-MARSCHITZ, MD Sci PhD

SANTIAGO DE CHILE

2007



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**EFEECTO DE L-DOPA, L-DEPRENIL, DICUMAROL EN LOS
NIVELES DE MONOAMINAS Y METABOLITOS EN
NEOSTRIADO DE RATAS CON HEMIPARKINSON
EXPERIMENTAL**

MARCELA CORNEJO MORA

Memoria Para Optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas Animales

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA:	DR. MARIO HERRERA-MARSCHITZ.
PROFESOR CONSEJERO:	DR. HÉCTOR ADARMES A.
PROFESOR CONSEJERO:	DR. RICARDO OLIVARES P-M.

SANTIAGO DE CHILE

2007

ABREVIATURAS

AADC, Decarboxilasa de aminoácidos aromáticos

ANOVA, Analysis of variance; Análisis de varianza

AP, Anteroposterior

APO, Apomorfina

ATP, Adenosina trifosfato

COMT, Catecol-*O*-metil transferasa

DA, Dopamina

D-AMPH, D-Anfetamina

DAT, Proteína transportadora de dopamina

DBH, Dopamina β -hidroxilasa

DNA, Ácido desoxirribonucleico

DOPAC, Ácido 3,4-dihidroxifenilacético

DV, Dorsoventral

GSH-Px, Glutación peroxidasa

GSH, Glutación reducido

GSSG, Glutación oxidado

HPLC, High Performance Liquid Chromatography; Cromatografía Líquida de Alta Precisión

HVA, Ácido Homovanílico

H₂O₂, Peróxido de hidrógeno

i.c., Intracerebral

i.p., Intraperitoneal

L, Lateral

L-DOPA, Levo-dihidroxifenilalanina

MAO, Monoamino oxidasa

MFB, Medial Forebrain Bundle; Haz prosencefálico medial

MPTP, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

NA, Noradrenalina

OH, Radical hidroxilo

O₂⁻, Radical superóxido

ROS, Especies reactivas de Oxígeno

s.c., Subcutáneo

SEM, Standard Error of the Means; Error típico

SERT, Proteína transportadora de serotonina

SNC, Sistema Nervioso Central

SOD, Superóxido dismutasa

TH, Tirosina hidroxilasa

t_{1/2}, Vida media Plasmática

VMT-2, Proteína vesicular transportadora de monoaminas

VTA, Área tegmental ventral

3-MT, 3-metoxitiramina=3-metoxidopamina

3-OMD, 3-*O*-metildopamina

5-HIAA, Ácido 5-hidroxiindolacético

5-HT, Serotonina (5-hidroxitriptamina)

6-OHDA, 6-hidroxidopamina

*Dedicado con mucho cariño a mi familia, mi amado
y mi esperado retoño Maximiliano Alberto.....*

AGRADECIMIENTOS

Al culminar esta etapa inevitablemente se realiza un balance de todo lo aprendido y asimilado. Se vienen a la memoria todas aquellas personas que de una u otra forma han sido participes de este trabajo, y de las cuales estoy profundamente agradecida.

Quiero dar gracias a Dios por su infinito amor y por propiciar todas las circunstancias para la finalización de esta memoria. Además le agradezco por regalarme a mi amado hijito Maximiliano.

Quiero agradecer a mis profesores guías Dr. Mario Herrera-Marschitz y Dr. Diego Bustamante por su gran colaboración y entrega de conocimientos. Por haberme dado la posibilidad de trabajar en el laboratorio de neurocircuitos y por la entrega de valiosas herramientas utilizadas en el área de la neurociencia.

Además quiero agradecer a la Dra. Paola Morales por su buena disposición a compartir sus conocimientos. Agradezco al personal técnico de laboratorio: Sra. Carmen Almeyda y Sr. Juan Santibañez por su gran trabajo y colaboración.

Quiero dar las gracias a mi familia que a la distancia siempre me entregaron su apoyo. A mis padres Carmen y Alberto a los cuáles les debo en gran parte todo lo que he logrado hasta este momento, a mis hermanos Ximena y Alberto por su aliento en los momentos más difíciles.

Finalmente quiero agradecer a mi amado Luis quien ha sido un pilar fundamental para salir adelante en todos los desafíos que la vida me ha impuesto, por regalarme su amor, su cariño y comprensión. Por ser una persona maravillosa y bondadosa, por ser mi compañero de vida y entregarme su respaldo siempre.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. Sistemas cerebrales monoaminérgicos	7
2.1.1. Aspectos funcionales del sistema dopaminérgico	9
2.1.2. Bioquímica del sistema dopaminérgico y serotoninérgico	9
2.2. Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson	14
2.2.1. Radicales libres	15
2.2.2. Auto-oxidación de catecolaminas en el SNC	15
2.2.3. Enzimas antioxidantes neuroprotectivas	19
2.3. Tratamiento de la Enfermedad de Parkinson	22
2.3.1. L-DOPA	23
2.3.2. Agonistas dopaminérgicos	25
2.3.3. Inhibidores del catabolismo de la DA	25
2.4. Modelos experimentales para el estudio de la Enfermedad de Parkinson	26
3. PROPÓSITO DE LA INVESTIGACIÓN	29
4. HIPÓTESIS	30
5. OBJETIVOS	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS	31
6.1. Animales	31
6.2. Modelo de hemiparkinson experimental: cirugía estereotáxica y lesión química de la vía nigrostriatal	31
6.3. Ensayos conductuales en las ratas lesionadas	34
6.4. Microdiálisis cerebral	34
6.5. Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC).....	39
6.6. Drogas y sustancias químicas utilizadas como parámetros experimentales	42
6.6.1. Administración de fármacos y dosificación	44
6.6.2. Grupos experimentales	45
6.7. Estadística	46
6.8. Resguardos éticos en el uso de animales	46

7. RESULTADOS	47
7.1. Lesión Química Unilateral del Haz Medial Cerebral (MFB)	47
7.1.1. Evaluación Clínica	47
7.1.2. Evaluación de conducta rotacional.....	47
7.1.3. Evaluación bioquímica de la lesión.....	50
7.2. Niveles de monoaminas y sus metabolitos evaluados en neostriado de rata	50
7.2.1. Efectos en neostriado no lesionado	50
7.2.2. Efectos en neostriado lesionado	51
7.3. Efectos de dicumarol sobre los niveles de monoaminas y sus metabolitos evaluados en neostriado	56
7.4. Efecto de la perfusión con una solución depolarizante de KCl sobre los niveles de monoaminas y sus metabolitos (Tabla 6 y 7)	60
7.4.1. Efectos en neostriado no lesionado	60
7.4.2. Efectos en neostriado lesionado	61
7.5. Efectos de dicumarol y KCl sobre los niveles de monoaminas y sus metabolitos evaluados en neostriado	65
RESUMEN DE RESULTADOS	69
8. DISCUSIÓN	75
9. CONCLUSIONES	79
10. BIBLIOGRAFÍA	80

RESUMEN

La dopamina (DA) es el principal neurotransmisor catecolaminérgico del Sistema Nervioso Central (SNC). Esta monoamina es sintetizada, concentrada y liberada mayoritariamente en los ganglios basales. Los ganglios basales en el cerebro corresponden a un conjunto de núcleos subcorticales de origen telencefálico que modulan la función motora.

Se ha determinado que en la enfermedad de Parkinson existe una neurodegeneración de las vías dopaminérgicas presentes en los ganglios basales y una reducción de los niveles intracerebrales de DA, que se relacionan con la sintomatología que presentan los pacientes que padecen la enfermedad.

El metabolismo de la DA es realizado por las enzimas monoamino oxidasa (MAO) y la catecol *O*-metil transferasa (COMT). Ambas reacciones dan cuenta del metabolismo canónico de la DA. Sin embargo, la DA es susceptible de sufrir reacciones auto-oxidativas en el citosol neuronal, dando lugar a la formación de un intermediario llamado aminocromo. El aminocromo puede reducirse a través de mecanismos que le pueden transferir uno o dos electrones, constituyendo así un metabolismo no-canónico de la DA.

Uno de estos procesos reductivos del aminocromo, catalizado por una NADPH-citocromo P450 reductasa, traspasa un electrón al aminocromo, generando una *O*-semiquinona que por sus características de radical libre reacciona en presencia de oxígeno, generando un ciclo de reacciones redox, estrés oxidativo y un consecuente daño neuronal.

En condiciones normales se produce la reducción de aminocromo con dos electrones, reacción catalizada por una enzima llamada indistintamente DT-diaforasa o también NAD(P)H quinona-oxidoreductasa. Se ha propuesto que la reducción alternativa del aminocromo por la DT-diaforasa tendría una función neuroprotectora ya que da paso a la formación de *O*-hidroquinonas, moléculas inocuas que se eliminan del organismo a través de mecanismos fisiológicos.

En el presente estudio se inhibió la enzima DT-diaforasa con su inhibidor específico llamado dicumarol, con el objetivo de investigar el metabolismo no-canónico de la DA. Además se estudió el efecto de distintos fármacos que regulan la biodisponibilidad de DA. De este modo se administró sistémicamente L-DOPA y/o L-Deprenil para producir una sobrecarga de DA.

De esta forma, en esta memoria de título se estudió el efecto de L-DOPA, L-Deprenil y dicumarol en los niveles de DA, 5-HT y sus metabolitos ácidos medidos *in vivo* con microdiálisis y Cromatografía Líquida de Alta Precisión (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) en ratas con hemiparkinson experimental inducido por la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

Los resultados obtenidos indican que el precursor exógeno L-DOPA y el inhibidor de MAO_B L-Deprenil, aumentaron los niveles de DA. Estos hallazgos experimentales sostienen la racionalidad del tratamiento de la enfermedad de Parkinson, cuyo objetivo es re-establecer los menores niveles de DA de estos pacientes.

Por otro parte la inhibición intracerebral de la enzima DT-diaforasa con dicumarol no modificó la biodisponibilidad de DA en condiciones basales. Sin embargo, dicumarol disminuyó la biodisponibilidad de DA citosólica, niveles medidos al estimular la liberación de DA de síntesis reciente. Esto sugiere que al estar interrumpida la vía de la DT-diaforasa, la DA citosólica se auto-oxida siendo sustrato para la enzima NADPH-citocromo P450 reductasa que lleva a la formación de sustancias nocivas para el tejido neuronal.

ABSTRACT

Dopamine (DA) is a pivotal neurotransmitter in the CNS, mainly synthesised, accumulated and released in the basal ganglia, subcortical structures of telencephalic origin implied in the modulation of motor behaviour, as a component of the extrapyramidal system.

Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder characterized by a loss of DA cell bodies in the substantia nigra and a decrease of DA synthesis and release in the nucleus caudate and putamen. The symptomatology depends upon the extent of DA depletion.

The metabolism of DA is catalyzed by two enzymes, the monoamine oxidase and the catechol-*O*-methyl-transferase, leading as final products to 3-4 dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and the homovanillic acid (HVA).

At physiological pH, DA can also auto-oxidize, cycling, yielding an intermediate product called aminochrome. Aminochrome is the precursor of neuromelanine, which accumulates in DA cell bodies, providing the characteristic colour of the *substantia nigra*.

Aminochrome is reduced through different reactions, transferring either one or two electrons, producing free radicals or innocuous molecules. These reactions are considered to be a non-canonical metabolism pathway for DA. The first step is a reduction catalyzed by NADPH-cytochrome P450 reductase that gives one-electron to the aminochrome generating dopamine-semiquinone, which reacts in the presence of oxygen to generate a cycle of redox reactions, depleting NADH/NADPH, yielding free radicals, which can lead to oxidative stress, cellular damage, apoptosis and/or neuronal necrosis. This non-canonical metabolic pathway has been used to explain the pathophysiology of the Parkinson's disease. Under normal conditions, however, the metabolism of aminochrome is catalyzed by the enzyme DT-diaphorase and/or NAD(P)H quinone-oxidoreductase, a physiological pathway for eliminating potentially reactive molecules from the body.

The intracerebral viability of DA can be increased by systemic administration of either L-DOPA, a precursor of the synthesis of DA, and/or by inhibition of monoaminooxidase, increasing the DA pools. In the cytosol DA can suffer a spontaneous auto-oxidative reaction, which is, however, buffered by DT-diaphorase. In the present study, we interrupted this reaction by intracerebral administration of dicumarol, to investigate the role of this non-canonical pathway, when loading with L-DOPA,

and/or monoamine inhibition, on extracellular levels of monoamines and their acid metabolites with *in vivo* microdialysis, under normal and an experimentally-induced hemiparkinson condition produced by intracerebral administration of the neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA).

The results indicate that the exogenous precursor L-DOPA and the inhibitor of MAO L-Deprenyl increased the levels of DA. These experimental findings support the rationality of the treatment of Parkinson's disease with L-DOPA and L-Deprenyl, reestablishing the levels of DA of these patients. Although by different mechanisms both drugs, are effective to elevate the levels of DA. The intracerebral inhibition of DT-Diaphorase with dicumarol did not modify the viability of DA, under conditions of systemic administration of L-DOPA and/or L-Deprenyl. Nevertheless, dicumarol decreased the D-AMPH effect suggesting that DT-diaphorase is implied in a non canonical metabolism of cytosolic DA.

1. INTRODUCCIÓN

El rasgo fisiopatológico de la enfermedad de Parkinson es una pérdida de neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo y reducción de los niveles de dopamina (DA) en los ganglios basales del cerebro de estos pacientes (Olanow, 1993; Poewe y Wenning, 1996). Por lo tanto, su tratamiento intenta re-establecer dicho déficit a través de la administración de: (i) pro-fármacos que promueven la síntesis de DA (e.g. L-DOPA); (ii) fármacos que aumentan la biodisponibilidad del precursor exógeno, inhibiendo la descarboxilación periférica de L-DOPA (e.g. benzerasida, metil-DOPA) (Yahr *et al.*, 1969; Schapira, 2005), inhibiendo la *O*-metilación de L-DOPA (e.g. entacapone, tolcapone); (iii) agonistas que estimulan selectivamente los receptores post-sinápticos dopaminérgicos que han perdido su inervación endógena (e.g. bromocriptina, pramipexol, cabergolina); (iv) inhibidores del metabolismo enzimático de la DA, prolongando la vida media ($t_{1/2}$) de los niveles intracerebrales remanentes (e.g. L-Deprenil).

Existe evidencia que el desarrollo de esta enfermedad está asociado a un fenómeno de auto-oxidación de la DA (Segura-Aguilar *et al.*, 2001; Mayo *et al.*, 2005). A pH fisiológico la DA sintetizada en la terminal nerviosa puede auto-oxidarse en el compartimiento citosólico, generando un intermediario llamado aminocromo, el cual puede reducirse con un electrón entregado por la enzima NADPH-citocromo P450 reductasa, o con dos electrones transferidos por la enzima DT-diaforasa o NAD(P)H quinona-oxidoreductasa (Segura-Aguilar y Lind, 1989; Baez *et al.*, 1995; Segura-Aguilar *et al.*, 2001; 2002). La primera de estas reacciones, catalizada por la enzima NADPH-citocromo P450, genera radicales libres capaces de inducir un circuito redox autopropagante; en cambio la segunda reacción, catalizada por la enzima DT-diaforasa, al restarle sustrato a la primera reacción implica un mecanismo neuroprotector. Por otra parte la DA citosólica es transportada junto a un H^+ a las vesículas pre-sinápticas, creando un ambiente de bajo pH que protege la auto-oxidación de DA. La DA citosólica es sustrato de la enzima monoamino oxidasa (MAO), para ser degradada a un ácido (ácido 3,4-dihidroxifenilacético; DOPAC) que difunde a través de la membrana.

En esta memoria para optar al título profesional de Médico Veterinario se investigó el efecto de diversos fármacos que regulan la biodisponibilidad de la DA endógena, diferenciando entre procesos enzimáticos y de auto-oxidación. Con este objetivo se administró L-DOPA y/o L-Deprenil sistémicamente para producir una sobrecarga de DA.

Adicionalmente para evaluar la importancia de una de las vías no-canónicas del metabolismo de la DA que involucra a la enzima DT-diaforasa, se administró dicumarol una herramienta farmacológica de gran utilidad por ser un inhibidor específico de esta enzima.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sistemas cerebrales monoaminérgicos

La transmisión de la información desde una neurona a otra es posible gracias a la síntesis, acumulación y liberación de mensajeros, mecanismo conocido como neurotransmisión química. Entre estos mensajeros se encuentran las catecolaminas (DA, noradrenalina (NA), adrenalina); e indolamina (serotonina; 5-hidroxitriptamina (5-HT)).

La demostración y descripción de las principales vías monoaminérgicas en el cerebro de la rata tuvo un impacto fundamental en la comprensión de la morfología y función de diversos núcleos neuronales. Por su localización, basada en técnicas de histoquímica de fluorescencia de Falck y Hillarp (Andén *et al.*, 1966) y técnicas de lesión estereotáxica (Ungerstedt, 1971a), se distinguen cuatro sistemas dopaminérgicos: sistema nigrostriatal, sistema mesolímbico, sistema mesocortical y sistema tubero-infundibular.

En el sistema nigrostriatal, los cuerpos celulares se localizan en la *substantia nigra*, (*pars compacta*, grupo celular A9) y sus axones proyectan a través del haz prosencefálico medial (Medial Forebrain Bundle; MFB), al neostriado. Por otra parte, en el sistema mesolímbico los cuerpos celulares localizados en el área tegmental ventral (VTA, grupo celular A10) proyectan sus axones a las regiones límbicas de los ganglios basales (principalmente el núcleo accumbens y tubérculo olfatorio) y neocortex (Dahlström y Fuxe, 1965; Ungerstedt 1971a) (ver figura 1).

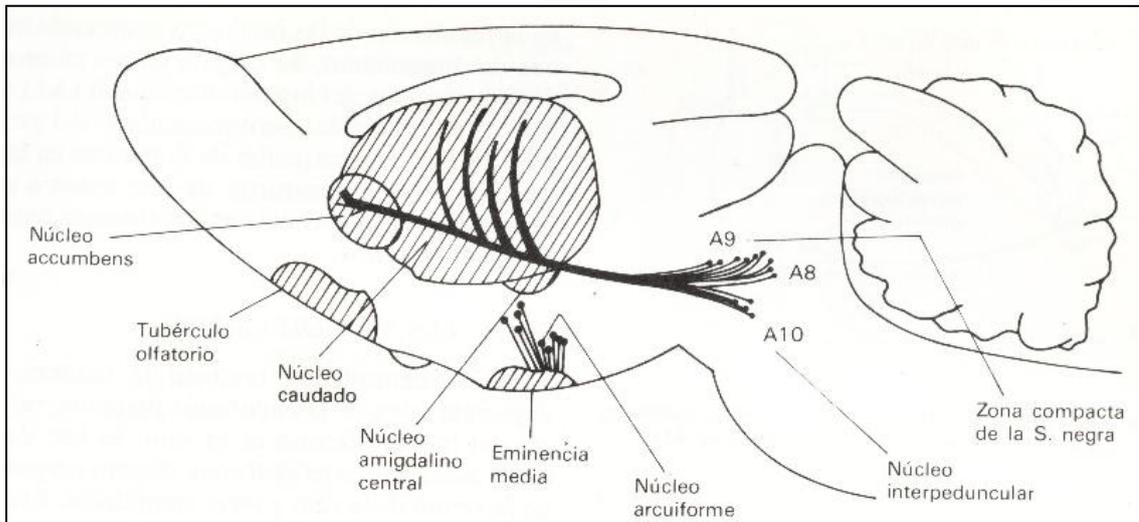


Figura 1: Corte sagital del cerebro de rata donde se muestra el origen del haz cerebral medial en las zonas A9 y A10 (Ungerstedt, 1971a).

2.1.1. Aspectos funcionales del sistema dopaminérgico

La DA fue considerada inicialmente como un producto intermediario en la biosíntesis de NA, sin embargo, a fines de la década de los años cincuenta, se descubrió su rol de neurotransmisor central (Carlsson *et al.*, 1957), concentrada mayoritariamente en los ganglios basales (Carlsson, 1959).

Los ganglios basales corresponden a un conjunto de núcleos subcorticales, ubicados en ambos hemisferios cerebrales. Estos canalizan e integran la información nerviosa desde y hacia la corteza cerebral vía tálamo. A pesar de no interactuar directamente con las neuronas motoras de la médula espinal los ganglios basales modulan la función motora expresada a través del sistema piramidal, que comprende neuronas del neocortex que proyectan a la médula espinal, inervando a las neuronas motoras que proyectan a las fibras musculares. En su conjunto los sistemas de los ganglios basales reciben el nombre de sistema extrapiramidal, ya que modulan la función motora independientemente del sistema piramidal.

2.1.2. Bioquímica del sistema dopaminérgico y serotoninérgico

La DA es el principal neurotransmisor catecolaminérgico del SNC (Ungerstedt, 1971b), en su síntesis y degradación participan vías enzimáticas comunes a la NA. Es sintetizada a partir de L-tirosina que se incorpora al organismo a través de la dieta. Por la acción de la enzima Tirosina-hidroxilasa (TH) se forma Levo-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (ver figura 2). La TH es selectiva, a diferencia de otras enzimas involucradas en el metabolismo de las catecolaminas, no acepta derivados de indoles como sustratos, y por tanto, no está involucrada en el metabolismo de la 5-HT. Este primer paso de hidroxilación que ocurre en el citosol neuronal es el paso limitante en la síntesis de las catecolaminas (Nagatsu *et al.*, 1964) siendo inhibida por el producto final de la vía sintética.

En el siguiente paso, la conversión de L-DOPA a DA, es catalizado por la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) (ver figura 2), localizada en el citoplasma neuronal, y que participa en la descarboxilación de otros aminoácidos aromáticos, como 5-hidroxitriptófano, precursor de la síntesis de 5-HT (Cooper *et al.*, 2003).

La DA sintetizada puede ser transformada a NA por acción de la enzima dopamina β -hidroxilasa (DBH), cuya distribución está limitada a las células

noradrenérgicas, localizándose al interior de las vesículas sinápticas, probablemente ligada a la membrana. Por otra parte, NA puede ser N-metilada por la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa para formar adrenalina, reacción que ocurre casi exclusivamente a nivel de las células de la médula adrenal, y algunas pocas neuronas en el hipotálamo.

Una vez sintetizada en el citoplasma, DA es almacenada en vesículas pre-sinápticas a través de un “*carrier*” o proteína transportadora VMT-2, que utiliza ATP ya que es un transporte contra corriente, y co-transporta un H^+ por molécula de DA, por lo que se acumulan altas concentraciones de DA a un pH bajo. Las vesículas se acumulan en la terminal y liberan su contenido por exocitosis calcio-dependiente. Se libera un “*quantum*” de DA cada vez que llega a la terminal un potencial de acción. Sin embargo, existe un *pool* citosólico que es liberado sin la mediación de calcio, dependiente sólo de la velocidad de síntesis. Una vez liberada al espacio sináptico la DA se une a receptores pre-sinápticos y post-sinápticos. El excedente es recaptado por la terminal mediante una proteína transportadora de DA (DAT) para ser reutilizada e incorporada a las vesículas pre-sinápticas o deaminada intracelularmente (Torres *et al.*, 2003). Este transportador puede ser sitio de acción de diversos fármacos como la cocaína, que inhibe la recaptación de DA. La deaminación intracelular de la DA para producir el metabolito ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ocurre por acción de la enzima MAO. La MAO es una flavoproteína asociada a la membrana mitocondrial externa de varios tipos de células, sobre la cual se han realizado numerosos estudios, motivados en gran parte por la aplicación que han encontrado algunos de sus inhibidores en el tratamiento de enfermedades como la depresión y la enfermedad de Parkinson. Esta enzima presenta dos isoformas A y B, existiendo diferencias en su distribución regional, su especificidad de sustrato y su susceptibilidad para ser inhibidas por fármacos.

LA MAO_A tiene como sustrato a todas las monoaminas (DA, NA, 5-HT incluyendo la tiramina) y es inhibida por bajas concentraciones de clorgilina (Hall *et al.*, 1969). La MAO_B tiene mayor afinidad por feniletilamina y benzilamina, y es inhibida por bajas concentraciones de L-Deprenil (Knoll y Magyar, 1972). DA es sustrato tanto para MAO_A y MAO_B (Lamensdorf *et al.*, 1996).

La DA liberada en la hendidura sináptica es sustrato para la enzima catecol-*O*-metil transferasa (COMT), produciendo 3-metoxitiramina (3-MT) o 3-metoxidopamina que luego es deaminada para producir ácido homovanílico (HVA). DOPAC es también sustrato para la COMT, llevando a la formación de HVA.

DOPAC y HVA se encuentran en el líquido céfalo raquídeo y orina, lo cual proporciona un índice de la liberación de DA, siendo fuente de información con utilidad clínica.

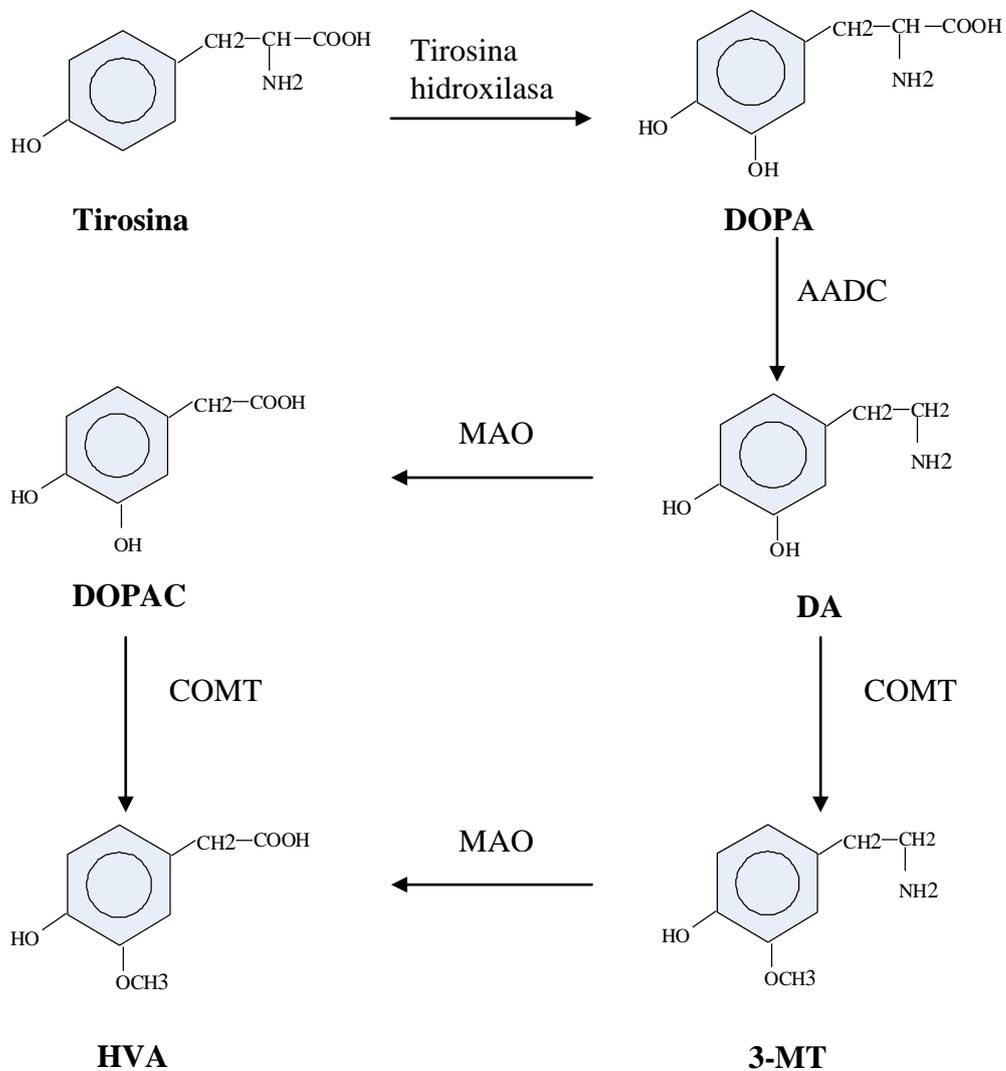


Figura 2: Biosíntesis y catabolismo de la dopamina

DOPA: Levo- dihidroxifenilalanina; DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético; DA: dopamina; HVA: ácido homovanílico; 3-MT: 3-metoxitiramina=3-metoxidopamina; AADC: decarboxilasa de aminoácidos aromáticos; MAO: monoamino oxidasa; COMT: catecol-O-metil transferasa. (Adaptado de: Flórez, J.; Martínez-Lage, J.M. 1984. Neurofarmacología Fundamental y Clínica).

La 5-HT se localiza tanto en células nerviosas, como también en plaquetas, enterocitos cromafines del intestino, células mastoides y glándula pineal donde es el precursor de la melatonina. La 5-HT es sintetizada a partir del aminoácido triptófano, el cual por acción de la triptófano-hidroxilasa es transformado a 5-hidroxitriptófano. Esta enzima está presente en las células que contienen 5-HT, exceptuando a las plaquetas. Posteriormente 5-hidroxitriptófano es descarboxilado por acción de la enzima AADC originando 5-HT (ver figura 3), que finalmente es almacenada en vesículas pre-sinápticas en la terminal, o se acumula en el citosol. Cabe mencionar que existe una isoforma de la triptófano-hidroxilasa que se expresa exclusivamente en el cerebro (Tript H-2) (Walther y Bader, 2003).

Al igual que la DA, la 5-HT liberada al espacio sináptico es recaptada por una proteína transportadora específica conocida como SERT, blanco de la acción de diversos fármacos que se utilizan como antidepresivos. Por acción de la enzima MAO_A, la 5-HT es metabolizada a 5-hidroxiindolacetaldehído (Kato *et al.*, 1986), el que posteriormente es oxidado por una enzima aldehído-deshidrogenasa dando origen al principal metabolito de la 5-HT, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (ver figura 3). El 5-HIAA se excreta por el líquido céfalo raquídeo y/u orina, y sirve como un indicador de la producción de 5-HT en el organismo.

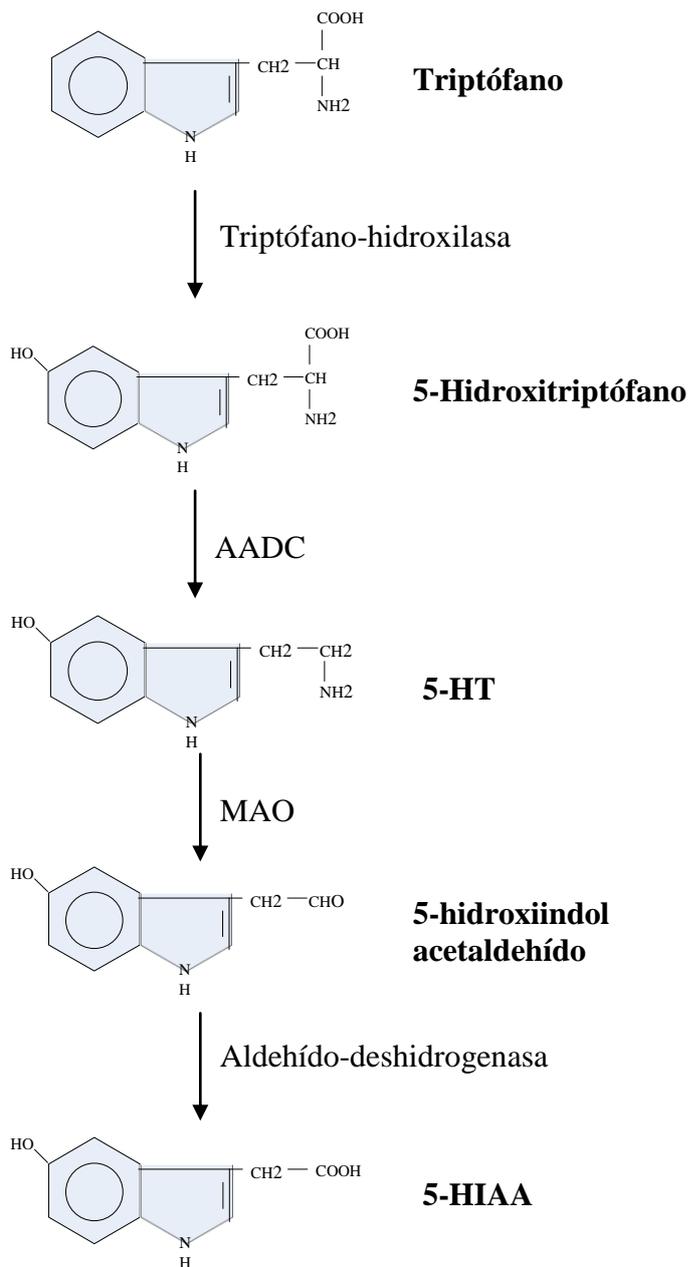


Figura 3: Biosíntesis y catabolismo de la serotonina

5-HT: serotonina; 5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético; AADC: decarboxilasa de aminoácidos aromáticos; MAO: monoamino oxidasa. (Adaptado de: Rang, H.P.; Dale, M.M. 1995. Farmacología. Segunda Edición).

2.2. Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa de importancia clínica a nivel mundial, luego de la enfermedad de Alzheimer. Desde que en 1817 James Parkinson publicó la monografía “Ensayo sobre la parálisis agitante”, hasta los primeros años de la década de los años 60 en que se establece el defecto neurobioquímico de la enfermedad de Parkinson (Hornykiewicz, 1963), se produce un cúmulo de datos neuropatológicos que dan cuenta del grave déficit de DA observado en pacientes que padecen la enfermedad.

Hoy en día se sabe con certeza que el déficit dopaminérgico estriatal es producto de la degeneración o muerte neuronal que ocurre en la *substantia nigra*, donde se ubican los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas que envían sus axones en forma ascendentes, para inervar al neostriado. La neurodegeneración de la vía nigrostriatal, corresponde al principal rasgo fisiopatológico de la enfermedad de Parkinson (Hornykiewicz, 2002).

En la enfermedad de Parkinson, las manifestaciones clínicas recién aparecen cuando los niveles de DA en el neostriado disminuyen en un 80%. La disminución de la concentración de DA en el área principal de proyección de estas neuronas, se relaciona con los síntomas motores característicos de la enfermedad que incluyen bradikinesia, akinesia, temblor y rigidez.

Entre los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad de Parkinson se han propuestos: (i) déficit bioenergético; (ii) acumulación de radicales libres; (iii) excitotoxicidad; (iv) toxicidad mediada por calcio; y (v) fenómenos apoptóticos. Sin embargo, la causa primaria que desencadena la muerte celular es aún desconocida. El envejecimiento parece ser el único factor de riesgo ampliamente aceptado, y que coincide con la mayoría de los procesos neurodegenerativos.

Se ha sugerido una conexión entre enfermedades neurodegenerativas y la presencia de varios agentes químicos, tales como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Gerlach *et al.*, 1991), metales como el fierro (Gerlach *et al.*, 1994), manganeso (Barbeau, 1984; Archibald y Tyree, 1987; Lloyd, 1997) y cobre (Paris *et al.*, 2001).

Se ha propuesto que el estrés oxidativo está implicado en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson (Adams y Odunze, 1991; Fahn y Cohen, 1992; Jenner y Olanow, 1998), una teoría que ha sido verificada al analizar muestras histopatológicas de pacientes que han padecido la enfermedad y donde se ha detectado daño oxidativo en

lípidos de membrana (Dexter *et al.*, 1989; Dexter *et al.*, 1994), ácido desoxirribonucleico (DNA) y proteínas de células nerviosas (Alam *et al.*, 1997). Sin embargo, hasta el día de hoy no se sabe exactamente la fuente de formación de radicales *in vivo*, ni tampoco el mecanismo molecular de este proceso degenerativo.

2.2.1. Radicales libres

A nivel celular debe existir un equilibrio entre la generación de radicales libres y los sistemas defensivos antioxidantes. Cuando el balance es alterado a favor de la generación de radicales libres, por un aumento de metabolismo, o por depleción de los sistemas de defensa antioxidantes, el estrés oxidativo se hace presente (Halliwell, 1992 a,b).

Los radicales libres son sustancias que poseen un electrón desapareado en su último orbital. Cuando estos radicales reaccionan con otras sustancias, se forman otros compuestos oxidantes, generando una reacción en cadena. Esta reacción en cadena puede ser interrumpida por antioxidantes como el ascorbato (vitamina C) y tocoferol (vitamina E). Una de las cadenas de reacción más estudiadas que involucra a radicales libres es la peroxidación lipídica, la cual se ha postulado como una de las causas del daño neuronal en las enfermedades neurodegenerativas (Halliwell y Gutteridge, 1984; Olanow, 1993; Jenner, 1994).

2.2.2. Auto-oxidación de catecolaminas en el SNC

Las catecolaminas deben su nombre a que contienen un grupo catecol (1,2-dihidroxibenceno) como parte integral de su estructura química. Las catecolaminas son muy susceptibles de sufrir reacciones de tipo oxidativo en presencia de oxígeno, metales y enzimas, sobre todo a pH fisiológico (Graham, 1978; Segura-Aguilar, 1996).

La DA sintetizada en las neuronas dopaminérgicas es almacenada dentro de las vesículas pre-sinápticas y se protona en presencia de H^+ . Una cantidad de la DA sintetizada *de novo* permanece en el citosol neuronal, siendo metabolizada por la MAO_A, anclada en las mitocondrias. Esta reacción genera DOPAC y también peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La formación de H_2O_2 es muchas veces acompañada de la generación de radicales libres superóxidos (O_2^-) y de radicales hidroxilos (OH^\cdot) (Graham, 1984). Existe la posibilidad de que una parte de la DA aún presente en el citosol se auto-oxide formando *O*-quinona, (aminocromo). A su vez el aminocromo puede dar paso a la formación de neuromelanina (ver figura 4). La neuromelanina es

abundante en células catecolaminérgicas de la *substantia nigra*, *locus coeruleus*, que contienen DA y NA respectivamente. La función de la neuromelanina en el cerebro es aún desconocida, pero se ha propuesto que puede unirse selectivamente a ciertos compuestos químicos (Hirsch *et al.*, 1988).

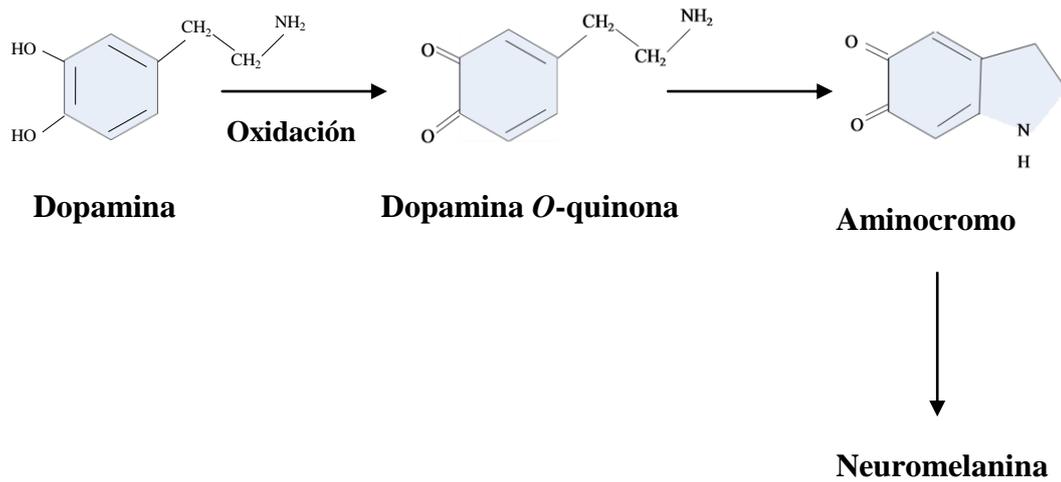


Figura 4: Auto-oxidación de DA: La oxidación de DA es seguida de ciclización de la cadena amídica formando aminocromo (*O*-quinona) (Adaptado de: Baez, S. 1999. Thesis, Stockholm's University).

Aminocromo es reducido por un electrón a una *O*-semiquinona por la enzima NADPH-citocromo P450 reductasa (Baez *et al.*, 1995; Segura-Aguilar *et al.*, 1998) (ver figura 5).

La *O*-semiquinona es extremadamente reactiva ya que se auto-oxida fácilmente, reduciendo oxígeno a un radical O_2^- . Esta auto-oxidación da paso a un ciclo redox, ya que la *O*-semiquinona se auto-oxida a aminocromo, y esta se reduce a una *O*-semiquinona. Gracias a este proceso cantidades insignificantes de aminocromo producen enormes cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS), que no alcanzan a ser reducidas. La formación de O_2^- da paso a la generación enzimática o espontánea de H_2O_2 , que es un precursor para la formación de radical OH^- capaz de reaccionar con todas las biomoléculas.

Aunque, NADPH-citocromo P450 reductasa se encuentra localizada en neuronas del sistema dopaminérgico de la *substantia nigra* (Haglund, 1984), no se puede descartar la participación de otras flavoproteínas en la reducción del aminocromo. Es interesante destacar también que las enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa, que actúan frente a la formación de radicales O_2^- y H_2O_2 respectivamente, juegan un claro papel pro-oxidante al aumentar la velocidad de auto-oxidación de *O*-semiquinona.

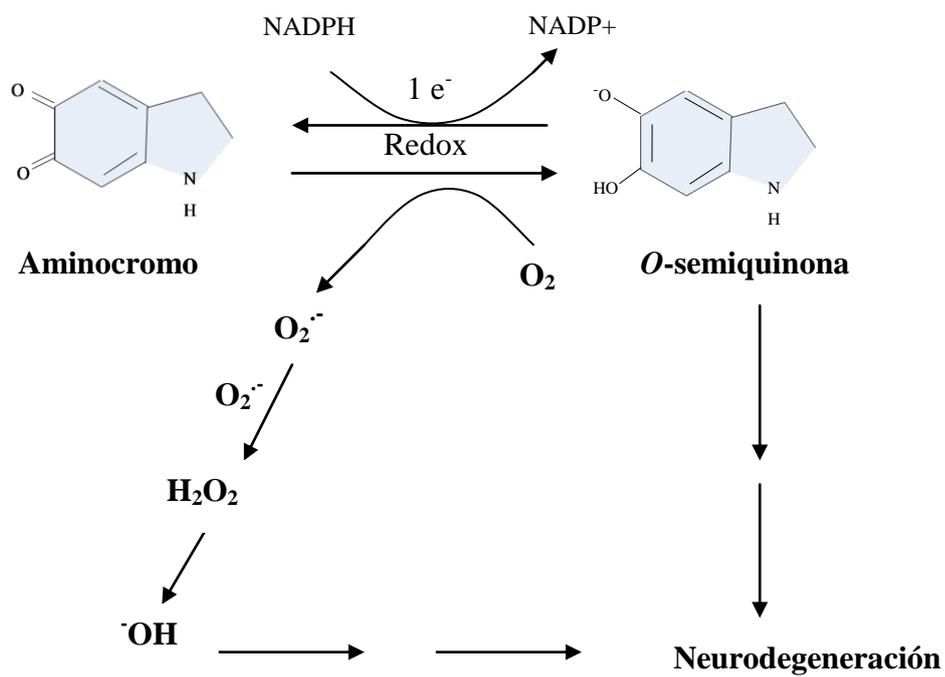


Figura 5: Reducción de aminocromo por transferencia de un electrón y formación de *O*-semiquinona con la participación de la enzima NADPH-citocromo P450 reductasa (Adaptado de: Baez, S. 1999. Thesis, Stockholm's University).

Estudios *in vitro* han demostrado que DA y L-DOPA producen neurotoxicidad y apoptosis en diferentes líneas celulares como timocitos, células catecolaminérgicas y neuronas (Lai y You, 1997; Walkinshaw y Waters, 1995). Se ha sugerido que luego del tratamiento con L-DOPA, se produce en el citosol un exceso de DA que puede sufrir una oxidación tanto enzimática como no enzimática, llevando a la producción de ROS, que conducen a la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Sulzer y Zecca, 2000).

2.2.3. Enzimas antioxidantes neuroprotectivas

Se ha propuesto que existen enzimas que juegan un claro papel antioxidante y neuroprotector frente al exceso de catecolaminas libres en el citosol (Asanuma *et al.*, 2003). Un ejemplo es DT-diaforasa o NAD(P)H quinona-oxidoreductasa que cataliza la reducción de aminocromo con dos electrones a una *O*-hidroquinona, sustancia inocua que se elimina fisiológicamente (ver figura 6).

La DT-diaforasa, es un dímero de subunidades idénticas que contienen un grupo prostético. Se encuentra en el citosol, al interior de la mitocondria y en el retículo endoplásmico. En el cerebro de rata, DT-diaforasa ha sido localizada en el sistema dopaminérgico de la *substantia nigra* y del estriado, tanto en el cuerpo celular como en los axones y dendritas, como también en astrocitos (Schultzberg *et al.*, 1988). Es la única enzima que cataliza la reducción de quinonas con dos electrones, y constituye entre un 80 a 90 % de la capacidad reductiva enzimática total en diferentes regiones del cerebro de rata (Segura-Aguilar *et al.*, 1987). Estudios *in vitro* han demostrado que DT-diaforasa es inhibida por un derivado cumarínico, llamado dicumarol (3,3'-metileno-bis (4-hidroxycumarina)) (Lind *et al.*, 1982; Schultzberg *et al.*, 1988; Segura-Aguilar y Lind, 1989; Paris *et al.*, 2001).

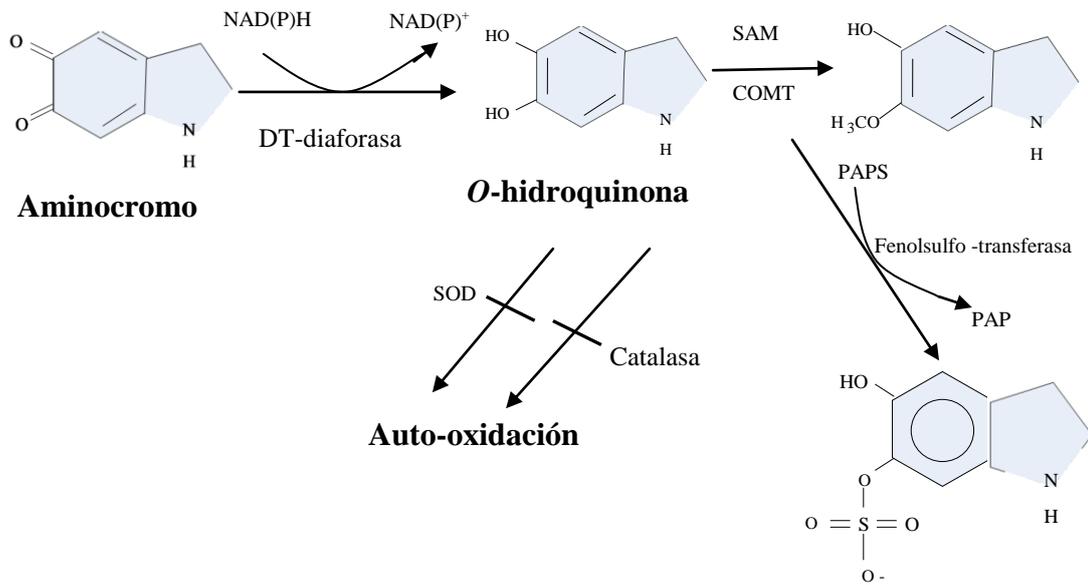


Figura 6: Reducción de aminocromo por transferencia de 2 electrones, con la participación de la enzima DT-diaforasa o NAD(P)H quinona-oxidoreductasa (Adaptado de: Baez, S. 1999. Thesis, Stockholm's University).

La reducción de aminocromo con DT-diaforasa a una *O*-hidroquinona también resulta en un ciclo redox ya que este producto se auto-oxida en la presencia de oxígeno. Sin embargo, su velocidad de auto-oxidación es marcadamente inferior a la de aminocromo *O*-semiquinona y es, además, inhibida por la enzima SOD y catalasa. El papel de estas enzimas antioxidantes durante la reducción de aminocromo por DT-diaforasa es totalmente opuesto al que juegan durante la reducción de aminocromo con un electrón catalizada por NADPH-citocromo P450 reductasa (Segura-Aguilar y Lind, 1989; Baez *et al.*, 1995). SOD y catalasa inhiben la auto-oxidación de aminocromo *O*-hidroquinona actuando directamente sobre el ión O_2^- y H_2O_2 . Es también importante mencionar de que aminocromo *O*-hidroquinona puede ser conjugada con sulfotransferasas que impiden su participación en reacciones redox, facilitándose de esta manera su excreción celular (Ernster, 1987).

En resumen la presencia de DT-diaforasa puede ser particularmente importante en el cerebro cuando el metabolismo de las catecolaminas es exagerado. Por esto se ha propuesto que el metabolismo del aminocromo a través de la DT-diaforasa tendría efectos detoxificadores y una acción neuroprotectora, evitando la reducción del aminocromo por un sólo electrón, la producción de ROS y el consecuente daño celular (Segura-Aguilar y Lind, 1989; Baez *et al.*, 1995; Segura-Aguilar *et al.*, 2001; 2002).

Por otra parte existen otras enzimas que juegan un rol importante en el sistema defensivo contra los radicales libres. La SOD, constituye la primera línea defensiva contra los O_2^- , para formar H_2O_2 :



Se ha demostrado que SOD constituye un mecanismo de defensa contra la toxicidad mediada por la formación de quinonas, previniendo la formación de ROS (Cadenas *et al.*, 1988).

La enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) también juega un rol en la protección celular contra el daño provocado por la formación de H₂O₂ al interior de la mitocondria o en el citoplasma celular. El H₂O₂ es removido a bajas concentraciones, al reaccionar con glutatión reducido (GSH) para formar glutatión oxidado (GSSG) y H₂O:



El GSH-Px previene la propagación de las reacciones en cadena en que se ven involucrados los radicales libres, y que son responsables en gran medida de la peroxidación lipídica y de la desestabilización de la membrana celular.

El glutatión reducido (GSH) es regenerado por acción de glutatión reductasa (GSH-Reductasa) mediante la siguiente reacción:



GSH es importante ya que protege contra el estrés oxidativo, removiendo H₂O₂, y previniendo de esta forma, la formación de más radicales de oxígeno como los radicales OH⁻ que provocan severo daño celular (Sulzer y Zecca, 2000).

2.3. Tratamiento de la Enfermedad de Parkinson

La determinación del déficit dopaminérgico, como producto de la neurodegeneración de vía nigrostriatal (Hornykiewicz, 1963; Bernheimer, 1963), dio paso a un sinnúmero de esfuerzos, con el objetivo de suplir el déficit de DA. Desde entonces el abordaje terapéutico ha sido sólo sintomático, y orientado a la administración de: (i) precursores de DA (e.g. Levo-dihidroxifenilalanina (L-DOPA); (ii) fármacos que aumentan la biodisponibilidad del precursor exógeno (e.g. benzerasida, metil-DOPA, entacapone, tolcapone); (iii) agonistas dopaminérgicos (e.g. bromocriptina, pergolida, lisurida, cabergolina, pramipexol); (iv) inhibidores del catabolismo de la DA (e.g. L-Deprenil).

2.3.1. L-DOPA:

Considerando que la DA por sus características químicas no atraviesa la barrera hematoencefálica, y que en la enfermedad de Parkinson los niveles de la enzima TH están disminuidos, varios investigadores ensayaron la administración de precursores de DA. En este ámbito, se destacan los trabajos de Cotzias (USA) y Barbeau (Canadá) quienes iniciaron la administración oral de L-DOPA a fines de la década de los años sesenta, que permitió hacer un “by-pass” a la enzima limitante TH, lo que respalda su aplicación en la farmacoterapia. Este hecho marcó el inicio de una nueva etapa en el tratamiento de esta enfermedad.

Los buenos resultados obtenidos en primera instancia permitieron administrar L-DOPA, restituyendo los niveles de DA necesarios para activar receptores dopaminérgicos supersensitivos a consecuencia de su de-aferentación. El tratamiento con L-DOPA revierte los síntomas de la enfermedad, principalmente la bradikinesia y la rigidez. Sin embargo, otros síntomas como el temblor sólo se reducen levemente (Yahr *et al.*, 1969; Fahn, 1999). Su acción terapéutica, si bien racional y asentada sobre bases fisiopatológicas, demuestra no detener el curso natural de la enfermedad de Parkinson.

Los resultados terapéuticos con L-DOPA demuestran que un buen número de pacientes después de haberse vistos beneficiados por algunos años en el manejo de la sintomatología clínica, comienzan a perder de manera gradual y progresiva su respuesta al tratamiento, por ello al cabo de 4-5 años la terapia es menos eficiente. El cuadro clínico clásico puede ser modificado por la aparición de nuevas manifestaciones motoras y complejos efectos adversos producto de la levoterapia crónica, fenómeno conocido como “long-term syndrome”. Es posible observar fluctuaciones motoras, fenómenos denominados “on-off”, caracterizados por la aparición y desaparición brusca e impredecible de períodos de akinesia y/o inmovilidad a lo largo del día. También aparecen otros fenómenos conocidos como “wearing-off”, llamado también deterioro de fin de dosis. Estas manifestaciones motoras, que aparecen en general luego de años de tratamiento y que se instalan luego de un período de estabilización de la enfermedad, producen un difícil manejo del paciente.

La DA formada en el cerebro estimula todos los receptores dopaminérgicos, particularmente los supersensitivos localizados en el neostriado y *substantia nigra*, dando cuenta de una adecuada compensación en los circuitos de los ganglios basales. Las neuronas nigrales sobrevivientes a la neurodegeneración poseen un elevado

metabolismo, lo que explica que en las etapas iniciales de la enfermedad la capacidad de sintetizar DA a partir del precursor L-DOPA esté aumentada. Con el avance de la degeneración nigral y la consiguiente disminución de terminales dopaminérgicas en el neostriado, el efecto terapéutico de L-DOPA depende cada vez más de su descarboxilación a DA en las terminaciones serotoninérgicas y noradrenérgicas estriatales que provienen del *raphe* dorsal, y el núcleo *coeruleus*, respectivamente.

Se ha propuesto por otra parte que la sobrecarga de DA producida por la administración crónica de L-DOPA acelera la progresión de la enfermedad, debido a mecanismos auto-oxidativos (Fahn, 1997; Kostrzewa *et al.*, 2002; Asanuma *et al.*, 2003) que llevan a la formación de ROS y/o especies de nitrógeno. Además la cantidad excesiva de DA en el citosol es rápidamente oxidada produciendo radicales libres que pueden provocar la muerte de neuronas dopaminérgicas que han sobrevivido (Sulzer y Zecca, 2000).

Para reducir la presentación de posibles complicaciones, se ha intentado la administración de L-DOPA a dosis bajas y retrasando su uso lo más posible (Yahr *et al.*, 1969; Chouza *et al.*, 1975; Rinne, 1983).

Por otra parte L-DOPA sufre un amplio metabolismo periférico a través de descarboxilación y *O*-metilación. La consecuencia inmediata es una corta $t_{1/2}$ de L-DOPA. Además, se produce un exceso de DA en el compartimiento periférico que trae consigo gran cantidad de efectos colaterales (e.g. náuseas, vómitos, taquicardias, arritmias). En la práctica habitual la biodisponibilidad y $t_{1/2}$ puede aumentar con la administración de un inhibidor de AADC periférica (e.g. benserazida, carbidopa).

La *O*-metilación de L-DOPA que efectúa COMT, una enzima ampliamente distribuida en el organismo, da como producto 3-*O*-metildopa (3-OMD), que no puede ser transformada a DA. Desde el punto de vista terapéutico, L-DOPA metabolizada por esta vía es desperdiciada. Entacapone y tolcapone son drogas que inhiben en forma potente, selectiva y reversible la COMT periférica, reduciendo significativamente la *O*-metilación de L-DOPA. Por ello, son administradas junto con L-DOPA, consiguiendo un incremento de su concentración en plasma (Männistö y Kaakkola, 1990), traduciéndose en una disminución de su dosis. Entacapone, de $t_{1/2}$ corta y baja penetración a través de la barrera hematoencefálica aumenta la biodisponibilidad de L-DOPA en el compartimiento cerebral. Tolcapone atraviesa la barrera hematoencefálica y tiene efecto prolongado, por lo que aumenta la $t_{1/2}$ de la DA cerebral.

2.3.2. Agonistas dopaminérgicos:

Los agonistas dopaminérgicos son de gran utilidad en el manejo farmacológico de pacientes parkinsonianos en estados avanzados, especialmente cuando aparecen fuertes fluctuaciones motoras. Entre los diversos agonistas dopaminérgicos existen diferencias en cuanto a los mecanismos de acción, selectividad y eficacia que ejercen sobre distintos tipos de receptores dopaminérgicos, como también en sus características farmacocinéticas.

Algunos alcaloides derivados del ergot han demostrado ser potentes agonistas dopaminérgicos, estimulando directamente receptores post-sinápticos. Sin embargo, la estructura química del ergot puede originar efectos secundarios indeseables, como edema refractario en extremidades inferiores, fibrosis pleuropulmonar o retroperitoneal, etc. No obstante, aquellos con reducida toxicidad sistémica poseen un gran valor como antiparkinsonianos. Un fármaco que ha sido utilizado por largo tiempo y que posee comprobada eficacia como antiparkinsoniano es la bromocriptina (2-bromo- α -ergocriptina metanosulfonato), que además ha sido utilizado como prototipo para otros derivados ergolínicos, como pergolida, lisurida y cabergolina. En contraste con los agonistas dopaminérgicos ergolínicos, existe otro grupo de fármacos que no provocan los efectos secundarios derivados de la molécula del ergot. Entre estos se encuentran: apomorfina, ropinirol y pramipexol (Herrera-Marschitz *et al.*, 2007).

2.3.3. Inhibidores del catabolismo de la DA:

L-Deprenil (L-isómero de N-propinil-metanfetamina) también llamado selegilina fue desarrollado en la década de los años 60 (Knoll *et al.*, 1965). En bajas concentraciones posee un efecto selectivo sobre la isoforma B de la MAO a la cual inhibe de forma irreversible (Knoll y Mayar, 1972; Knoll, 1979), sin embargo también inhibe la isoforma MAO_A. Estudios en ratas han demostrado que la administración de L-Deprenil produce un aumento de los niveles de DA y 5-HT (Cesura y Pletscher, 1992). Por ello, se ha propuesto a L-Deprenil como coadyuvante del tratamiento con L-DOPA en la enfermedad de Parkinson de curso temprano (Mann y Gershon, 1980).

En el neostriado la MAO_B se encuentra localizada en astrocitos, y participa en la degradación de la DA extracelular. La capacidad de L-Deprenil de inhibir MAO conduce a una disminución del metabolismo de DA y otras catecolaminas y a una reducción de la producción de H₂O₂. Se ha sugerido sobre la base de estudios

experimentales (Cohen *et al.*, 1984) y clínicos (Birkmayer *et al.*, 1985; Tetrad y Langston, 1989) que L-Deprenil tiene efectos neuroprotectivos. Por ello, el uso de L-Deprenil se ha extendido, tanto por el efecto sintomático que ejerce en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, como por su potencial acción neuroprotectora (Knoll, 2000). Se ha propuesto que L-Deprenil aumenta la propagación del impulso nervioso al prolongar la biodisponibilidad de catecolaminas endógenas (Knoll *et al.*, 1996).

2.4. Modelos experimentales para el estudio de la Enfermedad de Parkinson

Para estudiar la eficacia de diversos compuestos terapéuticos (Hoehn y Yahr, 1967; Gerlach *et al.*, 2003), es necesario contar con modelos animales experimentales de la enfermedad de Parkinson. Una herramienta ampliamente usada es la denervación inducida por la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en ratas (Ungerstedt, 1971c), o la administración sistémica de MPTP en primates (Schultz, 1988; Jenner *et al.*, 1987).

La 6-OHDA es selectivamente tóxica para las células catecolaminérgicas *in vivo* y por lo tanto se utiliza extensamente para producir modelos animales que imitan la condición de la enfermedad de Parkinson (Ungerstedt, 1968; Ungerstedt 1971c,d; Ungerstedt y Arburthnott, 1970; Kostrzewa y Jacobowitz, 1974; Cadet *et al.*, 1989; Kumar *et al.*, 1995; Hirsch *et al.*, 2003; Herrera-Marschitz *et al.*, 2007).

La administración estereotáxica de 6-OHDA en el sistema dopaminérgico nigrostriatal produce una lesión, dosis-dependiente (Ungerstedt, 1968, 1971c,d). 6-OHDA puede entrar al interior de la neurona dopaminérgica vía proteínas transportadoras de catecolaminas (Jonson y Sachs, 1970), que incluyen a la proteína DAT. Este transportador incorpora 6-OHDA al interior de la terminal y desencadena un proceso auto-oxidativo en el citoplasma de las neuronas dopaminérgicas, y finalmente su destrucción (Ungerstedt, 1968, 1971c,d).

La inyección bilateral de 6-OHDA en la *substantia nigra*, o en el paquete de axones que asciende monosinápticamente desde la *substantia nigra* al telencéfalo (MFB), produce en la rata una depleción dopaminérgica bilateral, manifestándose un síndrome conductual caracterizado por severa akinesia, pérdida de capacidad exploratoria, afagia y adipsia, que conduce a la muerte del animal si no se le alimenta artificialmente (Ungerstedt, 1971c,d). El desarrollo de los síntomas se correlaciona con la extensión de la degeneración del sistema dopaminérgico nigrostriatal, y es revertido con la administración de agonistas dopaminérgicos (Ljungberg y Ungerstedt, 1976 a, b).

Dado que la vía nigrostriatal dopaminérgica es lateralizada, una inyección unilateral de 6-OHDA puede producir una desviación postural (ipsilateral) que refleja la dominancia del sistema nigrostriatal intacto (Herrera-Marschitz y Ungerstedt 1984a; 1984b), lo que se transforma en un intenso movimiento rotatorio toda vez que el animal es tratado con fármacos que: (i) aumentan la liberación de DA (e.g. anfetamina (D-AMPH)); (ii) inhiban su recaptación (e.g. nomifensina); (iii) inhiban su metabolización una vez que la DA es liberada desde el sistema nigrostriatal intacto (e.g. pargilina) (Herrera-Marschitz *et al.*, 2007). Esta conducta se revierte, y se transforma en intensa rotación contralateral, toda vez que el mismo animal es tratado con agonistas dopaminérgicos directos (e.g. apomorfina, bromocriptina, pergolida). En este caso, la droga actúa directamente en receptores dopaminérgicos post-sinápticos que han desarrollado supersensibilidad a consecuencia de su de-aferentación (Ungerstedt, 1971c, e). Estas observaciones llevaron a establecer el modelo de rotación, que cuantifica los giros del animal hacia la derecha y/o izquierda, rotación ipsi y/o contralateral inducida por fármacos (Ungerstedt y Arbuthnott, 1970; Herrera-Marschitz y Ungerstedt 1984a,b; Herrera-Marschitz *et al.*, 2007). Para la evaluación de la conducta rotacional se utiliza un instrumento que se conoce con el nombre de rotómetro o sensor de rotación (ver Figura 7). Este instrumento, conectado a un sistema de integración, registra los giros que realiza la rata en un determinado período de tiempo. El modelo de rotación puede proporcionar excelente información cuantitativa acerca de la potencia y la cinética de los efectos de drogas que actúan en los sistemas dopaminérgicos.

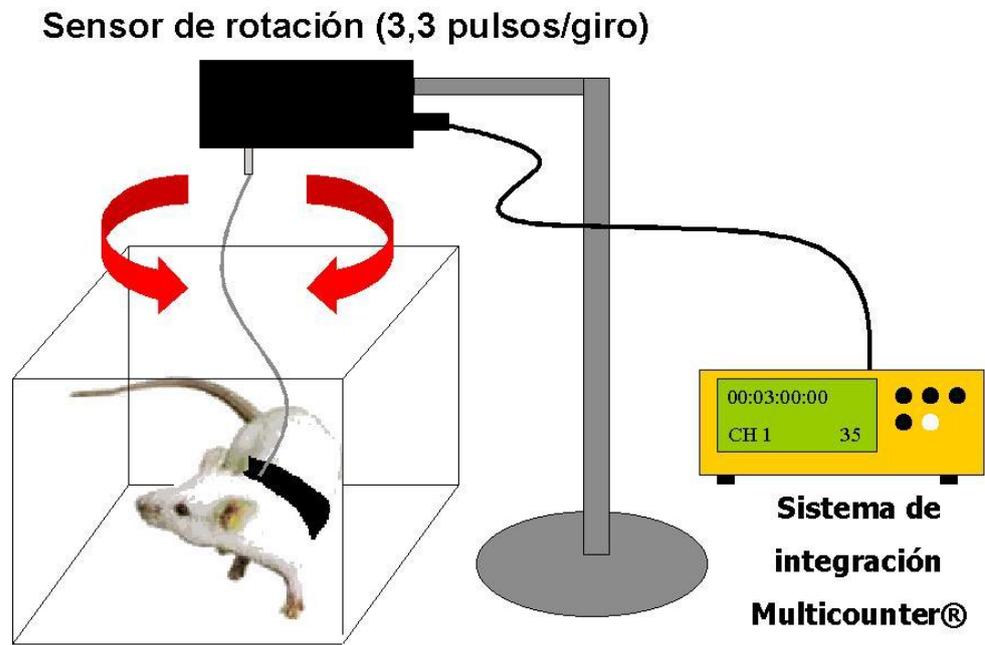


Figura 7: Esquema del equipamiento para evaluar conducta rotacional en ratas. (Adaptado de: Romero, C. 2005.Tesis, Universidad de Chile).

3. PROPÓSITO DE LA INVESTIGACIÓN

Esta investigación estuvo dirigida a evaluar la importancia de las vías no-canónicas del metabolismo de la DA en el SNC de la rata, *in vivo*.

Para ello, se optó investigarlo en un modelo experimental establecido de la enfermedad de Parkinson (Ungerstedt, 1971c,d; Herrera-Marschitz, 1986), de gran utilidad para estudiar las vías nerviosas y metabolismo de neurotransmisores de los ganglios basales. El modelo de hemiparkinson experimental permite evaluar en una misma preparación el hemisferio cerebral intacto y el lesionado, luego de una inyección estereotáxica de 6-OHDA en una vía nigrostriatal.

Con esta preparación se evaluó el efecto de dicumarol, un fármaco inhibidor del metabolismo no-canónico de la DA. La biodisponibilidad de la DA se estudió luego de pre-tratamiento sistémico con L-DOPA (Hornykiewicz, 2002) y/o el inhibidor de la MAO, L-Deprenil (Knoll *et al.*, 1996).

4. HIPÓTESIS

El bloqueo de la DT-diaforasa modifica la biodisponibilidad y metabolismo de la DA en el cerebro de ratas pre-tratadas con L-DOPA y/o L-Deprenil.

5. OBJETIVOS

General

Estudiar la liberación y metabolismo de monoaminas en el neostriado de rata luego de una de-aferentación dopaminérgica experimental con 6-OHDA, e inhibición de la enzima DT- diaforasa y/o MAO, con o sin precarga con L-DOPA.

Específicos

- Evaluar niveles de DA, 5-HT y sus metabolitos en ratas no lesionadas y de-aferentadas.
- Evaluar los niveles de DA y 5-HT y sus metabolitos en ratas no lesionadas y de-aferentadas luego de pre-tratamiento sistémico con L-DOPA y/o L-Deprenil.
- Evaluar el efecto de la inhibición selectiva de la enzima DT-diaforasa con dicumarol en los niveles de DA, 5-HT y sus metabolitos en ratas no lesionadas y de-aferentadas.
- Evaluar el efecto de la inhibición selectiva de la enzima DT-diaforasa con dicumarol en los niveles de DA, 5-HT y sus metabolitos en ratas no lesionadas y de-aferentadas, luego de pre-tratamiento sistémico con L-DOPA y/o L-Deprenil.
- Comparar los efectos de la perfusión intracerebral de una solución de D-AMPH, en animales controles y pre-tratados sistémicamente con L-DOPA y/o L-Deprenil, o perfundidos con dicumarol y pre-tratados sistémicamente con L-DOPA y/o L-Deprenil.
- Comparar los efectos de la perfusión intracerebral de una solución depolarizante de KCl, en animales controles y pre-tratados sistémicamente con L-DOPA y/o L-Deprenil, o perfundidos con dicumarol y pre-tratados sistémicamente con L-DOPA y/o L-Deprenil.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Animales

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) albinas de la línea UChA, derivada de una cepa Wistar, todas de sexo masculino y pesos entre 150-170 g al momento de la cirugía estereotáxica que permitió la lesión química con 6-OHDA. Los animales permanecieron con libre acceso a comida y agua, con un ciclo de luz:oscuridad (12:12h) y temperatura regulada a 21°C.

Los animales lesionados con 6-OHDA fueron utilizados posteriormente para los estudios de microdiálisis *in vivo*.

6.2. Modelo de hemiparkinson experimental: cirugía estereotáxica y lesión química de la vía nigrostriatal

Se utilizó cirugía estereotáxica para realizar la lesión unilateral (izquierda) de la vía dopaminérgica nigrostriatal. Esta técnica permite un acercamiento preciso a estructuras profundas del cerebro.

La cirugía estereotáxica requiere del montaje de la rata en un equipo estereotáxico, dispositivo mecánico que inmoviliza totalmente la cabeza del animal (ver figura 8). Previamente a este manejo, se administró a cada rata 0.8 ml de una solución de hidrato de cloral al 7% por vía i.p. facilitando de este modo su montaje. Luego se fijó a la rata una máscara nasal de anestesia mantenida con isoflurano. Para fijar el cráneo del animal se insertó una barra en cada conducto auditivo externo (barras interaurales), adicionalmente los incisivos superiores se fijaron en un dispositivo horizontal (barra de incisivos) para lograr la absoluta inmovilización de la cabeza. Una vez realizado el montaje de la rata en el equipo estereotáxico, se procedió a la aplicación de anestésico local (lidocaína) sobre la cabeza (área de incisión).

Bajo la administración de isoflurano y luego de la aplicación de lidocaína, se realizó con un bisturí, una incisión en piel en dirección anteroposterior. Se retiró lateralmente el periostio para una correcta exposición del cráneo. Se identificó como punto de referencia el Bregma (ver figura 9), que corresponde a la intersección de la sutura coronal y sagital, y que permite localizar cualquier estructura anatómica del cerebro mediante el cálculo de coordenadas registradas en un atlas estereotáxico (Paxinos y Watson, 1997). Para cada área cerebral y a un peso determinado, el atlas proporciona medidas exactas en las tres direcciones del espacio (anteroposterior (AP), lateral (L) y dorsoventral (DV)).

Para la inyección intracerebral de 6-OHDA, se fijó el *holder* de una jeringa Hamilton (10 μ l) en un brazo del equipo estereotáxico. Usando el micromanipulador se ubicó el extremo de la jeringa sobre Bregma, y se registraron las coordenadas. Sobre estos puntos estereotáxicos registrados, se les sumó en el eje AP - 4.4 mm, en el eje L - 1.3 mm y en el eje DV - 7.8 mm (Bregma AP - 4.4; L - 1.3; DV - 7.8). Posteriormente se movió el micromanipulador en los ejes AP y L para ubicar el punto de descenso de la jeringa y se perforó el cráneo. A partir de la duramadre, se introdujo con el micromanipulador la jeringa Hamilton hasta el punto que contiene la región proximal de los axones dopaminérgicos nigrostriatales. (Herrera-Marschitz y Ungerstedt, 1984 a; 1984b). Se inyectó 6-OHDA en un volumen total de 4 μ l (8 μ g) (flujo de 1 μ l/min). Para finalizar, se retiró suavemente la jeringa Hamilton y se suturó la incisión realizada. Se permitió la recuperación del animal en un ambiente controlado, antes de retornarlo a su vivero de mantención.

La 6-OHDA (2 mg/ml), fue preparada en solución antioxidante de ascorbato 0.2 mg/ml de solución salina estéril (NaCl 0.9%), conservada en frío y protegida de la luz (papel de aluminio) para evitar su auto-oxidación.

Durante todo el procedimiento quirúrgico se reguló la temperatura corporal de la rata a 37 °C gracias a la utilización de un termómetro rectal, una camilla con una resistencia eléctrica incorporada y un termostato.

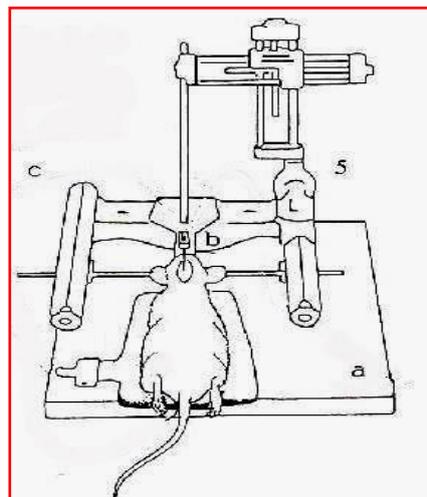


Figura 8: Representación esquemática del montaje de los animales en el equipo estereotáxico (Adaptado de: You, Z-B. 1996. Thesis, Karolinska Institute, Stockholm).

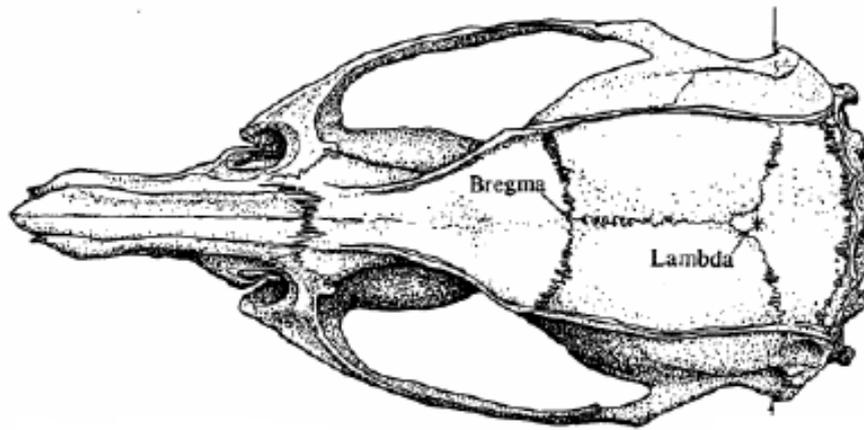


Figura 9: Ilustración esquemática donde se identifica sobre la superficie de cráneo expuesto el punto de referencia conocido como Bregma. (Paxinos y Watson. 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press. Fourth edition).

6.3. Ensayos conductuales en las ratas lesionadas

Dos semanas después de la lesión química se verificó la efectividad de la lesión. Para tal propósito se utilizó un rotómetro. Las ratas se colocaron en un arnés de Velcro® conectado por un alambre semi-rígido a un sensor de rotación (sensibilidad 3.3 pulsos/vuelta), y a un sistema de integración Multicounter® (LE 3806 de Letica Sci. Instruments), programado para una observación durante 3 h (180 min), con intervalos de 10 min y con un período de latencia de 10 min antes de la inyección de apomorfina (APO 0.05 mg/kg, s.c.) (Apoteksbolaget, Suecia). La APO se preparó en solución salina (NaCl 0.9%) y se administró a los animales usando jeringas de 1 ml y agujas 25G, en soluciones 1 ml/kg rata (~0.25 ml cada rata, s.c.). Los resultados de la integración (pulsos o vueltas) se trasladaron a un computador donde se procesaron mediante una planilla de cálculos Excel®. Las ratas que no exhibieron ningún patrón de rotación significativo (≤ 2.7 giros contralaterales en promedio cada 10 min) con APO fueron excluidas del estudio.

6.4. Microdiálisis cerebral

Una de las principales aplicaciones de la técnica de microdiálisis, en el ámbito de la neurociencia, es la realización de estudios en los cuales se monitorea la liberación de neurotransmisores y otras sustancias en el cerebro de animales conscientes (Ungerstedt, 1991; Herrera-Marschitz *et al.*, 2007). Esta técnica permite estimar la liberación de neurotransmisores y sus metabolitos, para estudiar los cambios inducidos en ellos por drogas, que pueden ser perfundidos a través de la sonda de microdiálisis o ser administradas por vía sistémica.

La microdiálisis cerebral *in vivo* utiliza sondas que han sido diseñadas de manera que se asemejen a un capilar sanguíneo, hechas de dos tubos concéntricos de acero inoxidable, tal que el líquido de perfusión entra a través del tubo interno, fluye hasta su extremo distal donde se encuentra una membrana de diálisis. El flujo retorna por el tubo externo (ver Figura 10). La menor longitud del tubo externo (1-5 mm), permite que su extremo distal sea reemplazado por una membrana de diálisis. De esta manera se puede imitar procesos de permeabilidad y difusión que ocurren fisiológicamente. Este sistema acoplado a un método de detección adecuado permite conocer la composición química del espacio extracelular en un tejido donde se introduzca la sonda de microdiálisis (Ungerstedt *et al.*, 1982). Además permite determinar *in situ* las variaciones en los niveles de las sustancias de interés.

La implantación de la sonda en un área cerebral se realiza con la ayuda de un equipo estereotáxico. De este modo a las ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA se les implantó dos sondas de microdiálisis en el neostriado (una para cada hemisferio cerebral).

El manejo realizado, previo y posteriormente al montaje de los animales en el equipo estereotáxico fue similar al descrito para lesionar la vía nigrostriatal. Con la salvedad que en este caso se realizó dos perforaciones en el cráneo, una para cada sonda. Se identificó el punto Bregma y sobre estos puntos estereotáxicos registrados, se les sumó en el eje AP + 0.7; en el eje L \pm 3.2; y en el eje DV - 6.0 (Paxinos y Watson, 1997).

Se utilizaron sondas de microdiálisis del tipo CMA-12 con 0.5 mm de diámetro, y con una membrana semipermeable de 2 mm de longitud. La entrada de la sonda se conectó a una bomba de microinyección CMA/100, con un flujo de perfusión ajustado a 2 μ l/min. La salida se conectó a un colector de fracciones automático CMA/140, tomando muestras simultáneamente de cada hemisferio cerebral cada 30 minutos. Para la administración de fármacos intracerebralmente se utilizó un selector de jeringas CMA/111 que permitió los cambios de medios de perfusión (ver figura 11).

La colección de muestras por microdiálisis cerebral se realizó el mismo día del implante quirúrgico de la sonda, siendo necesario un largo período de estabilización con solución Ringer (pH=6.5-7.0). Se obtuvieron catorce muestras de cada hemisferio, las cuatro primeras correspondieron a los niveles basales, dado por la perfusión con suero Ringer (0-120 min). Las siguientes 6 muestras de dializados correspondieron a los niveles dados por la perfusión con el fármaco inhibidor de la enzima DT-diaforasa (dicumarol) (120-300 min). Posteriormente para la evaluación local de la funcionalidad de las terminales dopaminérgicas y serotoninérgicas se dio un pulso de D-AMPH 100 μ M (300-330 min). Luego se perfundió nuevamente con dicumarol (330-390 min). Finalmente se dio un pulso con KCl 100 mM (390-420 min), a través de las sondas de microdiálisis (ver figura 12).

Una vez recolectada la última muestra, cada rata se eutanasió con una sobredosis de isofluorano.

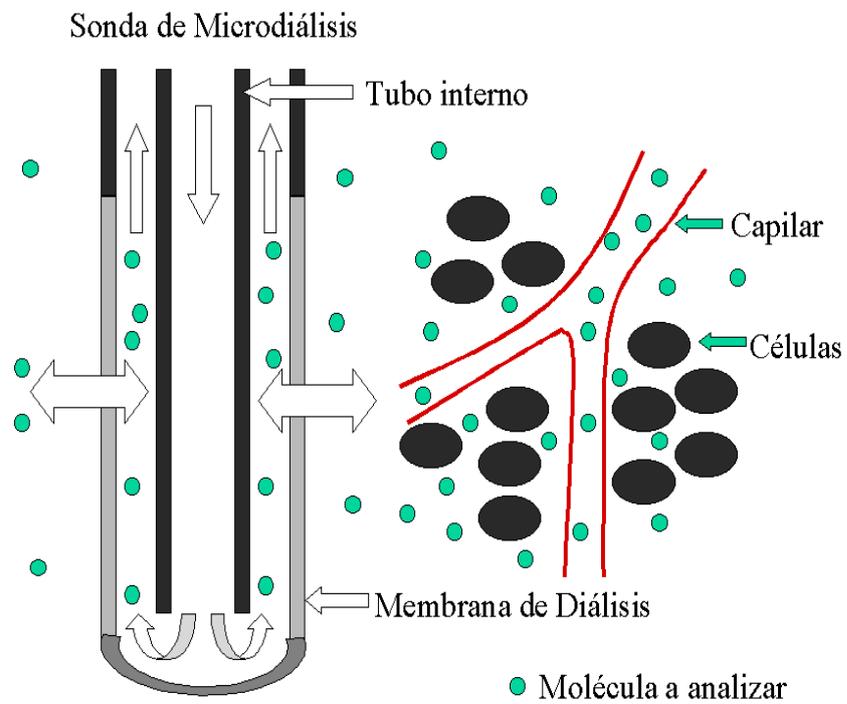


Figura 10: Esquema del mecanismo de intercambio de sustancias en la sonda de microdiálisis (Adaptado de: Catálogo CMA, Solna, Sweden).

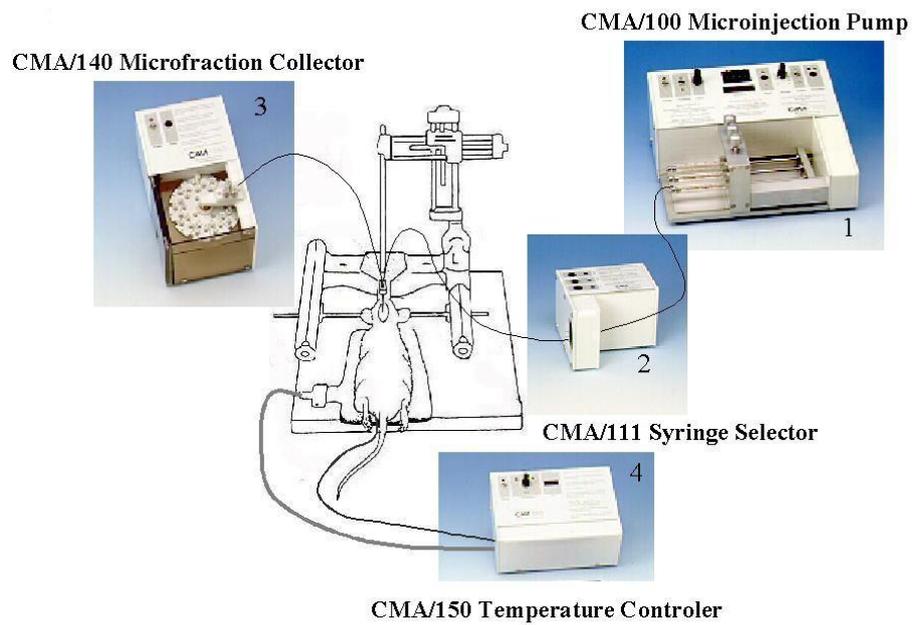


Figura 11: Esquema del equipamiento para experimentos de microdiálisis: (1) bomba de microperfusión CMA/100, (2) selector de jeringas CMA/111, (3) colector de microdializado CMA/140, (4) sistema regulador de temperatura corporal de la rata CMA/150 (Adaptado de: Catálogo CMA, Solna, Sweden).

Figura 12: Protocolo de perfusión intracerebral

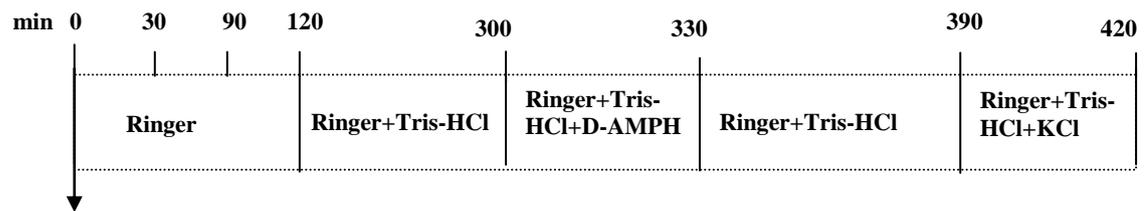
Flujo de Perfusión: 2 μ l/min

Tiempo de colección de cada fracción: 30 min

Volumen de cada fracción: 60 μ l

Total de muestras por cada hemisferio cerebral: 14

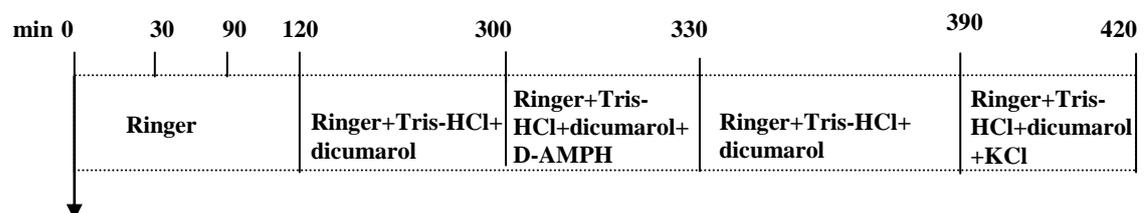
(1) Grupo de perfusión intracerebral con Tris-HCl



Última dosis de pre-tratamiento sistémico

(min 0)

(2) Grupo de perfusión intracerebral con dicumarol



Última dosis de pre-tratamiento sistémico

(min 0)

6.5. Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC)

La cromatografía líquida es una técnica cuyo objetivo es la separación de los distintos compuestos de una mezcla de sustancias, basándose en las diferentes retenciones que experimentan los compuestos de la misma al pasar a través de una fase estacionaria sólida contenida en una columna cromatográfica cuando la muestra está en solución con la fase móvil del sistema. Esta técnica cromatográfica emplea una fase estacionaria apolar y una fase móvil polar, por lo que las sustancias de la mezcla son retenidas basándose en su polaridad, reteniendo primero los compuestos polares. Una vez que los compuestos de la muestra están separados, es necesario detectarlos. Para ello se puede utilizar sistemas de detección electroquímica. La detección electroquímica permite identificar sustancias (análisis cualitativo) o determinar sus cantidades (análisis cuantitativo). El registro resultante de la separación de los distintos compuestos de la muestra, en función del tiempo que tardan en pasar por el sistema de detección da origen a un cromatograma.

En nuestro estudio las muestras obtenidas por microdiálisis se analizaron por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) acoplada a un detector electroquímico (HPLC-EC), siguiendo una metodología ya descrita (Herrera-Marschitz *et al.*, 1996) (ver Figura 13). Una alícuota de 20 μ l del microperfusado, se introdujo al sistema cromatográfico mediante un autoinyector CMA/200 programado por un software *ad-hoc* desde un computador. Los diversos compuestos presentes en el perfusado fueron separados por una columna Synergy 4-Hidro-RP (Phenomenex, Torrance, CA, USA) y luego oxidados por un electrodo de carbono con celda de flujo radial (BAS, Tokyo, Japan) ajustado a un potencial de oxidación de 700 mV; generándose una corriente que, luego de filtrada y amplificada, fue enviada a un computador equipado con una tarjeta análogo digital y el software CSW® (Pronexus, Stockholm, Sweden) que permitió la integración de los picos del cromatograma.

La identificación de los compuestos de la muestra se realizó con patrones de sustancias puras que permiten determinar el orden de retención de las sustancias y su tiempo de retención (Herrera-Marschitz *et al.*, 1996). La cuantificación de dichos compuestos se realizó comparando las muestras (alturas o áreas de los picos cromatográficos) con patrones de concentración conocida (ver figura 14).

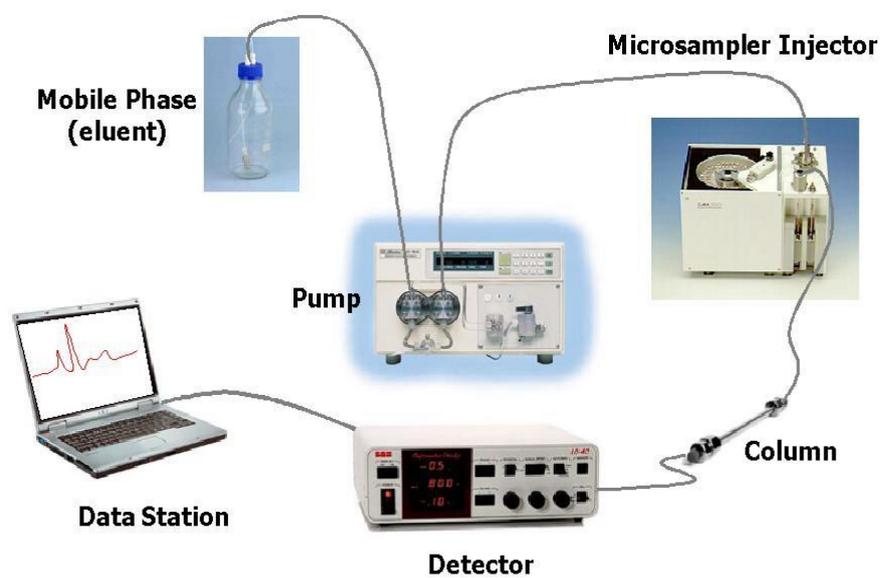


Figura 13: Esquema del equipamiento para análisis por Cromatografía Líquida de Alta Presión (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) (Adaptado de: Catálogo CMA, Solna, Sweden).

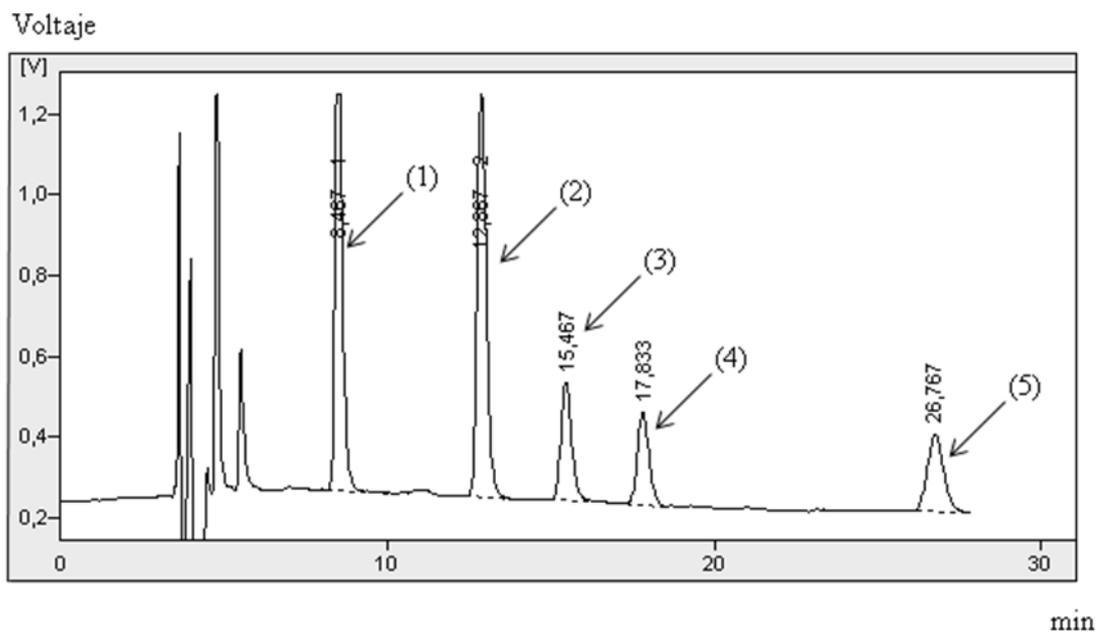


Figura 14: Cromatograma de una muestra de compuestos estándares para determinar el orden y el tiempo de retención de las sustancias en condiciones cromatográficas determinadas. (1) DA; (2) DOPAC; (3) 5-HT; (4) 5-HIAA; (5) HVA. Cada sustancia está a una concentración 10^{-7} M, 20 μ l autoinyectados en sistema HPLC.

6.6. Drogas y sustancias químicas utilizadas como parámetros experimentales

Tabla 1 muestra las características de las drogas utilizadas (e.g. Apomorfina-HCl, D-AMPH, L-DOPA, L-Deprenil, dicumarol), administradas sistémicamente, o agregadas al medio de perfusión intracerebral. La utilización de dicumarol condujo a investigar distintos tampones, ya que por sus propiedades físico-químicas tiene baja solubilidad en Ringer. En estudios de solubilidad se estableció un tampón Tris-HCl como óptimo para disolver dicumarol, lo que obligó, sin embargo, a evaluar el efecto de D-AMPH y KCl en dicho medio de perfusión.

Tabla 1. Categoría y origen de los fármacos utilizados:

Categoría	Fármaco	Fuente de Origen	Solución de Trabajo	Dosis y Vía de Administración
Sedante-Hipnótico (Pre-anestesia)	Hidrato de Cloral	Rectapur, Prolabo París, Francia.	7% p/v	0.8 ml. i.p.
Anestésico General	Isoflurano	Baxter Healthcare Co., Guayama, Puerto Rico, USA.	Vapores con aire 1.5 L/min	1.5-2.0% máscara nasal.
Anestésico Local	Lidocaína	Astra Labs., Södertälje, Suecia.	10 mg/ml	Aplicación local por aspersion.
Neurotoxina Dopaminérgica	6-hidroxidopamina; (6-OHDA-HBr)	Sigma St. Louis, USA. N° catálogo H6507.	2 mg/ml	8 ug/4 µl i.c.
Agonista Dopaminérgico	Apomorfina; (APO-HCl)	Apoteksbolaget, Suecia.	0.05 mg/ml	0.05 mg/kg s.c.
Precursor Dopaminérgico	L-DOPA; (L-dihidroxifenilalanina)	Karolinska Apoteket, Stockholm, Suecia.	12.5 mg/ml	3 x 25 mg/kg, i.p.
Inhibidor de Monoamino oxidasa	L-Deprenil; (selegilina)	Dr. Knoll, Universidad Hungría.	10 mg/ml	3 x 10 mg/kg, i.p.

Inhibidor de DT-Diaforasa	Dicumarol; (3,3'-metileno-bis-(4-hidroxicumarina))	Sigma St. Louis, USA. N° catálogo M1390.	10^{-4} M en Buffer Tris-HCl 0.1 M, pH~7.0	Perfusión por sonda de microdiálisis
Estándar para Calibración HPLC	DA-HCl; (3-hidroxitiramina)	Sigma St. Louis, USA. N° catálogo H8502.	10^{-7} Molar	20 μ l auto- inyectados al sistema HPLC.
Estándar para Calibración HPLC	DOPAC; (3,4-dihidroxifenil acético)	Sigma St. Louis, USA. N° catálogo 850217.	10^{-7} Molar	20 μ l auto- inyectados al sistema HPLC.
Estándar para Calibración HPLC	HVA; (4-hidroxi-3- metoxifenilacético)	Sigma St. Louis, USA. N° catálogo H1252.	10^{-7} Molar	20 μ l auto- inyectados al sistema HPLC.
Estándar para Calibración HPLC	5-HT-HCl; (5-hidroxitriptamina)	Sigma St. Louis, USA. N° catálogo 85036.	10^{-7} Molar	20 μ l auto- inyectados al sistema HPLC.
Estándar para Calibración HPLC	5-HIAA; (ácido 5- hidroxiindol-3- acético)	Sigma St. Louis, USA. N° catálogo H8876.	10^{-7} Molar	20 μ l auto- inyectados al sistema HPLC.

6.6.1. Administración de fármacos y dosificación

L-DOPA y L-Deprenil se disolvieron diariamente en solución salina estéril (NaCl 0.9%), administrados por vía i.p. en tres dosis sucesivas: Dos y una hora antes del montaje de las ratas en el equipo estereotáxico, y una vez iniciada la microdiálisis (tiempo 0). Para su administración se utilizaron jeringas de 1 ml y agujas 25G. Las dosis se calcularon con referencia a las bases libres, quedando en solución 1 ml/kg rata (~0.25 ml para cada rata).

La inhibición selectiva de la enzima DT-diaforasa se realizó con dicumarol (100 μ M) mediante perfusión intracerebral a través de la sonda de microdiálisis. Para su preparación se utilizó como vehículo buffer Tris-HCl 0.1 M en Ringer en una proporción 1 en 4 (pH= 7), el cual además se consideró grupo control de aquellos animales que recibieron perfusión intracerebral con dicumarol.

6.6.2. Grupos experimentales:

Grupos experimentales definidos para pre-tratamiento sistémico y/o intracerebral

(Tabla 2)

Tabla 2. Diseño experimental

Grupos experimentales	Medio de perfusión								
	Ringer 0-120 min	Ringer +Tris-HCl 120-300 min	Ringer +Tris-HCl +dicum arol 120-300 min	Ringer +Tris-HCl + D-AMP H 300-330 min	Ringer +Tris-HCl + dicum arol + D-AMPH 300-330 min	Ringer+ Tris-HCl 330-390 min	Ringer +Tris-HCl +dicu marol 330-390 min	Ringer+ Tris-HCl +KCl 390-420 min	Ringer +Tris-HCl +dicum arol +KCl 390-420 min
(1) Salino	+	+		+		+		+	
(2) L-DOPA	+	+		+		+		+	
(3) L-Deprenil	+	+		+		+		+	
(4) L-DOPA+L-Deprenil	+	+		+		+		+	
(5) Salino	+		+		+		+		+
(6) L-DOPA	+		+		+		+		+
(7) L-Deprenil	+		+		+		+		+
(8) L-DOPA+L-Deprenil	+		+		+		+		+

6.7. Estadística

Los resultados del modelo rotacional se expresan como el número de giros (ipsi o contralateral) totales durante todo el período de observación (180 min), y por min, permitiendo elaborar una curva de evolución temporal (promedios \pm error típico; Standard Error of Means (SEM)). Los resultados del análisis bioquímico se expresan en concentraciones nM de analitos en el perfusado de microdiálisis y posteriormente transformados en porcentaje, sin considerar el *recovery* de la sonda.

El análisis estadístico para comparaciones múltiples se efectuó mediante un análisis de varianza de una vía (One Way ANOVA; *software* GraphPad Prisma®), considerando como límite de significación el índice de probabilidad $p < 0.05$. En este trabajo se usó como *post-hoc* test la diferencia de promedios ± 1 SEM, para magnificar los efectos y disminuir la varianza, explorando futuros desarrollos.

6.8. Resguardos éticos en el uso de animales

Los experimentos fueron aprobados por la Comisión de Bioética sobre investigación en animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Además, en el marco del Proyecto FONDECYT 103-0521, se cumplieron con los requerimientos éticos establecidos por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT, 1994).

7. RESULTADOS

7.1. Lesión Química Unilateral del Haz Medial Cerebral (MFB)

7.1.1. Evaluación Clínica

El procedimiento quirúrgico para lesionar químicamente el haz medial cerebral izquierdo culminó con un período post-operatorio de observación clínica a partir de las 24 h. A una primera evaluación clínica en su jaula, los animales mostraron un aspecto saludable, ingesta de alimento y agua *ad-libitum*, reactividad y conducta exploratoria aparentemente normal, aún cuando se observó preferencia de desplazamientos hacia el lado izquierdo, particularmente a partir de una semana de la lesión. A los 10 días se observó una plena consolidación de la incisión quirúrgica. Los animales lesionados presentaron una ganancia normal de peso y, a la semana, no se diferenciaron clínicamente de animales no lesionados. Sin embargo, una evaluación neurológica detallada permitió observar una desviación postural del eje rostro-caudal con un leve arqueamiento hacia la izquierda de la columna vertebral.

7.1.2. Evaluación de conducta rotacional

A partir de la segunda semana de la lesión química, los animales fueron evaluados farmacológicamente con el agonista dopaminérgico APO (APO: 0.05 mg/kg, s.c.). En ratas no lesionadas, esta dosis de APO no produce efecto evidente, aparte de una aparente inhibición motora e incremento de la frecuencia de bostezos (yawning). Todas las ratas lesionadas utilizadas en este estudio desarrollaron, sin embargo, una conducta rotacional al ser estimuladas con APO 0.05 mg/kg, s.c., con una dirección contralateral a la lesión (hacia la derecha, ya que en todos los experimentos la inyección intracerebral de 6-OHDA se efectuó en el hemisferio izquierdo). En la Tabla 3 se muestran algunos parámetros usados para evaluar la rotación evocada por APO (0.05 mg/kg, s.c.). La Figura 15 muestra la evolución temporal del efecto rotacional provocado por este agonista dopaminérgico. APO indujo rotación contralateral durante aproximadamente 60 min (300 giros en una hora), con una actividad máxima de 10 giros/min, durante los primeros 10 min luego de administrar el fármaco. Trabajos previos del laboratorio han demostrado la relación dosis-efecto de la mayoría de los parámetros utilizados para su evaluación (APO 0.05-5.0 mg/kg, s.c.).

Evaluación con APO	Giros contralaterales (n=7)
Total giros x 3 h	<u>331±47</u>
Máximo giros/min	<u>10.9±1.6</u>
Giros en 1ra h	<u>321±47</u>
Giros en 2ra h	7±2
Giros en 3ra h	5±2
Duración de la actividad rotacional	~60 min

Tabla 3: Evaluación del efecto rotacional evocado por apomorfina (APO 0.05 mg/kg, s.c.) en ratas hemiparkinsonianas, 2 semanas luego de la lesión. Los datos representan el promedio \pm SEM (n=7). Los valores se comparan con los observados en animales no lesionados (n=5). Los parámetros estadísticamente significativos se muestran subrayados y en negritas (p<0.05).

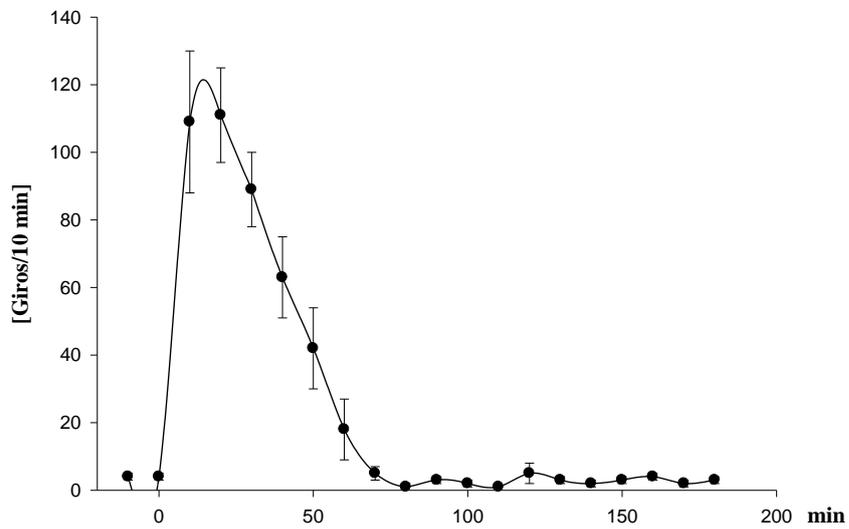


Figura 15: Evolución temporal de la rotación contralateral evocada por APO (0.05 mg/kg, s.c.). Abscisa, min a partir de la inyección de APO. Ordenada, rotación contralateral por 10 min. Datos, promedios \pm SEM; n=7.

7.1.3. Evaluación bioquímica de la lesión

Dado que el haz medial cerebral proyecta sus axones hacia extensas zonas en el cerebro anterior de la rata (neostriado, núcleo accumbens y corteza frontal), la lesión química unilateral del haz izquierdo disminuyó significativamente los niveles de DA (~80%) y sus metabolitos DOPAC (~100%) y HVA (~100%) en el neostriado del hemisferio lesionado (Tabla 4B) comparado con el hemisferio no lesionado (Tabla 4A), evaluados con microdialisis durante perfusión con Ringer y/o Ringer+Tris-HCl, 4-8 semanas luego de la lesión. No se observó diferencias en los niveles de 5-HT y/o 5-HIAA.

7.2. Niveles de monoaminas y sus metabolitos evaluados en neostriado de rata

La Tabla 4 muestra niveles de DA, 5-HT y sus metabolitos en dializados de neostriado no lesionado (4A) y lesionado (4B) de ratas tratadas con 6-OHDA intracerebral. Se utilizaron los siguientes medios de perfusión: (1) Ringer; (2) Ringer+Tris-HCl; (3) Ringer+Tris-HCl+D-AMPH.

Los niveles fueron analizados luego de pre-tratamiento sistémico con Salino (3 x 1ml/kg, i.p.; 4A.1; 4B.1); L-DOPA (3 x 25 mg/kg, i.p.; 4A.2; 4B.2); L-Deprenil (3 x 10 mg/kg, i.p.; 4A.3; 4B.3); o L-DOPA+L-Deprenil (4A.4; 4B.4). El análisis de varianza (One Way ANOVA) usando el tratamiento previo como variable independiente revela diferencias significativas para DA y 5-HT, permitiendo así la prueba estadística *post-hoc* para las comparaciones específicas de estos neurotransmisores (ver Tabla 4A y 4B).

7.2.1. Efectos en neostriado no lesionado

7.2.1.1. Efecto del medio de perfusión y D-AMPH en los niveles de monoaminas y sus metabolitos (Tabla 4A.1)

En el bloque A.1 de la Tabla 4A se observan los niveles de DA, 5-HT y sus metabolitos en neostriado intacto usando Salino como pre-tratamiento. En la condición de perfusión con Ringer (condición basal), DA y 5-HT se detectan en el rango nM (~2 y ~1.0 para DA y 5-HT, respectivamente), mientras que los metabolitos DOPAC, HVA y 5-HIAA se detectan en el rango sub μ M, es decir, cien veces más concentrados (DOPAC, ~200 nM; HVA, ~100 nM; 5-HIAA, ~100 nM). La adición de Tris-HCl al medio de perfusión (Ringer+Tris-HCl) no altera significativamente los niveles de las monoaminas y sus metabolitos. D-AMPH agregado directamente al medio de perfusión

(Ringer+Tris-HCl+D-AMPH) aumenta los niveles de DA (>7 veces) y 5-HT (~2 veces) comparado a la condición Ringer+Tris-HCl.

7.2.1.2. Efecto de pre-tratamiento en niveles de monoaminas y metabolitos (Tabla 4A.2-4)

La Tabla 4A muestra el efecto del pre-tratamiento con L-DOPA (4A.2), L-Deprenil (4A.3), o L-DOPA+L-Deprenil (4A.4) en neostriado no lesionado. Se aprecia que el pre-tratamiento con L-DOPA, L-Deprenil o combinado aumenta significativamente los niveles de DA evaluados durante la condición de Ringer+Tris-HCl, condición que debe ser considerada como control para los análisis posteriores, comparado con los correspondientes niveles luego de pre-tratamiento con Salino. El efecto de pre-tratamiento con L-DOPA (4A.2), L-DOPA+L-Deprenil (4A.4) en condición Ringer es particularmente notable sobre los niveles de HVA, que, comparado al valor observado luego de pre-tratamiento con Salino, aumentan >2 veces. Este efecto no se observa, sin embargo, durante la perfusión con Ringer+Tris-HCl, condición control para todos los efectos de este estudio. Este efecto no se observa luego de pre-tratamiento con L-Deprenil solo. Sin embargo, pre-tratamiento con L-Deprenil disminuye significativamente los niveles de DOPAC (~70%), pero no los de HVA o 5-HIAA.

En términos porcentuales, el efecto de D-AMPH sobre DA es menor luego del pre-tratamiento con L-DOPA, L-Deprenil o L-DOPA+L-Deprenil *versus* pre-tratamiento con Salino, posiblemente debido al aumento de los niveles producido por el pre-tratamiento.

7.2.2. Efectos en neostriado lesionado

7.2.2.1. Efecto de medio de perfusión y D-AMPH en los niveles de monoaminas y sus metabolitos (Tabla 4B.1)

No se observa efecto de Ringer+Tris-HCl, pero si de D-AMPH sobre los niveles de DA que, cuando detectable, se elevan en términos porcentuales de una manera similar a la observada en neostriado intacto.

7.2.2.2. Efecto de pre-tratamiento en los niveles de monoaminas y sus metabolitos (Tabla 4B.2-4)

El pre-tratamiento con L-DOPA (4B.2); L-Deprenil (4B.3) y L-DOPA+L-Deprenil (4B.4) revierte significativamente el déficit inducido por la lesión en DOPAC y HVA, si se compara con lo observado en el bloque 4B.1. El efecto más notorio es el de L-DOPA combinado con L-Deprenil, sobre los niveles de DOPAC y HVA, incluso se normalizan los niveles de DA. Luego de L-DOPA+L-Deprenil no se observa, sin embargo, efecto de D-AMPH (comparar 4B.4 *versus* 4B.1)

Tabla 4. Niveles de dopamina (DA), serotonina (5-HT), y metabolitos, ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), medidos en 60 µl de muestras de perfusión obtenidas a través de microdiálisis *in vivo* desde neostriado no lesionado (**A**) y lesionado (**B**) de ratas con hemiparkinson experimental. Los animales fueron pre-tratados con Salino (1 ml/kg, i.p.); L-DOPA (3 x 25 mg/kg, i.p.); y/o L-Deprenil (3 x 10 mg/kg, i.p.) (última dosis al iniciar el experimento de microdiálisis). Se utilizó el siguiente protocolo de perfusión: Ringer, (0-120 min a partir de la implantación de la sonda de microdiálisis); Ringer+100 mM Tris-HCl (120-300 min); Ringer+100 mM Tris-HCl+100 µM D-AMPH (300-330 min). Los valores, expresados como el promedio ± SEM, corresponden a la concentración de los analitos en la fracción indicada, medidos por HPLC –EC.

Tabla 4A.

A. Neostriado no lesionado				
4A.1. Pre-tratamiento con Salino (n=8)	Ringer (90-120min)	Ringer+Tris-HCl (270-300min)	Ringer+Tris-HCl+D-AMPH (300-330min)	% del efecto de D-AMPH
DA	2.5±0.5	2.5±0.6	<u>19.1±4.6^a</u>	<u>764%</u>
DOPAC	206±22	161±13.2	139±23.3	86%
HVA	102±19	86±11	74±14	86%
5-HT	1.1±0.2	1.5±0.3	<u>3.2±0.5^a</u>	<u>213%</u>
5-HIAA	114±15	114±7.3	115±8	101%
4A.2. Pre-tratamiento con L-DOPA (n=5)				
DA	3.0±0.8	<u>13.8±4.8^b</u>	<u>37.6±5.4^{a,b}</u>	<u>272%</u>
DOPAC	216±22	192±28.3	188±25	98%
HVA	<u>252±44^b</u>	<u>180±39.3^b</u>	<u>158±35^b</u>	88%
5-HT	1.0±0.0	1.1±0.2	<u>2.6±0.3^a</u>	<u>236%</u>
5-HIAA	133±23.5	140±15	160±1.2	114%
4A.3. Pre-tratamiento con L-Deprenil (n=5)				
DA	<u>6.6±1.7^b</u>	<u>8.6±2.8^b</u>	<u>43.1±10.4^{a,b}</u>	<u>501%</u>
DOPAC	<u>53±23^b</u>	<u>22±8^b</u>	<u>37±11^b</u>	168%
HVA	108±42	<u>45±7^b</u>	<u>34±5^b</u>	76%
5-HT	1.9±0.4	<u>4.2±0.9^b</u>	4.0±0.4	95%
5-HIAA	145±18	130±16	135±24	103%
4A.4. Pre-tratamiento con L-DOPA + L-Deprenil (n=5)				
DA	<u>5.6±1.0^b</u>	<u>7.5±3^b</u>	<u>26.3±13.2^a</u>	<u>350%</u>
DOPAC	<u>108±13^b</u>	<u>32±6^b</u>	<u>15±3^b</u>	46%
HVA	<u>292±87^b</u>	<u>61±8^b</u>	<u>40±6.1^b</u>	66%
5-HT	1.7±0.5	<u>2.4±0.5^b</u>	3.5±1.0	146%
5-HIAA	154±27	129±32	115±34	89%

Comparaciones: F-ANOVA_{DA}= 7.78 (m,n=12,69); p<0.05; F-ANOVA_{DOPAC}= 15.15 (m,n=12,69); p<0.05; F-ANOVA_{HVA}= 6.5 (m,n=12,69); p<0.05; F-ANOVA_{5-HT}= 3.75 (m,n=12,69); p<0.05; F-ANOVA_{5-HIAA}= 0.74 (m,n=12,69); n.s. ^aRinger+Tris-HCl+D-AMPH comparado con Ringer+Tris-HCl. ^b Comparación con efectos observados durante la misma condición luego de pre-tratamiento con Salino.

Tabla 4B.

B. Neostriado lesionado (izquierdo)				
4B.1. Pre-tratamiento con Salino (n=8)	Ringer (90-120 min)	Ringer+Tris-HCl (270-300min)	Ringer+Tris-HCl+D-AMPH (300-330min)	% del efecto de D-AMPH
DA	<u>0.5±0.2^c</u>	<u>0.7±0.2^c</u>	<u>6.8±3.8^{a,c}</u>	<u>971%</u>
DOPAC	<u>0.5±0.4^c</u>	<u>2.5±2.2^c</u>	<u>1.0±0.6^c</u>	40%
HVA	<u>2.2±2.2^c</u>	<u>2.5±2.5^c</u>	<u>2.5±2.5^c</u>	100%
5-HT	1.4±0.4	1.3±0.5	<u>1.6±0.6^c</u>	123%
5-HIAA	105±23	120.3±41.2	126±31.6	105%
4B.2. Pre-tratamiento con L-DOPA (n=5)				
DA	0.9±0.1	<u>6.7±2.6^b</u>	11.4±6.3	170%
DOPAC	<u>38±12.5^b</u>	<u>15.4±8.3^b</u>	<u>12.4±7^b</u>	81%
HVA	<u>153.2±58^b</u>	<u>23.2±7^b</u>	<u>20±8^b</u>	86%
5-HT	<u>3.0±0.9^b</u>	<u>7.7±3.9^b</u>	<u>7.6±1.6^b</u>	99%
5-HIAA	146.4±32.2	129.2±13.8	132.4±17	102%
4B.3. Pre-tratamiento con L-Deprenil (n=5)				
DA	0.6±0.2	<u>3.1±1.1^b</u>	8.5±4.9	274%
DOPAC	<u>19±13^b</u>	<u>15.5±3.5^b</u>	<u>18.6±6.7^b</u>	120%
HVA	<u>36.8±19.8^b</u>	<u>25.4±10.8^b</u>	<u>18.4±8.5^b</u>	72%
5-HT	2.3±0.7	3.1±1.3	<u>4.3±0.8^b</u>	139%
5-HIAA	111±28	87.3±33.8	85.3±34.2	98%
4B.4. Pre-tratamiento L-DOPA+L-Deprenil (n=5)				
DA	<u>2.1±0.4^b</u>	<u>8.2±7.3^b</u>	7.0±3.9	85%
DOPAC	<u>58±28^b</u>	<u>14.8±5.1^b</u>	<u>12.7±5.7^b</u>	86%
HVA	<u>254±72^b</u>	<u>33.5±7.8^b</u>	<u>30.7±12.1^b</u>	92%
5-HT	2.5±1.0	1.5±0.6	2.7±1.1	180%
5-HIAA	135±27	115±42	121.5±30.5	106%

Comparaciones: F-ANOVA_{DA} = 1.16 (m,n=12,69); n.s.; F-ANOVA_{DOPAC} = 2.01 (m,n=12,69); n.s.; F-ANOVA_{HVA} = 6.6 (m,n=12,69); p<0.05; F-ANOVA_{5-HT} = 2.16 (m,n=12,69); p<0.05; F-ANOVA_{5-HIAA} = 0.34 (m,n=12,69); n.s. ^aRinger+Tris-HCl+D-AMPH comparado con columna Ringer+Tris-HCl. ^bComparación con efectos observados durante la misma condición luego de pre-tratamiento con Salino. ^c Comparación con los efectos observados en neostriado no lesionado (Tabla 4A)

7.3. Efectos de dicumarol sobre los niveles de monoaminas y sus metabolitos evaluados en neostriado

La Tabla 5 muestra niveles de DA, 5-HT y sus metabolitos en dializados de neostriado no lesionado (5A) y lesionado (5B) de ratas tratadas con 6-OHDA intracerebral. Se utilizaron los siguientes medios de perfusión: (1) Ringer; (2) Ringer+Tris-HCl+dicumarol; (3) Ringer+Tris-HCl+dicumarol+D-AMPH.

Los niveles fueron analizados luego de pre-tratamiento sistémico con Salino (3 x 1ml/kg, i.p.; 5A.1; 5B.1); L-DOPA (3 x 25 mg/kg, i.p.; 5A.2; 5B.2); L-Deprenil (3 x 10 mg/kg, i.p.; 5A.3; 5B.3); o L-DOPA+L-Deprenil (5A.4; 5B.4).

Luego de pre-tratamiento sistémico con Salino no se observan cambios significativos en los niveles de monoaminas y sus metabolitos evaluados en el neostriado no lesionado durante la perfusión con dicumarol (comparar Ringer+Tris-HCl+dicumarol en Tabla 5A *versus* Ringer+Tris-HCl en Tabla 4A). El efecto de D-AMPH durante la perfusión con dicumarol (Ringer+Tris-HCl+dicumarol+D-AMPH) sobre los niveles de DA (Bloque 5A.1, en Tabla 5A) es similar a lo observado en la condición de perfusión sin dicumarol (Bloque 4A.1, en Tabla 4A).

Dicumarol no afecta los niveles de monoaminas y metabolitos evaluados luego de pre-tratamiento sistémico con L-Deprenil, o L-DOPA+L-Deprenil (ver Tabla 5A *versus* Tabla 4A). El efecto de D-AMPH (Ringer+Tris-HCl+dicumarol+D-AMPH) sobre DA aparece, sin embargo, notablemente disminuido luego de pre-tratamiento con L-Deprenil y L-DOPA+L-Deprenil.

La perfusión con dicumarol (Tabla 5B) no afecta significativamente los efectos en neostriado lesionado, comparado con los reportados en Tabla 4B luego de pre-tratamiento con L-DOPA y/o L-Deprenil.

Tabla 5: Niveles de dopamina (DA), serotonina (5-HT), y metabolitos, ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), medidos en 60 µl de muestras de perfusión obtenidas a través de microdiálisis *in vivo* desde neostriado no lesionado (**A**) y lesionado (**B**) de ratas con hemiparkinson experimental. Los animales fueron pre-tratados con Salino (1 ml/kg, i.p.); L-DOPA (3 x 25mg/kg, i.p.); y/o L-Deprenil (3 x 10 mg/kg, i.p.) (última dosis al iniciar el experimento de microdiálisis). Se utilizó el siguiente protocolo de perfusión: Ringer (0-120 min a partir de la implantación de la sonda de microdiálisis); Ringer+100 mM Tris-HCl+100 µM dicumarol (120-300 min); Ringer+100 mM Tris-HCl+100 µM dicumarol+100 µM D-AMPH (300-330 min). Los valores, expresados como el promedio ± SEM, corresponden a la concentración de los analitos en la fracción indicada, medidos por HPLC –ED.

Tabla 5A.

A. Neostriado no lesionado				
5A.1. Pre-tratamiento con Salino (n=7)	Ringer (90-120min)	Ringer+Tris-HCl+dicumarol (270-300min)	Ringer+Tris-HCl+dicumarol+D-AMPH (300-330min)	% del efecto de D-AMPH
DA	2.2±0.6	2.5±0.6	<u>26.9±7.4^a</u>	<u>1076%</u>
DOPAC	259±37	168±28	140±30	83%
HVA	60±7	47±7	45±6	96%
5-HT	0.7±0.3	1.2±0.3	1.6±0.3	133%
5-HIAA	119±9	110±8	95±9	86%
5A.2. Pre-tratamiento con L-DOPA (n=5)				
DA	<u>4.8±0.6^b</u>	n.d.	n.d.	
DOPAC	201±25	197±14	195±10	99%
HVA	<u>328±47^b</u>	<u>354±48^b</u>	<u>343±35^b</u>	97%
5-HT	<u>1.9±0.4^b</u>	1.2±0.1	<u>2.7±0.1^{a,b}</u>	<u>225%</u>
5-HIAA	154±24	<u>195±27^b</u>	<u>175±16^b</u>	90%
5A.3. Pre-tratamiento con L-Deprenil (n=5)				
DA	<u>6.7±3.0^b</u>	<u>6.2±0.9^b</u>	<u>8.4±1.4^b</u>	135%
DOPAC	<u>52±16^b</u>	<u>44±10^b</u>	<u>40±6^b</u>	91%
HVA	85±24	75.1±21.1	<u>84.3±22.4^b</u>	112%
5-HT	<u>2.4±0.6^b</u>	<u>3.2±1.5^b</u>	2.9±0.8	91%
5-HIAA	103±15	83.3±25.5	102±22.1	122%
5A.4. Pre-tratamiento con L-DOPA+ L-Deprenil (n=5)				
DA	4.0±1.4	3.9±1.2	<u>7.3±1.8^b</u>	190%
DOPAC	<u>67±33^b</u>	<u>39±12.3^b</u>	<u>36±11^b</u>	92%
HVA	<u>247±59^b</u>	<u>114±45^b</u>	<u>101.3±38.4^b</u>	89%
5-HT	<u>2.0±0.4^b</u>	1.2±0.1	1.6±0.2	133%
5-HIAA	93±14	92±11	94±9	102%

n.d., no data, la señal de DA observado en el HPLC no fue confiable.

Comparaciones: F-ANOVA_{DA} = 6.05 (m,n=12,56); p<0.05; F-ANOVA_{DOPAC} = 10.9 (m,n=12,66); p<0.05; F-ANOVA_{HVA} = 16.48 (m,n=12,66); p<0.05; F-ANOVA_{5-HT} = 1.94 (m,n=12,66); n.s; F-ANOVA_{5-HIAA} = 5.0 (m,n=12,66); p<0.05. ^a Ringer+Tris-HCl+dicumarol+D-AMPH comparado con Ringer+Tris-HCl+dicumarol. ^b Comparación con efectos observados durante la misma condición luego de pre-tratamiento con Salino.

Tabla 5B

B. Neostriado lesionado (izquierdo)				
5B.1. Pre-tratamiento con Salino (n=7)	Ringer (90-120min)	Ringer+Tris-HCl+dicumarol (270-300min)	Ringer+Tris-HCl+dicumarol+D-AMPH (300-330min)	% del efecto de D-AMPH
DA	0.2±0.1	0.3±0.1	<u>1.0±0.2^a</u>	<u>333%</u>
DOPAC	0.0±0.0	0.8±0.5	0.6±0.4	75%
HVA	0.0±0.0	0±0	0±0	0%
5-HT	1.0±0.4	0.8±0.4	1.2±0.2	150%
5-HIAA	115±22	38.3±1.5	53.7±4.5	140%
5B.2. Pre-tratamiento con L-DOPA (n=5)				
DA	<u>1.4±0.2^b</u>	n.d.	n.d.	
DOPAC	<u>56±38^b</u>	<u>135.7±35.4^b</u>	<u>135±34.1^b</u>	100%
HVA	<u>114±25^b</u>	<u>70.8±23.7^b</u>	<u>71.4±26.4^b</u>	101%
5-HT	1.5±0.4	<u>2.6±0.6^b</u>	2.4±1.0	92%
5-HIAA	121±22	50±18	35±18.3	70%
5B.3. Pre-tratamiento con L-Deprenil (n=5)				
DA	<u>3.9±1.1^b</u>	<u>2.6±1.0^b</u>	<u>3.8±1.0^b</u>	146%
DOPAC	<u>25±10^b</u>	<u>10±3.6^b</u>	<u>9.3±2.5^b</u>	93%
HVA	<u>36±11^b</u>	<u>28.2±9.7^b</u>	<u>31±10.4^b</u>	109%
5-HT	<u>2.5±0.6^b</u>	2.6±1.4	<u>2.2±0.4^b</u>	85%
5-HIAA	132±23	<u>113±21^b</u>	<u>121±17^b</u>	107%
5B.4. Pre-tratamiento con L-DOPA+L-Deprenil (n=5)				
DA	<u>1.7±0.3^b</u>	<u>1.2±0.2^b</u>	<u>2.7±0.5^{a,b}</u>	<u>225%</u>
DOPAC	<u>27±22^b</u>	<u>5.0±2.6^b</u>	<u>4.6±2.3^b</u>	92%
HVA	<u>118±81.4^b</u>	<u>20.3±10^b</u>	<u>16±7.4^b</u>	79%
5-HT	<u>2.7±0.5^b</u>	2.0±0.7	<u>4.3±1.7^b</u>	215%
5-HIAA	<u>68.2±40.3^b</u>	62±36.2	72±30.1	116%

Comparaciones: F-ANOVA_{DA} = 5.31 (m,n=12,56); p<0.05; F-ANOVA_{DOPAC} = 6.73 (m,n=12,66); p<0.05; F-ANOVA_{HVA} = 2.57 (m,n=12,66); n.s; F-ANOVA_{5-HT} = 1.5 (m,n=12,66); n.s; F-ANOVA_{5-HIAA} = 2.3 (m,n=12,66); p<0.05. ^a Ringer+Tris-HCl+dicumarol+D-AMPH comparado con Ringer+Tris-HCl+dicumarol. ^b Comparación con efectos observados durante la misma condición luego de pre-tratamiento con Salino.

7.4. Efecto de la perfusión con una solución depolarizante de KCl sobre los niveles de monoaminas y sus metabolitos (Tabla 6 y 7)

La Tabla 6 muestra los niveles de DA, 5-HT y sus metabolitos en dializados de neostriado no lesionado (6A) y lesionado (6B) de ratas tratadas con una inyección intracerebral de 6-OHDA, utilizando los siguientes medios de perfusión: (1) Ringer+Tris-HCl; (2) Ringer+Tris-HCl+KCl. Los niveles fueron analizados luego de pre-tratamiento sistémico con Salino (3x 1 ml/kg, i.p.; 6A.1; 6B.1); L-DOPA (3x25 mg/kg, i.p.; 6A.2; 6B.2); L-Deprenil (3x10mg/kg, i.p.; 6A.3; 6B.3); o L-DOPA+L-Deprenil (6A.4; 6B.4). La Tabla 7 muestra el efecto de dicumarol en las mismas condiciones.

7.4.1. Efectos en neostriado no lesionado

7.4.1.1. Efecto de KCl sobre los niveles de monoaminas y sus metabolitos evaluados en neostriado no lesionado (Tabla 6A.1)

En el bloque 6A.1 se observan los niveles de DA, 5-HT y sus metabolitos en neostriado no lesionado usando Salino como pre-tratamiento. La adición de KCl al medio de perfusión (Ringer+Tris-HCl+KCl) aumenta los niveles de DA (~3 veces), y 5-HT (~4 veces).

7.4.1.2. Efecto de pre-tratamiento sobre la acción de KCl (Tabla 6A.2-4)

En términos porcentuales, el pre-tratamiento con L-DOPA (6A.2); L-Deprenil (6A.3); o L-DOPA+L-Deprenil (6A.4) no cambia la acción de la depolarización con KCl sobre la liberación de DA. Pre-tratamiento con L-DOPA o L-DOPA+L-Deprenil reduce significativamente el efecto de KCl sobre la liberación de 5-HT.

7.4.2. Efectos en neostriado lesionado

7.4.2.1. Efecto de KCl sobre los niveles de monoaminas y sus metabolitos evaluados en neostriado lesionado (Tabla 6B.1)

En el bloque 6B.1 se observan los niveles de DA, 5-HT y sus metabolitos en neostriado lesionado usando Salino como pre-tratamiento. La adición de KCl al medio de perfusión (Ringer+Tris-HCl+KCl) aumenta los niveles de DA (~4veces) y 5-HT (~3 veces).

7.4.2.2. Efecto de pre-tratamiento sobre la acción de KCl (Tabla 6B.1-4)

En términos porcentuales, el efecto de KCl sobre DA es mayor en la condición de pre-tratamiento con Salino comparado con neostriado no lesionado.

El efecto de KCl luego de pre-tratamiento con L-DOPA y L-DOPA+L-Deprenil aumenta los niveles de DA (~9 y ~5 veces respectivamente). Así mismo los niveles de DOPAC aumentan significativamente luego de pre-tratamiento con L-Deprenil.

En términos porcentuales, el efecto de KCl sobre 5-HT disminuye luego de pre-tratamiento con L-DOPA y L-DOPA+ L-Deprenil, considerando de todas maneras que sus niveles en la condición de perfusión Ringer+Tris-HCl están aumentados *versus* la condición de pre-tratamiento con Salino.

Tabla 6: Niveles de dopamina (DA), serotonina (5-HT), y metabolitos, ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), medidos en 60 µl de muestras de perfusión obtenidas a través de microdiálisis *in vivo* desde neostriado no lesionado (**A**) y lesionado (**B**) de ratas con hemiparkinson experimental. Los animales fueron pre-tratados con Salino (1 ml/kg, i.p.); L-DOPA (3 x 25mg/kg, i.p.); y/o L-Deprenil (3 x 10 mg/kg, i.p.) (última dosis al iniciar el experimento de microdiálisis). Se utilizó el siguiente protocolo de perfusión: Ringer+100 mM Tris-HCl (360-390 min); Ringer+100 mM Tris-HCl+100 mM KCl (390-420 min). Los valores, expresados como el promedio \pm SEM, corresponden a la concentración de los analitos en la fracción indicada, medidos por HPLC –ED.

Tabla 6A.

A. Neostriado no lesionado			
6A.1. Pre-tratamiento con Salino (n=8)	Ringer+Tris-HCl (360-390min)	Ringer+Tris-HCl+KCl (390-420min)	% del efecto de KCl
DA	2.03±0.3	<u>5.43±0.79^a</u>	<u>269%</u>
DOPAC	105±37	101±34	96%
HVA	63±9	53.2±9	84%
5-HT	1.8±0.7	<u>6.7 ±2.8^a</u>	<u>429%</u>
5-HIAA	102.4±14.2	112±11.1	98%
6A.2. Pre-tratamiento con L-DOPA (n=5)			
DA	<u>12.2±6.7^b</u>	<u>34.5±1.3^{a,b}</u>	<u>283%</u>
DOPAC	112±25.4	100±34	89%
HVA	<u>127±42.8^b</u>	<u>114±47.4^b</u>	90%
5-HT	2.3±2.2	4.3±2.2	187%
5-HIAA	149±38.1	121±9.1	81%
6A.3. Pre-tratamiento con L-Deprenil (n=5)			
DA	<u>5.2±2^b</u>	<u>18.1±3.5^{a,b}</u>	<u>348%</u>
DOPAC	<u>18.3±7^b</u>	<u>33±7.2^b</u>	180%
HVA	57.1±23.2	76±9.7	133%
5-HT	2.4±0.4	<u>9.7±2.6^{a,b}</u>	<u>404%</u>
5-HIAA	115±20	112±15	97%
6A.4. Pre-tratamiento con L-DOPA+ L-Deprenil (n=5)			
DA	<u>5.5±2.6^b</u>	<u>21.2±15^{a,b}</u>	<u>385%</u>
DOPAC	<u>19.2±10^b</u>	<u>15±3^b</u>	78%
HVA	<u>27.5±5.2^b</u>	<u>21±3.5^b</u>	77%
5-HT	3.8±2.3	4.4±1.4	116%
5-HIAA	105±33	<u>76±23^b</u>	72%

Comparaciones: F-ANOVA_{DA}= 3.95 (m,n=8,46); p<0.05; F-ANOVA_{DOPAC}= 8.5 (m,n=8,46); p<0.05; F-ANOVA_{HVA}= 6.8 (m,n=8,46); p<0.05; F-ANOVA_{5-HT}= 2.3 (m,n=8,46); n.s; F-ANOVA_{5-HIAA}= 0.3 (m,n=8,46); n.s. ^aRinger+Tris-HCl+KCl comparado con Ringer+Tris-HCl. ^bComparación con efectos observados durante la misma condición luego de pre-tratamiento con Salino.

Tabla 6B.

B. Neostriado lesionado (izquierdo)			
6B.1. Pre-tratamiento con Salino (n=8)	Ringer+Tris-HCl (360-390min)	Ringer+Tris-HCl+KCl (390-420min)	% del efecto de KCl
DA	2.3±1.9	<u>10.3±6.8^a</u>	<u>448%</u>
DOPAC	1.8±1.3	0.8±0.5	44%
HVA	5±3	3.3±3.3	66%
5-HT	1.3±0.5	<u>3.3±1.0^a</u>	<u>333%</u>
5-HIAA	109±80.4	144.4±101.5	132%
6B.2. Pre-tratamiento con L-DOPA (n=5)			
DA	2.3±1.4	<u>21±14^a</u>	<u>913%</u>
DOPAC	<u>5.5±1.7^b</u>	<u>7.0±1.3^b</u>	127%
HVA	<u>9.5±1.7^b</u>	<u>16.1±6^b</u>	170%
5-HT	<u>5.5±2.5^b</u>	<u>10.6±2.1^b</u>	193%
5-HIAA	71.2±13	70.4±6.8	99%
6B.3. Pre-tratamiento con L-Deprenil (n=5)			
DA	2.5±0.8	<u>8.5±3.2^a</u>	<u>340%</u>
DOPAC	<u>18±7^b</u>	<u>24.1±6^b</u>	133%
HVA	<u>15.2±6.6^b</u>	<u>50.2±16^{a,b}</u>	<u>330%</u>
5-HT	<u>4.0±0.6^b</u>	<u>12.5±4.7^{a,b}</u>	<u>312%</u>
5-HIAA	78±35	66±31.3	85%
6B.4. Pre-tratamiento con L-DOPA +L-Deprenil (n=5)			
DA	3.8±2.0	<u>19.2±16.4^a</u>	<u>505%</u>
DOPAC	<u>22±14^b</u>	<u>11.0±5.6^b</u>	50%
HVA	<u>20.3±9^b</u>	<u>16±6.2^b</u>	79%
5-HT	1.8±0.6	<u>4.2±1.2^a</u>	<u>233%</u>
5-HIAA	103±23.4	92.3±23.4	90%

Comparaciones: F-ANOVA_{DA} = 0.64 (m,n=8,46); n.s; F-ANOVA_{DOPAC} = 1.5 (m,n=8,46); n.s; F-ANOVA_{HVA} = 3.18 (m,n=8,46); p<0.05; F-ANOVA_{5-HT} = 2.9 (m,n=8,46); n.s; F-ANOVA_{5-HIAA} = 0.60 (m,n=8,46); n.s. ^aRinger+Tris-HCl+KCl comparado con Ringer+Tris-HCl. ^bComparación con efectos observados durante la misma condición luego de pre-tratamiento con Salino.

7.5. Efectos de dicumarol y KCl sobre los niveles de monoaminas y sus metabolitos evaluados en neostriado

La Tabla 7 muestra los niveles de DA, 5-HT y sus metabolitos en dializados de neostriado no lesionado (7A) y lesionado (7B) de ratas tratadas con 6-OHDA, utilizando los siguientes medios de perfusión: (1) Ringer+Tris-HCl+dicumarol; (2) Ringer+Tris-HCl+dicumarol+KCl. Los niveles fueron analizados luego de pre-tratamiento sistémico con Salino (3x 1 ml/kg, i.p.; 7A.1; 7B.1); L-DOPA (3x25 mg/kg, i.p.; 7A.2; 7B.2); L-Deprenil (3x10mg/kg, i.p.; 7A.3; 7B.3); o L-DOPA+L-Deprenil (7A.4; 7B.4).

Luego del pre-tratamiento sistémico con Salino no se observan cambios significativos en los niveles de monoaminas y sus metabolitos evaluados en el neostriado no lesionado durante la perfusión con dicumarol (comparar Ringer+Tris-HCl en Tabla 6A *versus* Ringer+Tris-HCl+dicumarol en Tabla 7A).

La perfusión con KCl (Ringer+Tris-HCl+dicumarol+KCl) luego de pre-tratamiento con Salino aumentó 5 veces los niveles de DA comparado con lo observado en la condición de perfusión Ringer+Tris-HCl+KCl (ver Tabla 6A). En cambio los niveles de DOPAC tienden a disminuir en la condición de perfusión Ringer+Tris-HCl+dicumarol+KCl luego de pre-tratamiento con Salino.

Los niveles de 5-HT por efecto de la perfusión con KCl (Ringer+Tris-HCl+dicumarol+KCl) en neostriado no lesionado aumentan aproximadamente 6 veces comparado con los valores observados en la condición de Ringer+Tris-HCl+dicumarol luego de pre-tratamiento con Salino.

Luego de pre-tratamiento con L-Deprenil y L-DOPA+L-Deprenil el efecto de KCl sobre los niveles de DA y 5-HT disminuyen comparados con los valores luego de pre-tratamiento con Salino.

La perfusión con KCl (Ringer+Tris-HCl+dicumarol+KCl) en neostriado lesionado (Tabla 7B) aumentó >7 y >4 veces los niveles de DA y 5-HT respectivamente, observados durante la condición de pre-tratamiento con Salino. El efecto de KCl sobre los niveles de DA y 5-HT disminuye, sin embargo, luego de pre-tratamiento con L-Deprenil y L-DOPA+L-Deprenil.

Tabla 7: Niveles de dopamina (DA), serotonina (5-HT), y metabolitos, ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), medidos en 60 µl de muestras de perfusión obtenidas a través de microdiálisis *in vivo* desde neostriado no lesionado (**A**) y lesionado (**B**) de ratas con hemiparkinson experimental. Los animales fueron pre-tratados con Salino (1 ml/kg, i.p.); L-DOPA (3 x 25mg/kg, i.p.); y/o L-Deprenil (3 x 10 mg/kg, i.p.) (última dosis al iniciar el experimento de microdiálisis). Se utilizó el siguiente protocolo de perfusión: Ringer+100 mM Tris-HCl+100 µM dicumarol (360-390 min); Ringer+100 mM Tris-HCl+100 µM dicumarol+100 mM KCl (390-420 min). Los valores, expresados como el promedio ± SEM, corresponden a la concentración de los analitos en la fracción indicada, medidos por HPLC –ED.

Tabla 7A.

A. Neostriado no lesionado			
7A.1. Pre-tratamiento con Salino (n=7)	Ringer+Tris-HCl+dicumarol (360-390min)	Ringer+Tris-HCl+dicumarol+KCl (390-420min)	% del efecto de KCl
DA	4.5±2.4	<u>23.3±8.2^a</u>	<u>517%</u>
DOPAC	100.4±23.3	75±29	75%
HVA	35.2±6.2	33±9	94%
5-HT	1.1±0.3	<u>6.6±2.2^a</u>	<u>600%</u>
5-HIAA	86.2±5	88±22	102%
7A.2. Pre-tratamiento con L-DOPA (n=5)			
DA	n.d.	n.d.	
DOPAC	<u>183±14.4^b</u>	<u>197±13^b</u>	107%
HVA	<u>374±33^b</u>	<u>256±46^b</u>	68%
5-HT	4.6±3.2	8.6±2.8	186%
5-HIAA	<u>152±35.3^b</u>	131±35	86%
7A.3. Pre-tratamiento con L-Deprenil (n=5)			
DA	<u>2.1±0.3^b</u>	<u>4.2±1.1^{a,b}</u>	<u>200%</u>
DOPAC	<u>23.4±6.3^b</u>	<u>15±6^b</u>	64%
HVA	49±15	20±4	41%
5-HT	2.2±1.2	3.9±0.5	177%
5-HIAA	97.4±23.1	72±23	74%
7A.4. Pre-tratamiento con L-DOPA+ L-Deprenil (n=5)			
DA	5.1±1.4	<u>7.6±2.1^b</u>	150%
DOPAC	<u>31.4±11.3^b</u>	<u>31.2±11.3^b</u>	99%
HVA	<u>83.2±34.4^b</u>	67±29	77%
5-HT	1.0±0.2	<u>1.2±0.3^b</u>	120%
5-HIAA	85±11.1	86±11	101%

n.d., no data, la señal de DA observado en el HPLC no fue confiable.

Comparaciones: F-ANOVA_{DA} = 3.76 (m,n=8,34); p<0.05; F-ANOVA_{DOPAC} = 13.69 (m,n=8,44); p<0.05; F-ANOVA_{HVA} = 17.05 (m,n=8,44); p<0.05; F-ANOVA_{5-HT} = 3.88 (m,n=8,44); p<0.05; F-ANOVA_{5-HIAA} = 3.4 (m,n=8,44); p<0.05. ^a Ringer+Tris-HCl+dicumarol+KCl comparado con Ringer+Tris-HCl+dicumarol. ^b Comparación con efectos observados durante la misma condición luego de pre-tratamiento con Salino.

Tabla 7B.

B. Neostriado lesionado (izquierdo)			
7B.1 Pre-tratamiento con Salino (n=7)	Ringer+Tris-HCl+dicumarol (360-390min)	Ringer+Tris-HCl+dicumarol+KCl (390-420min)	% del efecto de KCl
DA	0.6±0.1	<u>4.5±2.7^a</u>	<u>750%</u>
DOPAC	0.6±0.6	<u>3.1±2.2^a</u>	<u>516%</u>
HVA	1.8±1.8	0.7±0.7	39%
5-HT	1.2±0.3	<u>5.4±2.6^a</u>	<u>450%</u>
5-HIAA	38.3±2.1	42.8±14.9	117%
7B.2. Pre-tratamiento con L-DOPA (n=5)			
DA	n.d.	n.d.	
DOPAC	<u>131.3±35.4^b</u>	<u>128.1±37.1^b</u>	98%
HVA	<u>62.5±24^b</u>	<u>75±46^b</u>	120%
5-HT	1.9±0.4	<u>4.3±1.2^a</u>	<u>226%</u>
5-HIAA	49±22.2	34±13.3	69%
7B.3. Pre-tratamiento con L-Deprenil (n=5)			
DA	<u>1.5±0.2^b</u>	2.5±0.3	167%
DOPAC	<u>8.6±3.2^b</u>	5.3±0.8	62%
HVA	<u>24±9.7^b</u>	<u>17.2±5.9^b</u>	72%
5-HT	2.9±1.8	<u>2.3±0.3^b</u>	79%
5-HIAA	<u>105±16.4^b</u>	<u>91.0±15.4^b</u>	87%
7B.4. Pre-tratamiento con L-DOPA+ L-Deprenil (n=5)			
DA	<u>1.2±0.3^b</u>	1.5±0.4	125%
DOPAC	<u>6.1±1.2^b</u>	5.8±1.6	95%
HVA	<u>13±4.8^b</u>	<u>11±3.1^b</u>	85%
5-HT	<u>2.3±0.3^b</u>	3.6±0.9	157%
5-HIAA	<u>70±27.1^b</u>	42.2±13	60%

n.d., no data, la señal de DA observado en el HPLC no fue confiable.

Comparaciones: F-ANOVA_{DA} = 1.5 (m,n=8,34); n.s; F-ANOVA_{DOPAC} = 9.5 (m,n=8,44); p<0.05; F-ANOVA_{HVA} = 3.32 (m,n=8,44); n.s; F-ANOVA_{5-HT} = 1.4 (m,n=8,44); n.s; F-ANOVA_{5-HIAA} = 2.1 (m,n=8,44); n.s. ^a Ringer+Tris-HCl+dicumarol+KCl comparado con Ringer+Tris-HCl+dicumarol. ^b Comparación con efectos observados durante la misma condición luego de pre-tratamiento con Salino.

RESUMEN DE RESULTADOS

Los principales efectos observados se resumen en las figuras 16 a 19.

Efectos observados en la liberación de DA estimulada por D-AMPH durante la perfusión con Ringer+Tris-HCl

Figura 16A muestra el efecto de D-AMPH (Ringer+Tris-HCl+D-AMPH) sobre los niveles de DA luego de pre-tratamiento con Salino (expresado como 100%). En neostriado no lesionado, el efecto de D-AMPH se observa disminuido luego de pre-tratamiento con L-DOPA. En tanto que en neostriado lesionado, el efecto de D-AMPH está drásticamente disminuido luego de pre-tratamiento con L-DOPA y/o L-Deprenil, particularmente luego de L-DOPA+L-Deprenil.

Efectos observados en la liberación de DA estimulada por D-AMPH durante la perfusión con Ringer+Tris-HCl+dicumarol

Figura 16B muestra el efecto de D-AMPH (Ringer+Tris-HCl+dicumarol+D-AMPH) sobre los niveles de DA luego de pre-tratamiento con Salino (expresado como 100 %). En neostriado no lesionado, el efecto de D-AMPH se ve drásticamente disminuido luego de pre-tratamiento con L-Deprenil y L-DOPA+L-Deprenil. En tanto que en neostriado lesionado, el efecto de D-AMPH se ve particularmente disminuido luego de pre-tratamiento con L-Deprenil.

Efectos observados en la liberación de 5-HT estimulada por D-AMPH durante la perfusión con Ringer+Tris-HCl

Figura 17A muestra el efecto de D-AMPH (Ringer+Tris-HCl+D-AMPH) sobre los niveles de 5-HT luego de pre-tratamiento con Salino (expresado como 100%). En neostriado no lesionado, el efecto de D-AMPH se observa disminuido luego de pre-tratamiento con L-Deprenil. En tanto que en neostriado lesionado, el efecto de D-AMPH no se modifica luego de pre-tratamiento con L-DOPA y/o L-Deprenil.

Efectos observados en la liberación de 5-HT estimulada por D-AMPH durante la perfusión con Ringer+Tris-HCl+dicumarol

Figura 17B muestra el efecto de D-AMPH (Ringer+Tris-HCl+dicumarol+D-AMPH) sobre los niveles de 5-HT luego de pre-tratamiento con Salino (expresado como 100%). En neostriado no lesionado, el efecto de D-AMPH aumenta luego de pre-

tratamiento con L-DOPA. En tanto que en neostriado lesionado, el efecto de D-AMPH aumenta luego de pre-tratamiento con L-DOPA+L-Deprenil.

Efectos observados en la liberación de DA estimulada por KCl durante la perfusión con Ringer+Tris-HCl

Figura 18A muestra el efecto de KCl (Ringer+Tris-HCl+KCl) sobre los niveles de DA luego de pre-tratamiento con Salino (expresado como 100%). En neostriado no lesionado, no se observa ningún cambio en el efecto de KCl luego de pre-tratamiento con L-DOPA y/o L-Deprenil. En tanto que en neostriado lesionado, el efecto de KCl está notablemente aumentado luego de pre-tratamiento con L-DOPA.

Efectos observados en la liberación de DA estimulada por KCl durante la perfusión con Ringer+Tris-HCl+dicumarol

Figura 18B muestra el efecto de KCl (Ringer+Tris-HCl+dicumarol+KCl) sobre los niveles de DA luego de pre-tratamiento con Salino (expresado como 100%). Tanto en neostriado no lesionado como lesionado el efecto de KCl está notablemente disminuido luego de pre-tratamiento con L-Deprenil y L-DOPA+L-Deprenil.

Efectos observados en la liberación de 5-HT estimulada por KCl durante la perfusión con Ringer+Tris-HCl

Figura 18A muestra el efecto de KCl (Ringer+Tris-HCl+KCl) sobre los niveles de 5-HT luego de pre-tratamiento con Salino (expresado como 100%). En neostriado no lesionado, el efecto de KCl se observa disminuido luego de pre-tratamiento con L-DOPA y L-DOPA+L-Deprenil. En tanto que en neostriado lesionado el efecto KCl se observa disminuido luego de pre-tratamiento con L-DOPA.

Efectos observados en la liberación de 5-HT estimulada por KCl durante la perfusión con Ringer+Tris-HCl+dicumarol

Figura 19B muestra el efecto de KCl (Ringer+Tris-HCl+dicumarol+KCl) sobre los niveles de 5-HT luego de pre-tratamiento con Salino (expresado como 100%). En neostriado no lesionado se observa una disminución del efecto de KCl luego de pre-tratamiento con L-DOPA y/o L-Deprenil. En tanto que en neostriado lesionado también se observa una disminución del efecto de KCl luego de pre-tratamiento con L-DOPA y/o L-Deprenil, particularmente luego de L-Deprenil.

Figuras 16-19: Resumen en términos porcentuales de los efectos de pre-tratamiento en los niveles de DA y 5-HT estimulados con D-AMPH o KCl.

Figura 16: Efectos de la perfusión intracerebral con Ringer+100 mM Tris-HCl+100 μ M D-AMPH (300-330 min) (A), o Ringer+100 mM Tris-HCl+100 μ M dicumarol+100 μ M D-AMPH (300-330 min) (B) sobre los niveles de *dopamina* (DA) medidos en 60 μ l de dializado obtenido a través de microdialisis *in vivo* desde neostriado no lesionado y lesionado de ratas con hemiparkinson experimental, expresado como el porcentaje de la condición basal. Los niveles fueron medidos bajo condiciones de pre-tratamiento sistémico: Salino, L-DOPA, y/o L-Deprenil. ^a Efecto de pre-tratamiento (*versus* Salino). La línea horizontal sobre cada experimento denota tratamiento con D-AMPH.

Figura 16A (Perfusión intracerebral con Ringer+Tris-HCl)

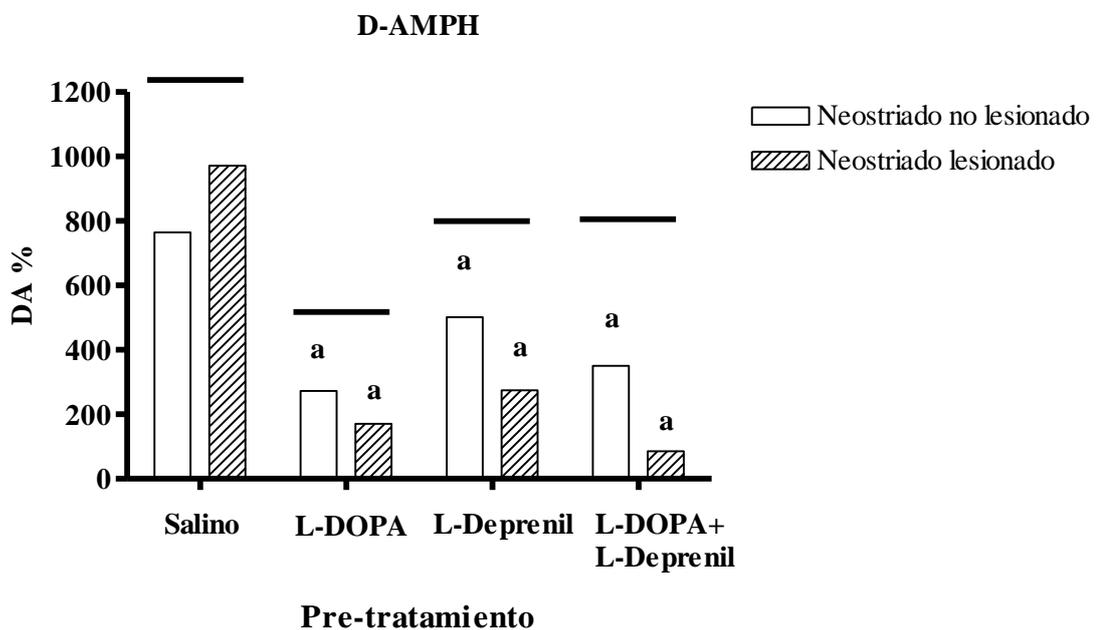


Figura 16B (Perfusión intracerebral con Ringer+Tris-HCl+dicumarol)

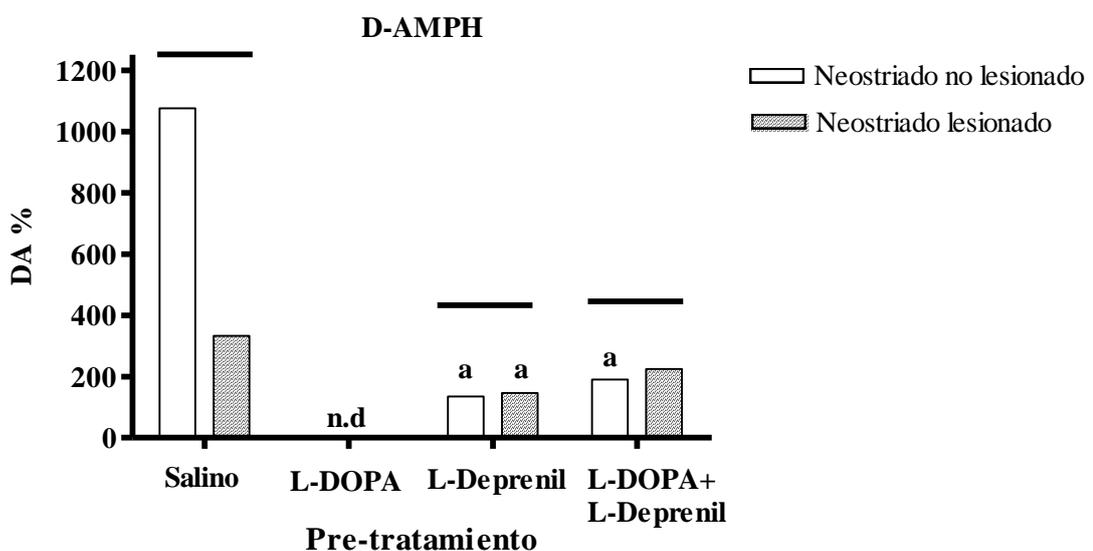


Figura 17: Efectos de la perfusión intracerebral con Ringer+100 mM Tris-HCl+100 μ M D-AMPH (300-330 min) (A) o Ringer+100 mM Tris-HCl+100 μ M dicumarol+100 μ M D-AMPH (300-330 min) (B) sobre los niveles de *serotonina* (5-HT) medidos en 60 μ l de dializado obtenido a través de microdialisis *in vivo* desde neostriado no lesionado y lesionado de ratas con hemiparkinson experimental, expresado como el porcentaje de la condición basal. Los niveles fueron medidos bajo condiciones de pre-tratamiento sistémico: Salino, L-DOPA, y/o L-Deprenil. ^a Efecto de pre-tratamiento (*versus* Salino). La línea horizontal sobre cada experimento denota tratamiento con D-AMPH.

Figura 17A (Perfusión intracerebral con Ringer+Tris-HCl)

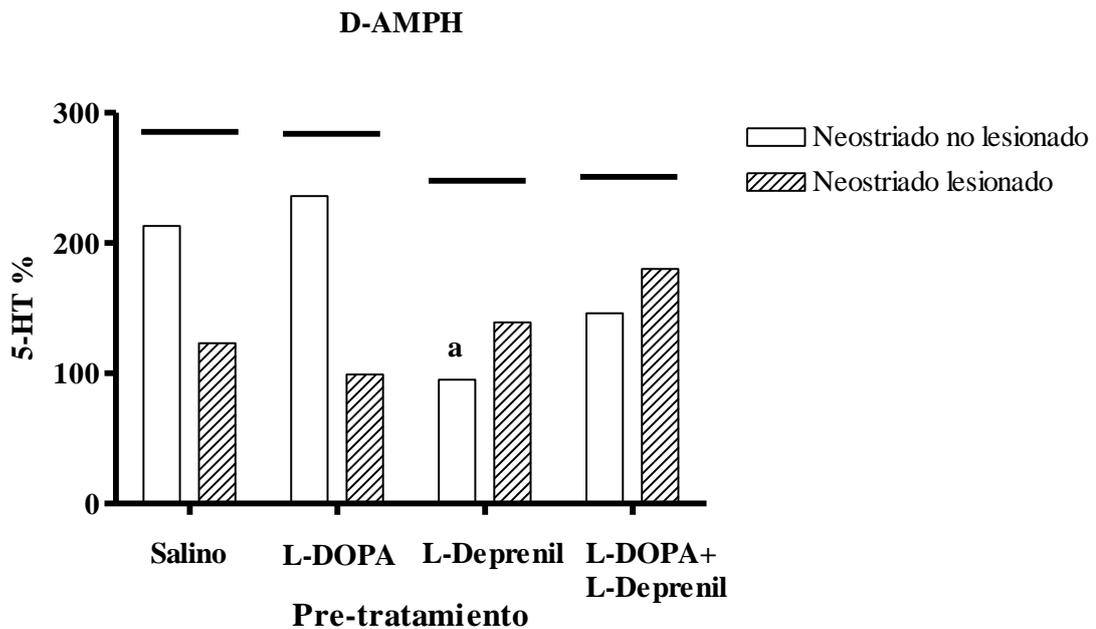


Figura 17B (Perfusión intracerebral con Ringer+Tris-HCl+dicumarol)

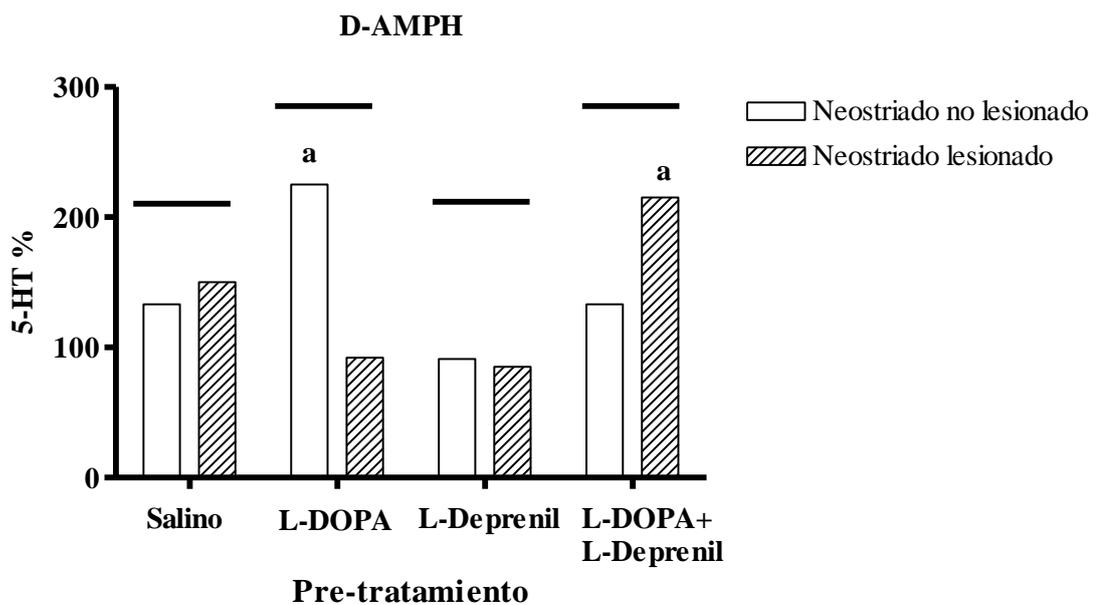


Figura 18: Efectos de la perfusión intracerebral con Ringer+100 mM Tris-HCl+100 mM KCl (390-420 min) (A) o Ringer+100 mM Tris-HCl+100 μM dicumarol+100 mM KCl (390-420 min) (B) sobre los niveles de *dopamina* (DA) medidos en 60 μl de dializado obtenido a través de microdialisis *in vivo* desde neostriado no lesionado y lesionado de ratas con hemiparkinson experimental, expresado como el porcentaje de la condición basal. Los niveles fueron medidos bajo condiciones de pre-tratamiento sistémico: Salino, L-DOPA, y/o L-Deprenil. ^a Efecto de pre-tratamiento (*versus* Salino). La línea horizontal sobre cada experimento denota tratamiento con KCl.

Figura 18A (Perfusión intracerebral con Ringer+Tris-HCl)

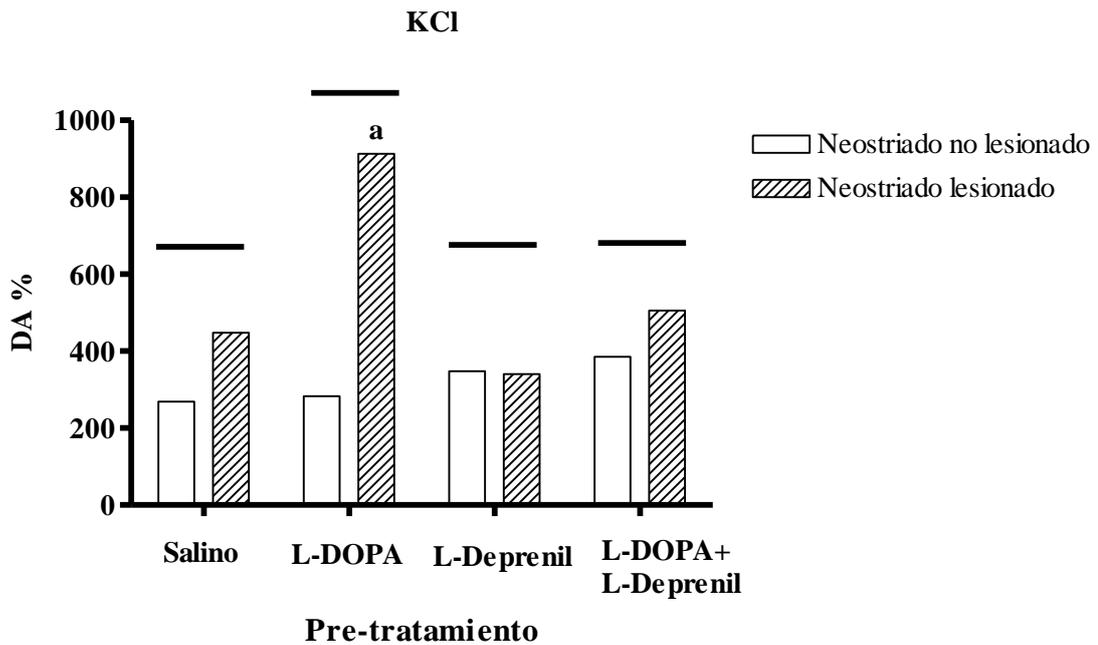


Figura 18B (Perfusión intracerebral con Ringer+Tris-HCl+dicumarol)

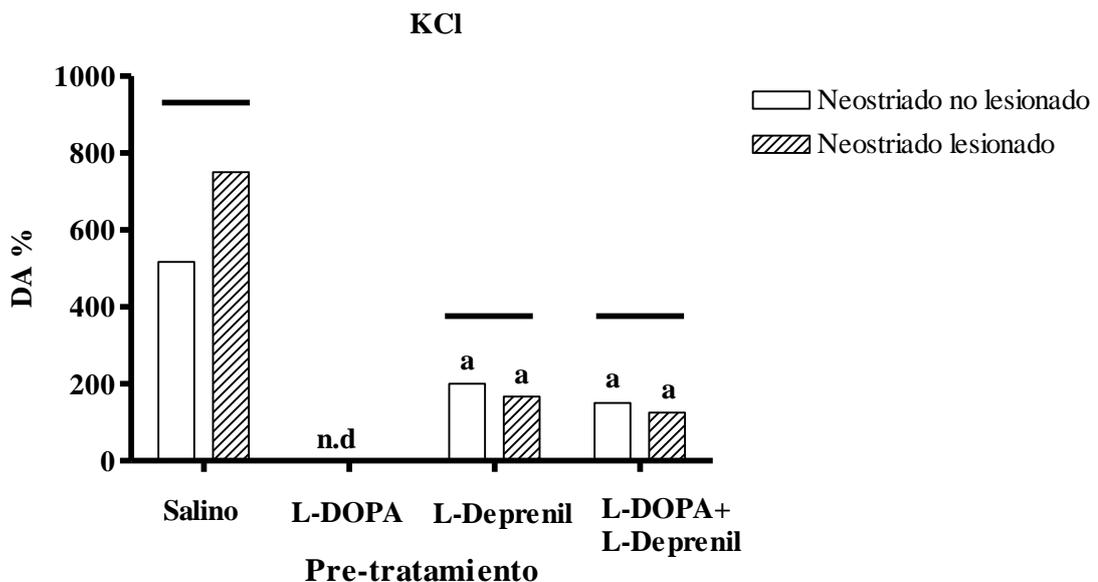


Figura 19: Efectos de la perfusión intracerebral con Ringer+100 mM Tris-HCl+100 mM KCl (390-420 min) (A) o Ringer+100 mM Tris-HCl+100 μ M dicumarol+100 mM KCl (390-420 min) (B) sobre los niveles de *serotonina* (5-HT) medidos en 60 μ l de dializado obtenido a través de microdialisis *in vivo* desde neostriado no lesionado y lesionado de ratas con hemiparkinson experimental, expresado como el porcentaje de la condición basal. Los niveles fueron medidos bajo condiciones de pre-tratamiento sistémico: Salino, L-DOPA, y/o L-Deprenil. ^aEfecto de pre-tratamiento (*versus* Salino). La línea horizontal sobre cada experimento denota tratamiento con KCl.

Figura 19A (Perfusión intracerebral con Ringer+Tris-HCl)

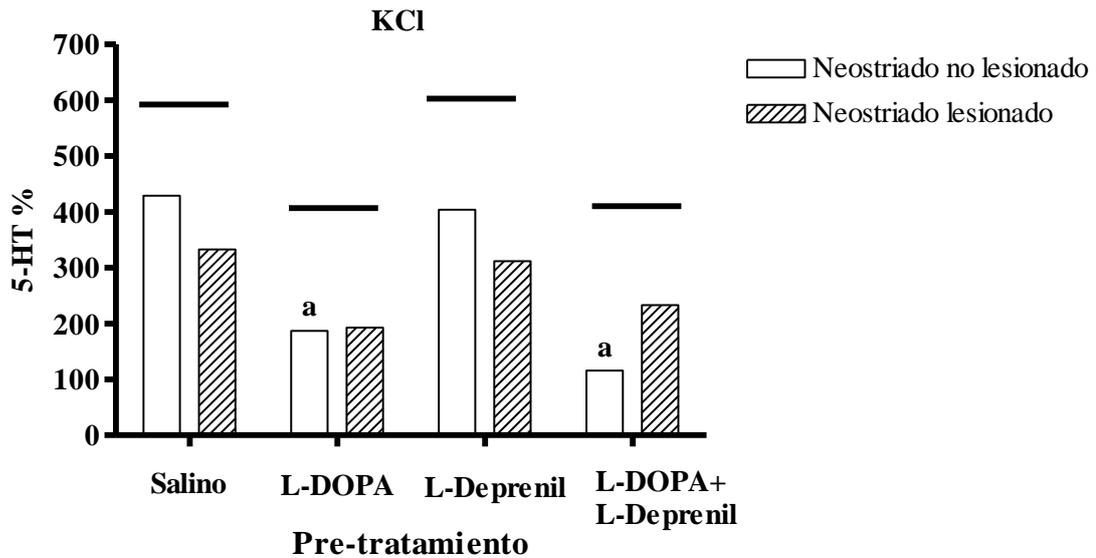
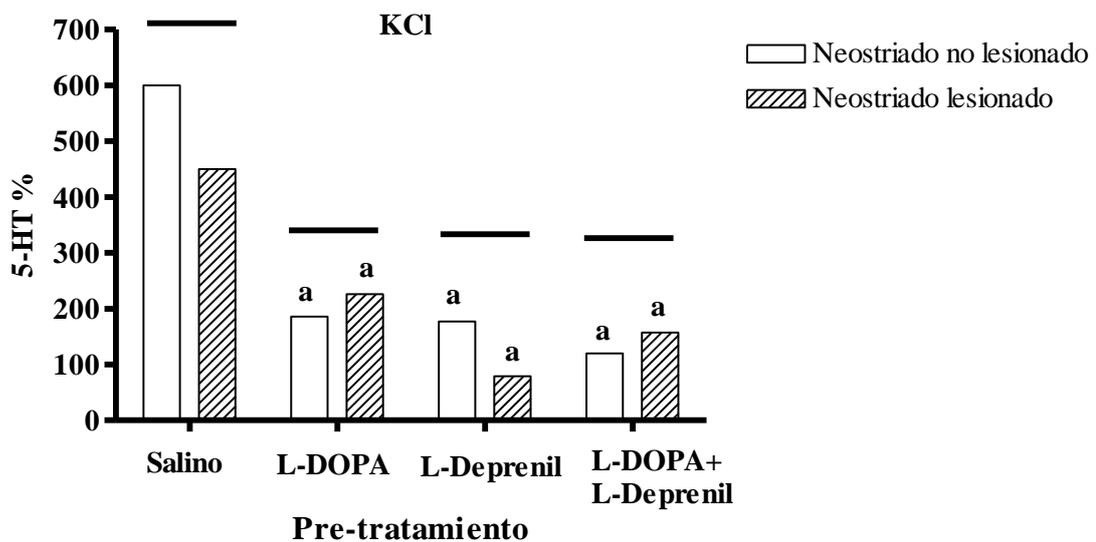


Figura 19B (Perfusión intracerebral con Ringer+Tris-HCl+dicumarol)



8. DISCUSIÓN

La lesión con 6-OHDA provocó una asimetría motora, aún cuando los animales lesionados presentaron un comportamiento exploratorio normal durante los primeros días del post-operatorio. La ganancia de peso fue equivalente al de los animales controles. Sin embargo al transcurrir los días, los animales lesionados presentaron una desviación postural, e incluso escoliosis como consecuencia directa del desbalance dopaminérgico unilateral con un aumento en el tono de la musculatura esquelética, incluyendo los músculos paravertebrales, como se ha reportado previamente (Herrera-Marschitz *et al.*, 1990).

Los resultados obtenidos permiten confirmar que la lesión del haz medial cerebral con la neurotoxina 6-OHDA es específica para las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* donde se originan los haces que proyectan hacia el neostriado, evaluado a través de: (i) la administración de fármaco agonista de acción post-sináptica (APO) que evocó una rotación contralateral a la lesión por acción directa sobre receptores supersensibilizados del lado lesionado (Ungerstedt, 1971e); (ii) evaluación de los niveles de DA y sus metabolitos. Los resultados muestran una importante disminución de los niveles de DA y sus metabolitos en el neostriado lesionado con respecto al neostriado no lesionado evaluado con microdiálisis. La lesión no afectó los niveles de 5-HT ni de su metabolito 5-HIAA.

El análisis del curso temporal de la rotación evocada por la administración de APO indica que el efecto transcurre en una sola fase, es decir, se presenta un solo pico de máxima actividad rotacional. No obstante, se ha descrito que en animales con una depleción de DA mayor al 90% el efecto de APO transcurre en dos fases con un pico de actividad rotacional a los 10 min y otro posterior a los 30 min (Herrera-Marschitz y Ungerstedt, 1984a; Herrera-Marschitz *et al.*, 2007). En nuestros resultados no se distinguen las dos fases descritas, ello puede obedecer a que se definieron períodos de totalizaciones parciales cada 10 min, quizás con períodos de totalizaciones menores sería posible observar dos fases de respuesta a APO. Otra posibilidad, es que a los animales se les haya practicado una de-aferentación dopaminérgica unilateral en que la depleción de DA sería menor al 90%.

Los pre-tratamientos farmacológicos con L-DOPA y/o L-Deprenil destinados a producir una sobrecarga de DA resultaron efectivos (ver Tabla 4A/B). El tratamiento con L-DOPA permite aumentar los niveles de DA, siendo la principal herramienta farmacológica utilizada en la enfermedad de Parkinson. En efecto, L-DOPA eleva los

niveles de DA observados en neostriado lesionado, indicando que luego del pre-tratamiento sistémico L-DOPA atraviesa la barrera hematoencefálica, alcanza el tejido nervioso y se transforma en el neurotransmisor DA debido a que se incorpora a la cadena biosintética de esta catecolamina, indicando además que la conversión de L-DOPA a DA no requiere de la integridad del sistema de biosíntesis de la DA tal como lo sugiere la experiencia clínica. Se observa también un efecto del pre-tratamiento con L-DOPA en los niveles de 5-HT. Al evaluar los niveles de DA y 5-HT en la condición Ringer+Tris-HCl, se observó que, en la fracción 270-300 min, DA aumentó ~6 veces, en tanto que 5-HT aumentó >2 veces comparado con los niveles detectados en la fracción 90-120 min. Este resultado es interesante, en particular cuando se considera que la biotransformación de L-DOPA depende en parte de la biodisponibilidad de la AADC en las terminales serotoninérgicas. En todo caso, el efecto de L-DOPA en los niveles de DA fue más prominente.

Estudios realizados en ratas han demostrado que la administración de L-Deprenil, un inhibidor de MAO_{A/B} produce un aumento de los niveles de DA y 5-HT en el neostriado (Cesura y Pletscher, 1992). Los resultados obtenidos en ratas pre-tratadas con L-Deprenil muestran, en esta Tesis, un aumento de los niveles de DA e incluso una disminución de los metabolitos DOPAC y HVA, confirmando además el curso de esta vía canónica para el metabolismo de DA. L-Deprenil también produjo un aumento en los niveles de 5-HT en neostriado, confirmando que esta indolamina se degrada con la participación de MAO. Estos hallazgos experimentales sostienen la racionalidad del tratamiento en la enfermedad de Parkinson con L-DOPA y L-Deprenil, cuyo objetivo es re-establecer los niveles de DA de estos pacientes. Aunque por mecanismos distintos ambos fármacos, son eficaces para elevar los niveles de DA.

Al realizar una perfusión con D-AMPH, este fármaco difunde desde la sonda de microdiálisis hacia el intersticio neuronal donde ejerce su mecanismo de acción promoviendo la liberación de neurotransmisores monoaminérgicos (Fuxe y Ungerstedt, 1974). En este estudio se observó que la perfusión con D-AMPH (Ringer+Tris-HCl+D-AMPH) aumenta los niveles de DA y 5-HT en neostriado luego de pre-tratamiento con Salino (ver Tabla 4A; bloque 4A.1) (comparado a la condición Ringer+Tris-HCl). Los valores observados son menores (>7 veces y ~2 veces para DA y 5-HT, respectivamente) a los obtenidos en otros estudios que se han realizado en el mismo laboratorio. En esos estudios los niveles evocados por la administración de D-AMPH aumentan ~20 veces y ~3 veces para DA y 5-HT respectivamente. Sin embargo, es

pertinente considerar que las sondas utilizadas en estudios anteriores tenían una membrana semipermeable de mayor longitud. Esta condición incide directamente en la capacidad dializante de la sonda, que es definida por la recuperación (*recovery*) para cada sustancia en particular, siendo mayor para sondas con membranas de mayor longitud.

Se ha propuesto que el fármaco dicumarol, conocido por sus propiedades anticoagulantes, es un inhibidor de la enzima DT-diaforasa (Lind *et al.*, 1982; Schultzberg *et al.*, 1988; Segura-Aguilar y Lind, 1989; Paris *et al.*, 2001), revelando un metabolismo de la DA por vías no-canónicas. En el presente estudio no se observó ningún cambio sobre la biodisponibilidad de DA al perfundir intracerebralmente dicumarol (Ringer+Tris-HCl+dicumarol) (ver Tabla 5A/B; Bloque 5A.1 y 5B.1) comparado a la condición control (Ringer+Tris-HCl) (ver Tabla 4A/B; Bloque 4A.1 y 4B.1). La administración de pre-tratamiento sistémico con L-DOPA y/o L-Deprenil en la condición de perfusión con dicumarol (Ringer+Tris-HCl+dicumarol) tampoco afectó los niveles de monoaminas y sus metabolitos (ver Tabla 5A/B).

La perfusión con dicumarol disminuye, sin embargo, el efecto de D-AMPH sobre la liberación de DA en neostriado lesionado luego de pre-tratamiento con Salino (ver Tabla 4B y Tabla 5B; comparar bloque 4B.1 *versus* 5B.1). En realidad, dicumarol atenúa el efecto de D-AMPH en todas las condiciones experimentales con un pre-tratamiento previo (L-DOPA y/o L-Deprenil), pero no el efecto de KCl en las condiciones experimentales equivalentes. Es interesante destacar que dicumarol no afecta significativamente los niveles de 5-HT, luego de pre-tratamiento con Salino, L-DOPA, y/o L-Deprenil. En conjunto, estos resultados sugieren un efecto en la biodisponibilidad de DA en el compartimiento citosólico, pero no en el vesicular. Esta observación está de acuerdo con la idea de que la DT-diaforasa está implicada en un metabolismo no-canónico de la DA citosólica, pero no en la vesicular o extracelular. Es interesante destacar además, que los niveles de DOPAC en neostriado lesionado aumentan >2 veces luego de tratamiento local con dicumarol, a continuación de pre-tratamiento con L-DOPA. Los niveles de HVA parecen disminuir en las mismas condiciones (ver Tabla 5B; bloque 5B.2). Esto refuerza la idea de dicumarol participa en un metabolismo citosólico, ya que DOPAC refleja metabolismo intracelular, en tanto que HVA refleja metabolismo extracelular, a través de la participación de la enzima COMT.

El efecto esperable de la perfusión con una solución depolarizante de KCl que actúa como agente depolarizante neuronal inespecífico es la liberación masiva de neurotransmisores almacenados en vesículas pre-sinápticas. Efectivamente resultados obtenidos en este mismo laboratorio muestran un incremento de la concentración de DA y 5-HT (~10 veces y ~3 veces, respectivamente) en fracciones de dializados (Romero *et al.*, 2006). En los presentes resultados la perfusión con KCl provocó un aumento en los niveles de DA y 5-HT un poco menores a los obtenidos en otros estudios. No obstante se debe considerar que el pulso de KCl fue aplicado luego de tratamiento local con D-AMPH. Diferencias en la longitud de la membrana semipermeable de la sonda de microdialisis utilizada en este estudio también pueden explicar en parte estos resultados.

KCl provocó un aumento en la liberación de DA particularmente importante en neostriado lesionado luego de pre-tratamiento con L-DOPA, probablemente debido a que las neuronas dopaminérgicas sobrevivientes a la degeneración poseen un elevado metabolismo y un *pool* vesicular de alta capacidad y/o un elevado número de vesículas pre-sinápticas ancladas en la zona activa de la membrana celular de las terminales dopaminérgicas remanentes.

9. CONCLUSIONES

1.- Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que la lesión unilateral con 6-OHDA produce una de-aferentación dopaminérgica selectiva, reflejada en el modelo rotacional y microdiálisis. La lesión produjo una disminución de DA y sus metabolitos, pero no de 5-HT y 5-HIAA evaluados simultáneamente.

2.- El precursor exógeno L-DOPA aumentó significativamente los niveles de DA y sus metabolitos DOPAC y HVA en el cerebro de-aferentado. Sin embargo, L-DOPA no revirtió el déficit a la condición normal. L-Deprenil elevó las concentraciones de DA y 5-HT, pero disminuyó las concentraciones de sus metabolitos, confirmando que gran parte del metabolismo canónico de la DA transcurre por la enzima MAO. Sin embargo, el efecto en el metabolismo de 5-HT fue menor, sugiriendo una acción preferencial en la enzima MAO_B, para la cual 5-HT no es sustrato.

3.- El efecto de L-DOPA sobre los niveles de DA y sus metabolitos se potenció al combinar el pre-tratamiento con L-Deprenil. Estos hallazgos experimentales sostienen la racionalidad del tratamiento de la enfermedad de Parkinson con L-DOPA y L-Deprenil simultáneamente, re-estableciendo los niveles de DA de estos pacientes a través de distintos mecanismos de acción.

4.- La inhibición de la enzima DT-diaforasa a través de la perfusión intracerebral con dicumarol no modificó la biodisponibilidad de DA evaluada en condiciones basales, pero afectó en particular la liberación basal y estimulada (D-AMPH y/o KCl) de las monoaminas luego de pre-tratamiento con L-DOPA y/o L-Deprenil, sugiriendo una menor biodisponibilidad luego de la inhibición de la vía no-canónica de metabolismo intracelular.

5.- Estos resultados sugieren que la menor biodisponibilidad de DA citosólica obedece a la ocurrencia de fenómenos auto-oxidativos con la participación de la enzima NADPH-citocromo P450 reductasa, lo cual llevaría a la formación de radicales libres que conllevan finalmente a la injuria celular.

6.- Finalmente los resultados obtenidos reafirman el rol neuroprotector de la enzima DT-diaforasa en el metabolismo no-canónico de la DA. De este modo se insta al desarrollo de futuras investigaciones para potenciar una mayor expresión y/o actividad de esta importante enzima. Pudiendo ser esta enzima uno de los múltiples factores que inciden en la enfermedad de Parkinson y que merece ser estudiada en profundidad.

10. BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, J.D.; ODUNZE, I.N.** 1991. Oxygen free radicals and Parkinson's disease. *Free Rad. Biol. Med.* 10:161–169.
- ALAM, Z.I.; JENNER, A.; DANIEL, S.E.; LEES, A.J.; CAIRNS, N.; MARSDEN, C.D.; JENNER, P.; HALLIWELL, B.** 1997. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J. Neurochem.* 69:1196–1203.
- ANDÉN, N.E.; DAHLSTRÖM, A.; FUXE, K.; LARSSON, K.; OLSON, L.; UNGERSTEDT, U.** 1966. Ascending monoamine neurons to the telencephalon and diencephalon. *Acta Physiol. Scand.* 67:313-326.
- ARCHIBALD, F.; TYREE, C.** 1987. Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Arch. Biochem. Biophys.* 256:638-650.
- ASANUMA, M.; MIXAZAKI, I.; OGAWA, N.** 2003. Dopamine-or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Res.* 5:165-176.
- BAEZ, S.** 1999. Dopachrome and aminochrome, the oxidized metabolites of DOPA and dopamine: studies on the molecular mechanisms underlying their reduction and conjugation with glutathione. Thesis doctoral. Stockholm, Sweden. Stockholm's University, Unit for Biochemistry Toxicology, Department of Biochemistry. 56p.
- BAEZ, S.; LINDERSON, Y.; SEGURA-AGUILAR, J.** 1995. Superoxide dismutase and catalase enhance autoxidation during one-electron reduction of aminochrome by NADPH cytochrome P450 reductase. *Biochem. Mol. Med.* 54:12-18.
- BARBEAU, A.** 1984. Manganese and extrapyramidal disorders. *Neurotoxicity* 5:13-35.
- BERNHEIMER, H.** 1963. Zur biochemie des Parkinsosyndroms des Mench. *Klin. Wochenschr.* 41:564-569.
- BIRKMAYER, W.; KNOLL, J.; RIEDERER, P.** 1985. Increased life expectancy resulting from addition of L-deprenyl to Madopar treatment in Parkinson's disease: a long term study. *J. Neural. Transm.* 64:113-127.
- CADENAS, E.; MIRA, D.; BRUNMARK, A.; LIND, C.; SEGURA-AGUILAR, J.; ERNSTER, L.** 1988. Effect of superoxide dismutase on the autoxidation of various hydroquinones- a possible role of superoxide dismutase as a superoxide: semiquinone oxidoreductase. *Free Rad. Biol. Med.* 5:71-79.

- CADET, J.L.; KATZ, M.; JACKSON-LEWIS, V.; FAHN, S.** 1989. Vitamin E attenuates the toxic effects of intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats: behavioral and biochemical evidence. *Brain Res.* 476:10–15.
- CARLSSON, A.** 1959. The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol. Rev.* 11:490.
- CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T.** 1957. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as a reserpine antagonist. *Nature.* 180:1200.
- CESURA, A.M.; PLETSCHER, A.** 1992. The new generation of monoamine oxidase inhibitors. *Prog. Drugs Res.* 38:171-297.
- CHOUZA, C.; ROMERO, S.; GOMENSORO, J.B.** 1975. “Long Term Syndrome” en el tratamiento del parkinsonismo con L-DOPA. *Acta Neurol. Latinoam.* 21:108-125.
- COHEN, G.; PASIK, P.; COHEN, B.** 1984. Pargyline and deprenyl prevent the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in monkeys. *Eur. J. Pharmacol.* 106:209-210.
- CONICYT.** 1994. “Manual de Normas de Bioseguridad”, editado por la Comisión Nacional de Investigación Ciencia y Tecnología, Santiago, Chile. 139p.
- COOPER, J.R.; BLOMM, F.E.; ROTH, R.H.** 2003. The biochemical basis of neuropharmacology. 8th Edition, Oxford University Press, New York.
- DAHLSTRÖM, A.; FUXE, K.** 1965. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system: Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. Karolinska Institute Thesis. *Acta Physiol. Scand.* 232 (Suppl. 62):1-55.
- DEXTER, D.T.; CARTER, C.J.; WELLS, F.R.; JAVOY-AGID, F.; AGID, Y.; LEES, A.; JENNER, P.; MARSDEN, C.D.** 1989. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson’s disease. *J. Neurochem.* 52:381–389.
- DEXTER, D.T.; HOLLEY, A.E.; FLITTER, W.D.; SLATER, T.F.; WELLS, F.R.; DANIEL, S.E.; LEES, A.J.; JENNER, P.; MARSDEN, C.D.** 1994. Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study. *Mov. Disord.* 9:92–97.
- ERNSTER, L.** 1987. DT-diaphorase: a historical review. *Chem. Scripta* 27:1-13.
- FAHN, S.** 1997. Levodopa-induced neurotoxicity. Does it represent a problem for the treatment of Parkinson’s disease? *CNS Drugs* 8:376-393.
- FAHN, S.** 1999. Parkinson disease, the effect of L-DOPA, and the L-DOPA trial. Earlier vs Later L-DOPA. *Arch. Neurol.* 56:256-261.

- FAHN, S.; COHEN, G.** 1992. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann. Neurol.* 32:804–812.
- FLÓREZ, J.; MARTÍNEZ-LAGE, J.M.** 1984. *Neurofarmacología Fundamental y Clínica*. Ediciones Universidad de Navarra, S.A. Pamplona, España. 819p.
- FUXE, K.; UNGERSTEDT, U.** 1974. Action of caffeine and Theophylline on supersensitive dopamine receptors: considerable enhancement of receptor response to treatment with L-DOPA and dopamine receptor agonist. *Med. Biol.* 52:48.
- GERLACH, M.; RIEDERER, P.; PRZUNTEK, H.; YODIM, MBH.** 1991. MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease. *Eur. J. Pharmacol.* 208:273-386.
- GERLACH, M.; BEN-SACHAR, D.; RIEDERER, P.; YODIM, MBH.** 1994. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative disease. *J. Neurochem.* 63:793-806.
- GERLACH, M.; DOUBLE, K.; REICHMANN, H.; RIEDERER, P.** 2003. Arguments for the use of dopamine receptor agonists in clinical and preclinical Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.* 65:167–83.
- GRAHAM, D.G.** 1978. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol. Pharmacol.* 14:633-643.
- GRAHAM, D.G.** 1984. Catecholamine Toxicity: A proposal for the molecular Pathogenesis of manganese neurotoxicity and Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 5:83-96.
- HAGLUND, L.; KÖHLER, C.; HAAPARANTA, T.; GOLDSTEIN, M.; GUSTAFSSON, J-Å.** 1984. Presence of NADPH: cytochrome P450 reductase in central catecholaminergic neurons. *Nature* 307:259-262.
- HALL, DWR.; LOGAN, B.W.; PARSONS, G.H.** 1969. Further studies on the inhibition of monoamine oxidase by MB 9302 (clorgyline). *Biochem. Pharmacol.* 18:1447-1454.
- HALLIWELL, B.** 1992a. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 59:1609-1623.
- HALLIWELL, B.** 1992b. Oxygen radicals as key mediators in neurological disease: fact or fiction. *Ann. Neurol.* 32 (Suppl):10-15.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, JMC.** 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219:11-14.
- HERRERA-MARSCHITZ, M.** 1986. *Neuropharmacology and functional anatomy of the basal ganglia*. Karolinska Institute-Thesis. Stockholm. 79p.

- HERRERA-MARSCHITZ, M.; UNGERSTEDT, U.** 1984a. Evidence that apomorphine and pergolide induce rotation in rats by different actions on D1 and D2 receptor sites. *Eur. J. Pharmacol.* 98:165-176.
- HERRERA-MARSCHITZ, M.; UNGERSTEDT, U.** 1984b. Evidence that striatal efferents relate to different dopamine receptors. *Brain Res.* 323:269-278.
- HERRERA-MARSCHITZ, M.; UTSUMI, U.; UNGERSTEDT, U.** 1990. Scoliosis in rats with experimentally-induced hemiparkinsonism: dependence upon striatal dopamine denervation. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 53:39-43.
- HERRERA-MARSCHITZ, M.; YOU, Z.B.; GOINY, M.; MEANA, J.J.; SILVEIRA, R.; GODUKHIN, O.V.; CHEN, Y.; ESPINOZA, S.; PETTERSON, E.; LOIDL, C.F.; LUBEC, G.; ANDERSSON, K. NYLANDER, I.; TERENIUS, L.; UNGERSTEDT, U.** 1996. On the origin of the extracellular glutamate levels monitored in the basal ganglia of the rat by *in vivo* microdialysis. *J. Neurochem.* 66:1726-1735.
- HERRERA-MARSCHITZ, M.; BUSTAMANTE, D.; MORALES, P.; GOINY, M.** 2007. Exploring neurocircuitries of the basal ganglia by intracerebral administration of selective neurotoxins. *Neurotoxicity Res.* 3:1-14.
- HIRSCH, E.; GRAYBIEL, A.M.; AGID, G.A.** 1988. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in PD. *Nature.* 28:345-348.
- HOEHN, M.M.; YAHR, M.D.** 1967. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurol.* 17:427-442.
- HORNYKIEWICZ, O.** 1963. Topography and behaviour of noradrenaline and dopamine in the substantia nigra of normal and Parkinsonian patients. *Wien Klin. Wochensch.* 75:309-315.
- HORNYKIEWICZ, O.** 2002. L-DOPA: From biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent. *Amino Acids* 23:65-70.
- JENNER, P.** 1994. Oxidative damage in neurodegenerative disease. *Lancet.* 344:796-798.
- JENNER, P.; ROSE, S.; NOMOTO, M.; MARSDEN, C.D.** 1987. MPTP-induced parkinsonism in the common marmoset: behavioural and biochemical effects. *Adv. Neurol.* 45:183-186.
- JENNER, P.; OLANOW, C.W.** 1998. Understanding cell death in Parkinson's Disease. *Ann. Neurol.* 44 (Suppl):72-84.
- JONSON, G.; SACHS, S.** 1970. Effects of 6-hydroxydopamine on the uptake and storage of noradrenaline in sympathetic adrenergic neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 9:1141-1155.

- KATO, T.; DONG, B.; ISHII, K.; KINEMUCHI, H.** 1986. Brain dialysis: in vivo metabolism of dopamine and serotonin by monoamine oxidase A but not B in the striatum of unrestrained rats. *J. Neurochem.* 46:1277-1282.
- KNOLL, J.** 1979. Deprenyl: The MAO inhibitor without the cheese effect. *TINS.* 2:111-113.
- KNOLL, J.** 2000. Deprenyl (Selegiline): past, present and future. *Neurobiol.* 8:179-199.
- KNOLL, J.; ECSERI, Z.; KELEMEN, K.; NIEVEL, J.; KNOLL, B.** 1965. Phenylisopropylmethyl propinylamine (E-250) a new psychic energizer. *Arch. Int. Pharmacodyn. Théor.* 155:154-164.
- KNOLL, J.; MAGYAR, K.** 1972. Some puzzling effects of monoamine oxidase inhibitors. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 5:393-408.
- KNOLL, J.; MIKLYA, I.; KNOLL, B.; MARKÓ, R.; KELEMEN, K.** 1996. (-) Deprenyl and (-) 1-phenyl-2-propylaminopentane ((-) PPAP) act primarily as potent stimulant's of action potential-transmitter release coupling in the catecholaminergic neurons. *Life Sci.* 58:817-827.
- KOSTRZEWA, R.M.; JACOBOWITZ, D.M.** 1974. Pharmacological actions of 6-hydroxydopamine. *Pharmacol. Rev.* 26:199-288.
- KOSTRZEWA, R.M.; KOSTRZEWA, J.P.; BRUS, R.** 2002. Neuroprotective and neurotoxic roles of Levodopa (L-DOPA) in neurodegenerative disorders relating to Parkinson's disease. *Amino Acids* 23:57-63.
- KUMAR, R.; AGARWAL, A.K.; SETH, P.K.** 1995. Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine. *J. Neurochem.* 64:1703-1707.
- LAI, C.T.; YOU, P.H.** 1997. Dopamine and L-DOPA induced cytotoxicity towards catecholaminergic neuroblastoma SH-5Y5Y cells. Effects of oxidative stress and antioxidative factors. *Biochem. Pharmacol.* 53:363-372.
- LAMENSDORF, I.; YODIM, M.B.; FINBERG, J.P.** 1996. Effect of long-term treatment with selective monoamine oxidase A and B inhibitors on dopamine release from rat striatum in vivo. *J. Neurochem.* 67:1532-1539.
- LIND, C.; HOSCHSTEIN, P.; ERNSTER, L.** 1982. DT-diaphorase as a quinone reductase: a cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation. *Arch. Biochem. Biophys.* 216:178-185.
- LJUNGBERG, T.; UNGERSTEDT, U.** 1976a. Reinstatement of eating by dopamine agonists in aphagic dopamine denervated rats. *Physiol. Behav.* 16:277-283.

- LJUNGBERG, T.; UNGERSTEDT, U.** 1976b. Sensory inattention produced by 6-hydroxydopamine induced degeneration of ascending dopamine neurons in the brain. *Exp. Neurol.* 53:585-600.
- LLOYD, RV.** 1997. Mechanism of manganese-catalyzed autoxidation of dopamine. *Chem. Res. Toxicol.* 8:111-116.
- MANN, J.J.; GERSHON, S.** 1980. A selective monoamine oxidase-B inhibitor in endogenous depression. *Life Sci.* 26:877-882.
- MÄNNINSTÖ, P.T.; KAAKKOLA, S.** 1990. Rationale for selective COMT inhibitors as adjuncts in the drug treatment of Parkinson's disease. *Pharmacol. Toxicol.* 66:317-323.
- MAYO, J.C.; SAINZ, R.M.; TAN, D.X.; ANTOLIN, I.; RODRÍGUEZ, C.; REITER, R.J.** 2005. Melatonin and Parkinson's disease. *Review Endocrine* 27:169-178.
- NAGATSU, T.; LEVITT, M.; UDENFRIEND, S.** 1964. Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 239:2910-2917.
- OLANOW, C.V.** 1993. A radical hypothesis for neurodegeneration. *TINS* 16:439-444.
- PARIS, I.; DAGNINO-SUBIABRE, A.; MARCELAIN, K.; BENNETT, L.B.; CAVIEDES, P.; CAVIEDES, R.** 2001. Copper neurotoxicity is dependent on dopamine-mediated Copper uptake and one-electron reduction of aminochrome in a rat substantia nigra neuronal cell line. *J. Neurochem.* 77:519-529.
- PAXINOS, G.; WATSON, C.** 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press. New York, USA. 128p.
- POEWE, W.H.; WENNING, G.K.** 1996. The natural history of Parkinson's disease. *Neurol.* 47 (Suppl 3):146-152.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.** 1995. *Farmacología.* 2ª Edición. Churchill Communications Europe España. Madrid, España. 1023p.
- RINNE, V.K.** 1983. Problems associated with long-term levodopa treatment of Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand.* 68 (Suppl. 95):19-23.
- ROMERO, C.** 2005. Evaluación conductual y bioquímica del efecto de derivados anfetamínicos en ratas con hemiparkinson experimental. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 75p.
- ROMERO, C.; BUSTAMANTE, D.; ZAPATA-TORRES, G.; GOINY, M.; CASSELS, B.; HERRERA-MARSCHITZ, M.** 2006. Neurochemical and Behavioural characterisation of alkoxyamphetamine derivatives in rats. *Neurotoxicity Res.* 1:11-22.
- SCHAPIRA, A.H.** 2005. Present and future drug treatment for Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 76:1472-1478.

- SCHULTZ, W.** 1988. MPTP-induced parkinsonism in monkeys: mechanism of action, selectivity and pathophysiology. *Gen. Pharmacol.* 19:153-161.
- SCHULTZBERG, M.; SEGURA-AGUILAR, J.; LIND, C.** 1988. Distribution of DT-diaphorase in the rat brain: biochemical and immunohistochemical studies. *Neuroscience* 27:763-776.
- SEGURA-AGUILAR, J.** 1996. Peroxidase activity of liver microsomal vitamin D 25 hydroxylase and cytochrome P450 1A2 catalyzes 25-hydroxylation of vitamin D₃ and oxidation of dopamine to aminochrome. *Biochem. Mol. Med.* 58:122-129.
- SEGURA-AGUILAR, J.E.; LIND, C.; NORDSTRÖM, Ö.; BARTFAI, T.** 1987. Regional and subcellular distribution of DT-diaphorase in the rat brain. *Chem. Scripta.* 27:55-57.
- SEGURA-AGUILAR, J.; LIND, C.** 1989. On the mechanism of the Mn³⁺-induced neurotoxicity of dopamine prevention of quinone-derived oxygen toxicity by DT-diaphorase and superoxide dismutase. *Chem. Biol. Interac.* 72:309-324.
- SEGURA-AGUILAR, J.; METODIEWA, D.; WELCH, C.J.** 1998. Metabolic activation of dopamine o-quinones to o-semiquinones by NADPH cytochrome P450 reductase may play an important role in oxidative stress and apoptotic effects. *Biochim. Biophys. Acta* 1381:1-6.
- SEGURA-AGUILAR, J.; METODIEWA, D.; BAEZ, S.** 2001. The possible role of one-electron reduction of aminochrome in the neurodegenerative process of the dopaminergic system. *Neurotox. Res.* 3:157-165.
- SEGURA-AGUILAR, J.; DÍAZ-VELIZ, G.; MORA, S.; M HERRERA-MARSCHITZ, M.** 2002. Inhibition of DT-diaphorase is a requirement for Mn³⁺ to produce a 6-OH-dopamine like rotational behaviour. *Neurotoxicity Res.* 4:127-131.
- SULZER, D.; ZECCA, L.** 2000. Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review. *Neurotox. Res.* 1:181-195.
- TETRUD, J.; LANGSTON, J.W.** 1989. The effect of deprenyl (Selegiline) in the natural history of Parkinson's disease. *Science* 245:519-522.
- TORRES, G.E.; GAINETDINOV, R.R.; CARON, M.G.** 2003. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nature Rev. Neurosci.* 4:13-25.
- UNGERSTEDT, U.** 1968. 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 5:107-110.
- UNGERSTEDT, U.** 1971a. Stereotaxic mapping of the monoamine pathway in the rat brain. *Acta Physiol. Scand.* 367:1-48.

- UNGERSTEDT, U.** 1971b. On the anatomy, pharmacology and function of the nigro-striatal dopamine system. Karolinska Institute-Thesis. Stockholm.
- UNGERSTEDT, U.** 1971c. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand.* (Suppl 367):69-93.
- UNGERSTEDT, U.** 1971d. Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand.* 367:95-122.
- UNGERSTEDT, U.** 1971e. Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour. *Acta Physiol. Scand.* 367:49-68.
- UNGERSTEDT, U.** 1991. Microdialysis principles and applications for studies in animals and man. *J Intern Med.* 230:365-373.
- UNGERSTEDT, U.; ARBUTHNOTT, G.W.** 1970. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* 24:485-493.
- UNGERSTEDT, U.; HERRERA-MARSCHITZ, M.; JUNGNELIUS, U.; STÅHNLE, L.; TOSSMAN, U.; ZETTERSTRÖM, T.** 1982. Dopamine synaptic mechanisms reflected in studies combining behavioural recording and brain dialysis. *Adv. Biosci.* 37:219-231.
- WALKINSHAW, G.; WATERS, C.M.** 1995. Induction of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-dopa. Implications for the treatment of Parkinson's disease. *J. Clin. Invest.* 95:2458-2464.
- WALTHER, D.J.; BADER, M.** 2003. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem. Pharmacol.* 66:1673-80.
- YAHR, M.D.; DUVOISIN, R.C.; SCHEAR, M.J.; BARRETT, R.E.; HOEN, M.M.** 1969. Treatment of Parkinsonism with levodopa. *Arch. Neurol.* 21:343-354.
- YOU, Z-B.** 1996. Characterization of neuropeptide, monoamine, and amino acid release in the basal ganglia of the rat: neuronal dependence and reciprocal interactions. Thesis Doctoral. Stockholm, Sweden. Karolinska Institute. Departments of Clinical Neuroscience, and Physiology and Pharmacology. 67p.