

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**Efecto de fármacos antiparkinsonianos en niveles extracelulares  
de monoaminas y metabolitos medidos *in vivo* con microdiálisis en  
el neostriado de ratas con hemiparkinsonismo**

**Iván Felipe Sepúlveda Amestoy**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
MENCIÓN NEUROCIENCIAS**

**Director de Tesis: Prof. Mario Herrera-Marschitz, MD Sci PhD**

**2012**

## II-INDICE

<b>III-RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>IV-ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>V-ABREVIATURAS.....</b>	<b>7</b>
<b>VI-INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>VII-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>10</b>
Pregunta de investigación	
Justificación	
<b>VII-CONTENIDO.....</b>	<b>11</b>
1. Revisión Bibliográfica.....	<b>11</b>
2. Planteamiento.....	<b>18</b>
3. Plan de trabajo.....	<b>19</b>
4. Hipotesis de trabajo.....	<b>20</b>
4. Materiales y métodos.....	<b>21</b>
5. Objetivos.....	<b>29</b>
6. Resultados.....	<b>30</b>
7. Discusión.....	<b>43</b>
<b>IX-CONCLUSIONES.....</b>	<b>45</b>
<b>X-BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>47</b>
<b>XI-ANEXOS.....</b>	<b>52</b>
Figuras.....	<b>53-57</b>
Gráficos.....	<b>58-60</b>
Tablas.....	<b>61-77</b>

### III-RESUMEN

El presente estudio analiza los cambios en niveles de dopamina (DA) y sus metabolitos medidos de manera cuantitativa con cromatografía líquida de alta performance, *in vivo*, en neostriado lateral izquierdo y derecho del cerebro de rata con hemiparkinsonismo, en condiciones basales y en presencia del precursor de la dopamina, L-3,4-di-hidroxi-fenilalanina (L-DOPA), y/o inhibidores de su degradación enzimática (catecol-O-metiltransferasa, COMT y/o monoaminooxidasa, MAO).

Se utilizó 8 grupos, cada uno con 4 a 5 animales (n=72), individualizando cada grupo por el uso de el precursor de DA y/o el inhibidor de su degradación en las distintas combinaciones posibles, más un grupo control al cual solo se aplicó líquido cefalorraquídeo artificial. Cada animal fue intervenido con cirugía estereotáxica en 2 oportunidades:

(i) Para lesionar el haz medial cerebral izquierdo con 6- Hidroxi-Dopamina (6-OH-DA), a ratas de peso corporal de ~160g. (ii) Para implantar sondas de microdiálisis en cada hemisferio cerebral, aproximadamente un mes luego de la lesión con 6-OH-DA, pesando ~250g.

Los microdializados se analizaron inmediatamente para medir dopamina, serotonina (5-HT) y sus metabolitos correspondientes (3,4-ácido di-hidroxi-fenilacético [DOPAC], Ácido homovanílico [HVA], ácido-5-hidroxi-indol-acético[5HIAA]). En condiciones basales, se observó una disminución significativa de los niveles de DA y sus metabolitos (~50%), pero no de los niveles de 5-HT y 5HIAA, en el neostriado ipsilateral a la lesión con 6-OH-DA, en todos los grupos experimentales. L-DOPA aumentó >20 veces los niveles de dopamina extracelular con respecto al grupo control, tratado con salino. Por otra parte, el tratamiento con el inhibidor de MAO-B, L-deprenyl, los aumentó ~2 veces, y en el grupo tratado con inhibidor de la COMT, entacapone, aumentó ~1,5 veces. Luego del tratamiento con polidroga, triterapia (L-DOPA+entacapone+L-deprenyl), los niveles de DA aumentaron ~10 veces, en el hemisferio lesionado y no lesionado. En el grupo tratado con inhibidores del metabolismo (entacapone, L-deprenyl), los niveles de dopamina solo aumentaron en el hemisferio lesionado, ~ 2 veces. Cuando se combinó L-DOPA con el inhibidor de MAO-B, los niveles de DA aumentaron >20 veces en el hemisferio lesionado y >10 veces en el no lesionado. Cuando se combinó L-DOPA con el inhibidor de COMT, los niveles de extracelulares de DA aumentaron >20 y ~9 veces, en hemisferio lesionado y no lesionado, respectivamente. El efecto de L-DOPA fue más marcado en el hemisferio lesionado, lo que validaría el tratamiento

farmacológico de la enfermedad de Parkinson. El efecto de L-deprenyl sobre los niveles extracelulares de DA fue mayor que el observado con entacapone, al considerar dosis terapéuticas equivalentes.

En los grupos de administración con polidrogas se observó un efecto mayor al combinar L-DOPA + L-deprenyl + entacapone, tanto en hemisferio lesionado y no lesionado, lo que también respalda a L-DOPA como piedra angular del tratamiento en la enfermedad de Parkinson. No se observó diferencia significativas respecto a los grupos que solo fueron tratados con L-DOPA + L- deprenyl versus L-DOPA + entacapone. Sin embargo, hay que considerar que en este estudio se evaluó el efecto agudo de los distintos tratamientos. Por otra parte el estudio experimental se limitó al neostriado lateral del cerebro de rata, que si bien es el área anatómica principalmente afectada en los enfermos de Parkinson, no es la única región comprometida. Por último es importante destacar que este estudio experimental presenta un modelo de medición cuantitativa *in vivo* de los niveles de monoaminas y sus metabolitos directamente en el cerebro de rata.

#### IV-ABSTRACT

The present study investigated the effect of a unilateral 6-OH-DA lesion on extracellular dopamine (DA) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) levels monitored with in vivo microdialysis in left and right neostriatum of rat, and on treatments with DA precursor, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and drugs inhibiting its enzymatic metabolism (catechol-*O*-methyltransferase, COMT and/or monoamine oxidase, MAO).

Eight different groups of animals were used, each of 4 or 5 animals (n=72), to be treated with L-DOPA, the precursor of DA, or inhibitors of DA catabolism (IMAO/ICOMT), and their combinations. The effect of each treatment was compared to that of saline (artificial CSF). Each animal went twice through stereotaxic surgery: (i) For injecting 6-OH-DA (body weight, ~160g). (ii) For microdialysis implantation on each hemisphere, approximately 1 month after the lesion, (body weight, ~250g).

The microdialysates were assayed by high-performance liquid chromatography (HPLC), for measuring DA and serotonin (5-HT) and the corresponding metabolites; 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5HIAA).

We focus here on the main effects observed on extracellular DA levels. L-DOPA increased >20-fold DA levels compared with the corresponding saline treated controls. Furthermore, L-deprenyl, a MAO inhibitor, increased DA levels by ~2-fold, entacapone, a COMT inhibitor, increased DA levels by ~1.5-fold. The combination of L-DOPA+entacapone+L-deprenyl increased DA levels by ~10-fold, on the lesioned and non-lesioned hemisphere. Entacapone, and/or L-deprenyl only increased DA levels on the lesioned hemisphere (~ 2-fold). L-DOPA+L-deprenyl increased DA levels by >20-fold on the lesion hemisphere, and >10-fold on the non-lesioned hemisphere. When L-DOPA was combined with entacapone, DA levels were increased by >20- and ~9-fold on the lesioned and non-lesioned hemispheres, respectively. In all experiments the effect of L-DOPA was more remarkable on the lesioned hemisphere, validating the standard treatment of Parkinson's disease. The effect of L-deprenyl on DA levels was more prominent than that of entacapone, when equivalent doses were considered. The most prominent effect was obtained by the combination of the three drugs, on the lesioned as well as non-lesioned hemispheres, also supporting the pivotal role of L-DOPA. No significant differences were observed when

comparing the effect of L-DOPA+L-deprenyl versus L-DOPA + entacapone. However, it is necessary to point out that in the present experiments only the acute effects of the treatments were analysed. Furthermore, the study focused on the neostriatum, which is only one of the regions affected by the disease. Nevertheless, the present study quantified directly the effect of the drugs on monoamine levels in the relevant extracellular brain compartment *in vivo*.

**V-ABREVIATURAS**

APO	: Apomorfina
COMT	: Catecol-O-Metiltransferasa
COMTI	: Inhibidor Catecol-O-Metil-Transferasa
CSF	: Fluido cerebroespinal
DA	: Dopamina, 3-hidroxitiramina
DOPAC	: 3,4-ácido dihidroxifenilacético
EP	: Enfermedad de Parkinson
5-HIAA	: Ácido 5-hidroxi-indolacético
HPLC	: Cromatografía líquida de alta performance
HVA	: Ácido homovanílico
LCR	: Líquido Cefalorraquídeo
L-DOPA	: L-3,4-dihidroxifenilalanina/ Levodopa
MAO	: Monoamino oxidasa
MAOIs	: Inhibidor Monoamino Oxidasa
MPTP	: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
RIA	: Radioinmunoensayo
3-MT	: 3-metoxi-tiramina
5HT	: Serotonina

## VI-INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es uno de los desórdenes neurológicos más comunes en la actualidad, afectando cerca de un 0.2% de la población mundial (Olanow et al, 1994, Koller, 1998). De carácter idiosincrático, crónico y progresivo, la edad promedio del inicio de los síntomas es de 50 años aunque también existe una forma de Parkinson precoz, asociada a factores genéticos, que afecta de un 5% a 10% de los pacientes los cuales presentan la enfermedad antes de los 40 años (Hughes et al, 1992). La causa de la forma idiosincrática de la enfermedad sigue siendo un misterio, aunque las teorías multifactoriales son las más aceptadas (Ramsden et al, 2001).

La EP fue descrita originalmente en 1817 por James Parkinson, un médico británico que la llamó *paralysis agitans*. Durante mucho tiempo clínicos y científicos buscaron identificar las causas y tratamientos de la enfermedad, pero no fue hasta la década de los 60' que se identificó el defecto cerebral que es el distintivo de la enfermedad: pérdida de células cerebrales de la *substantia nigra* (Fig.1) que producen dopamina (DA) (Birkmayer, 1959-1961) (Hornykiewicz, 1962), neurotransmisor que, liberado en el cuerpo estriado, modula la actividad motora como parte del sistema extrapiramidal. Este descubrimiento junto con la identificación de la DA como un neurotransmisor pivotal de los ganglios basales (Carlsson A. et al, 1957; Dahlström and Fuxe 1964), llevó a los científicos a proponer el primer tratamiento eficaz de la EP (Cotzias GC et al, 1967), basado en la reposición del neurotransmisor deficitario.

Las alternativas terapéuticas de la EP, que emergen para suplir el déficit de DA se muestran en Tabla 1 (ver Stern et al, 1997; Hagan et al, 1997 ).



<b>Tabla 1</b>	
<b>Sustancias precursoras de la síntesis de DA</b>	Levodopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina; L-DOPA) logra atravesar la barrera hematoencefálica, descarboxilándose a DA en el SNC.
<b>Agonistas dopaminérgicos</b>	bromocriptina, pergolida, lisurida, pramipexole, etc. Usadas como tratamiento coadyuvante al uso de L-DOPA
<b>Drogas liberadoras de DA desde sus terminales en los núcleos caudado y putamen</b>	Amantadina, usada especialmente en fases iniciales
<b>Inhibidores de las enzimas MAO y COMT que catabolizan la DA</b>	selegilina o pargylina y tolcapone o entacapone, respectivamente. Actualmente utilizadas como primera línea en conjunto con L-DOPA
<b>Anticolinérgicos</b>	Como el trihexifenidilo, ocupados principalmente como coadyuvantes en el control de temblor y rigidez. Actualmente en desuso.
<b>Moduladores de los receptores de adenosina</b>	Compuestos cíclicos heteroaromáticos, utilizados como tratamiento de manifestaciones neuropsicológicas en la EP
<b>Neuroprotectores</b>	Antioxidantes, vitaminas, etc. Utilizados como complemento para disminuir la velocidad de progresión de la EP
<b>Neurocirugía funcional</b>	Subtalamotomía, utilizada en casos donde el tratamiento farmacológico ya no es efectivo o si la sintomatología motora es invalidante
<b>Terapia física</b>	Actividad física, ejercicios de coordinación, etc. Cada vez mas utilizados, por su bajo costo y buena efectividad.

## VII-PLANTEAMIENTO DE EL PROBLEMA

### PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- 1¿Cuáles son los niveles de monoaminas en el estriado lateral de ambos hemisferios cerebrales en el cerebro de rata con hemiparkinsonismo?
- 2 ¿Cual es el efecto de una lesión unilateral con 6-OH-DA en el haz ascendente que proyecta los axones monoaminérgicas al telencéfalo?
- 3¿Cómo se afectan estos niveles al utilizar L-DOPA, entacapone y L-deprenyl?
- 3¿Cuanto se elevan o disminuyen los niveles de monoaminas al utilizar estos fármacos en sus distintas combinaciones?
- 4¿Cuánto se elevan o disminuyen los metabolitos de las monoaminas en el estriado lateral de la rata?
- 5¿Es la microdiálisis guiada por estereotaxia un buen modelo experimental para el estudio de la EP?

### JUSTIFICACIÓN

La administración simultánea de un precursor de DA, L-DOPA, junto a un inhibidor de MAO-B, L-deprenyl (selegilina ) y/o un inhibidor de la COMT, entacapone, debería producir un aumento de la DA extracelular, traducándose en un efecto sinérgico. Sin embargo, hasta el momento los estudios que muestran el efecto combinado de fármacos precursores e inhibidores de las enzimas catalizadores de la DA son de carácter clínico que evalúan la eficacia terapéutica y algunos estudios experimentales que extrapolan los niveles de DA a través de medir sus metabolitos en plasma o líquido cefalorraquídeo (LCR). No hay estudios experimentales que correlacionen la eficacia terapéutica con una elevación en los niveles de DA en forma directa en el sistema nervioso central.

Por ello es que en este trabajo se estudió el efecto de las interacciones entre L-DOPA, L-deprenyl y entacapone sobre los niveles de DA, 5-HT y sus metabolitos ácidos medidos por microdiálisis y HPLC-ED en ratas con hemiparkinsonismo.

## VIII-CONTENIDO

### 1. Revisión Bibliográfica

#### 1.1 Biosíntesis y Metabolismo de dopamina

La DA es una catecolamina que posee un rol neurotransmisor, sintetizada a partir del precursor L-tirosina, cuya hidroxilación mediada por la enzima tirosina hidroxilasa, produce L-DOPA, la cual es descarboxilada por una enzima descarboxilasa de amino ácidos aromáticos, produciendo DA.

La DA metabolizada por las enzimas MAO y COMT, produce metabolitos deaminados y metilados, tales como el DOPAC, 3-MT, y el HVA, (Hornykiewicz, 2010) (Fig.2). La 5-HT es una indol-amina que comparte mecanismos de síntesis y eliminación con las catecolaminas, y posee una distribución neuro-anatómica y funcional que complementa a las de otras monoaminas.

#### 1.2. Fisiopatología de la EP

La EP es un desorden progresivo del sistema motor que posee cuatro síntomas cardinales clásicos y un quinto\* relevante a nivel clínico (Olanow et al, 2009). Ver tabla 2.

<b>Tabla 2</b>
<b>Síntomas cardinales clásicos EP</b>
Temblor de reposo, afectando las manos, los brazos, las piernas, la mandíbula y la cara.
Rigidez de las extremidades y el tronco
Bradicinesia o lentitud de movimiento
Inestabilidad postural/ inestabilidad de la marcha.
*Respuesta a L-DOPA. (Diagnóstico terapéutico)

A pesar de no existir una etiopatogenia totalmente esclarecida, se han formulado múltiples teorías sobre la EP que señalan diversos mecanismos en su génesis (Pankratz ND et al, 2009). Los más aceptados se indican en tabla 3.

<b>Tabla 3</b>
<b>Teorías sobre mecanismos de génesis EP</b>
Muerte por apoptosis y/o necrosis de células dopaminérgicas
Auto oxidación de la DA, y/o estrés oxidativo, especialmente en periodos de vulnerabilidad del sistema nervioso central (SNC), como: gestación, nacimiento, pubertad, senescencia.
Procesos inflamatorios secundarios o autoinmunes
Alteraciones mitocondriales

Todos estos mecanismos se refieren a una pérdida progresiva de células nerviosas en áreas específicas del cerebro (Semchuk et al, 1993). De esta manera, las neuronas dopaminérgicas con soma en el mesencéfalo (substantia nigra, área ventral tegmental) y que se proyectan al telencéfalo, degeneran, produciendo una de-afrentación de los núcleos caudado y putamen (neostriado en la rata), manifestándose en una disminución de DA a este nivel, generando una inhibición/desinhibición de las células nerviosas del neostriado, resultando en una alteración en el control del movimiento (Piccini et al, 1999).

### 1.3 Clínica de la EP

La EP tiene una presentación variable, según cada individuo. Sin embargo, antes de manifestar los signos cardinales de la enfermedad, se puede describir un conjunto de signos prodrómicos (Olanow et al, 2009), que comprenden diversas alteraciones autonómicas, y mentales, poco específicas, como sentirse deprimidos, advertir pérdida de memoria o sensación de malestar general. Posteriormente algunos pacientes describen sentirse algo temblorosos, rígidos, además de presentar dificultad en algunas funciones motoras. También se describe un tono bajo y plano al dialogar y su caligrafía aparece apretada e irregular. Este periodo inicial puede durar largo tiempo antes de que aparezcan los síntomas cardinales de la EP (Tom et al, 1998).

La variabilidad en la sintomatología es consecuencia de que la EP no afecta a todas las personas de la misma manera, presentando en algunos sujetos síntomas con diversos grados de

intensidad, sin embargo, en la mayoría de los casos, en su inicio, la presentación de los síntomas es unilateral (Tapia-Nuñez et al, 2004; Horak et al, 2005).

### **1.3.1 Síntomas motores**

*Temblor:* El temblor en la EP se caracteriza por ser un temblor de reposo con una frecuencia de 4-8 Hz, regular, rítmico que desaparece durante el sueño y disminuye con los movimientos voluntarios. Este temblor puede presentarse primero en una extremidad y posteriormente a medida que progresa la enfermedad se hace mas generalizado (Louis et al, 2001).

*Inestabilidad de la postura:* La inestabilidad en la postura junto con la coordinación son signos de fácil reconocimiento en un paciente con EP avanzada. La postura se caracteriza por una inclinación prono o supina, lo que otorga gran inestabilidad, por lo que se caen con facilidad. La inestabilidad de la postura puede estar asociada a una postura en la cual la cabeza está inclinada y los hombros se observan caídos.

*Rigidez:* La rigidez del Parkinson se caracteriza por un desbalance entre los músculos agonistas y antagonistas de una articulación, resultando en una dificultad en “rueda dentada” al intentar, clínicamente, movilizar una extremidad (Berardelli, 1983).

*Bradicinesia:* La bradicinesia es uno de los síntomas mas discapacitante de la EP, produciendo gran dificultad en las actividades de la vida diaria. Esta dificultad para iniciar y realizar movimientos es errante en un principio, presentando el paciente periodos sin dificultad de movimiento y en otras oportunidades gran dificultad en tareas cotidianas como peinarse o vestirse. En cuanto a la marcha, es de tipo festinante, y el paciente puede congelarse (freezing) en una posición (Hallett M and Khoshbin S , 1980; Berardelli et al, 2001).

*Cambios en la fonación:* La mitad aproximadamente de los pacientes de Parkinson pueden presentar voz demasiado baja o plana y en algunos casos pueden presentar taquiplalia (Martnez-Sánchez, 2010).

### **1.3.2 Síntomas sensoriales y sensitivos**

*Alteración del olfato:* Se puede presentar como disminución del olfato (anosmia) o percepción de mal olor (cacosmia) y sería uno de los primeros síntomas. Se estudian y desarrollan nuevas pruebas diagnosticas, enfocadas a estos síntomas (Baba et al, 2011).

Otros síntomas sensoriales son parestesias (Jankovic, 2008), disestesias (Clarke, 2005) y/o alodinia (Schestatsky, et al, 2007).

### **1.3.3 Síntomas autonómicos**

*Dificultad en deglución:* Los músculos utilizados para tragar pueden trabajar con menos eficacia en las etapas avanzadas de la enfermedad, acumulándose el bolo alimenticio y las secreciones salivales.

*Disfunción intestinal:* Estitíquez, debido a una disminución en la velocidad de las ondas peristálticas intestinales, por otro lado también se han observado tanto problemas de incontinencia urinaria, como de inicio en la micción (pujo vesical), (Stiefelhagen, 2010).

*Dermatopatías:* Se han descrito aumento de las secreciones de las glándulas sebáceas de la cara y el cuero cabelludo por disfunción del sistema nervios autonómico, en otros casos también se han descrito pacientes con hiperhidrosis (Fischer et al, 2001).

### **1.3.4 Síntomas psiquiátricos**

*Depresión:* Es común en estos pacientes, presentándose en forma concomitante con los síntomas motores. A pesar que muchas veces la depresión no es mayor, presentan buena respuesta al tratamiento habitual con antidepresivos, sin embargo la evaluación se hace más difícil a medida que el Parkinson progresa (Politis et al, 2010).

*Demencia:* Es mas común en las presentaciones tardías de la enfermedad y se caracteriza por perdida de memoria, dificultad de planificación, deficit atencional y bradipsiquia (Park et al, 2011).

*Psicosis:* Esta presente en cerca de un tercio de los pacientes con Parkinson, posiblemente secundario a tratamiento con drogas monoaminérgicas. Se presenta como sueños vividos, alucinaciones y delirios. En algunos casos se puede manifestar como psicosis confusional (Jellinger, 2011).

### **1.3.5 Alteración del sueño**

Se describen insomnios de conciliación e intermitente, junto con terrores nocturnos y pesadillas (Larsen JP, 2003).

### 1.4 Parkinsonismo

Existen otras patologías que producen parkinsonismo, que se diferencian de la EP en que en éstas se conoce o se sospecha la causa, o bien el desorden ocurre como efecto secundario a otro desorden neurológico primario (Mc de Rij et al, 1997).

En la tabla 4 se observa la clasificación de la sociedad internacional de desordenes del movimiento.

<b>Tabla 4</b>	
<b>Parkinsonismo idiopático</b>	Enfermedad de Parkinson
<b>Parkinsonismo Secundario</b>	Parkinsonismo post encefalítico, enfermedad de Jakob-Creutzfeldt, SIDA, tumores, hidrocefalia normotensiva, farmacológicos, otros (Guggenheim and Cohen, 1959; Betarbet et al, 2000).
<b>Parkinson-Plus</b>	Parálisis supranuclear progresiva, atrofia olivo-ponto-cerebelosa, degeneración nigro-estriatal, síndrome de Shy-Drager, Degeneración córtico-gangliobasal, enfermedad por cuerpos de Lewy.
<b>Parkinsonismos heredo-degenerativos</b>	Enfermedad de Alzheimer, demencia a cuerpos de Lewy, Corea de Huntington, Hallervorden-Spatz, Neuro-acantocitosis, degeneración espino-cerebelosa, atrofia progresiva del pálido, otros (Clark et al, 2006).

### 1.5 Tratamiento de la Enfermedad de Parkinson

El tratamiento de la enfermedad de Parkinson es sintomático, basado en los siguientes fármacos:

*Precursor de DA, L-DOPA:* La administración de DA, vía sistémica, no es útil, puesto que es una molécula con carga negativa que no es capaz de traspasar la barrera hemato-encefálica, a diferencia de la L-DOPA que si la atraviesa. La L-DOPA se comenzó a utilizar en los años 60, observándose un retraso y una regresión en los síntomas motores, principalmente la bradicinesia y la rigidez. La administración de L-DOPA como monoterapia produce una gran

cantidad de efectos colaterales, por su baja biodisponibilidad cerebral, ya que se convierte a dopamina en la periferia. Por lo tanto debe administrarse junto a inhibidores periféricos de la dopa-decarboxilasa. Es importante señalar que la L-DOPA no sustituye las células nerviosas, por lo que no detiene la progresión de la enfermedad (ver Clarke y Moore, 2005). Además, la eficacia de la L-Dopa disminuye aproximadamente a 5 años de iniciado el tratamiento, por lo que la exitosa eficacia inicial es también conocida como “luna de miel” del tratamiento (Muller, 2002). Como todo fármaco la L-DOPA posee efectos adversos producidos tras su administración, destacándose las discinesias (Caraceni et al, 1991), o movimientos involuntarios, como sacudidas motoras, o asentir con la cabeza, efectos que se observan comúnmente en pacientes en tratamiento con dosis elevadas de L-DOPA, o por tiempo prolongado, sugiriendo citotoxicidad. Se ha sugerido, sin embargo, que L-DOPA ejerce neuroprotección, en particular durante estadios tempranos de la EP, cuando la población de células dopaminérgicas es aun relativamente alta. (Fahn et al, 2004). Otros efectos descritos son náuseas, vómitos, hipotensión, todos producidos por la conversión periférica de la L-DOPA.

*Agonistas Dopaminérgicos* (apomorfina, lisurida, bromocriptina, rotigotina, pergolida, pramipexol, cabergolina): Estos análogos de la DA se administran preferentemente junto con L-DOPA (Rinne. 1987; Pezzoli et al, 1995) obteniendo una acción sinérgica en el control de los síntomas motores. El uso de un agonista dopaminérgico junto a L-DOPA permite bajar la dosis de este último fármaco y disminuir sus fluctuaciones. Además, se les ha adjudicado alguna acción neuroprotectora (Sharma et al, 2003; Radad et al, 2005).

*Inhibidores del Metabolismo de la DA:*

MAO, L-deprenyl (Mandel et al, 2005), también conocida como selegilina, inhibe la actividad de la enzima MAO (MAO-B), una de las encargadas de metabolizar la DA a nivel cerebral, retrasando la degradación de esta. Con esto, teóricamente, se logra una mayor concentración de DA cerebral (Bustamante et al, 2003). En estudios *in vivo* con animales, se ha demostrado que *L-deprenyl* protege las neuronas productoras de DA de los efectos tóxicos de MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), (Obuchowicz et al, 2003).



ICOMT: En este grupo encontramos; entacapone y tolcapone, ambos actúan a nivel periférico, sin embargo, tolcapone tiene mejor paso, a través, de la barrera hematoencefálica, lo que permite una fluctuación menor en los niveles de DA, disminuyendo los periodos de disipación de dosis o “wearing off”, caracterizados por aumento en síntomas motores, que pueden llegar en periodos avanzados a la inmovilidad de la persona (Leegwater-Kim J et al, 2007; Lees AJ. 2008).

*Otros tipo de fármacos:*

Fármacos anticolinérgicos, tales como la benzotropina (Lees, 2005) fueron el único tratamiento de la EP hasta la introducción de la L-DOPA. Su beneficio es limitado y están en desuso, pero pueden ayudar a controlar el temblor y la rigidez, aunque su principal beneficio se observa en la reducción del parkinsonismo farmacológico. Estos agentes son eficaces en unos pocos pacientes, y producen muchos efectos adversos como sequedad de boca, estitiquez, retención de orina, alucinaciones, pérdida de memoria, visión borrosa, cambios en la actividad mental y confusión (Brodsky. 2005).

*Antioxidantes:* Vit C, E, etc. (Zhang et al, 2002; Mandel et al, 2005). Se busca disminuir los efectos de stress metabólico, generación de especies pro-oxidantes y auto-oxidación.

*Otras alternativas terapéuticas:* El tratamiento quirúrgico fue muy utilizado en los años 70, en la actualidad esta restringido a casos con gran severidad en síntomas motores o a casos refractarios al tratamiento farmacológico, fundamentalmente para disminuir el tremor. Dentro de estos procedimientos encontramos actualmente la subtalamotomía, realizada vía estereotáxica, en la cual se produce una lesión por ablación, a través, de un electrodo posicionado a nivel de los axones de las neuronas que se proyectan desde el núcleo subtalámico. Esta alternativa es una opción preferencial en casos de EP avanzada y refractaria a tratamiento médico.

El ejercicio físico, ayudaría a los pacientes a mejorar su movilidad, disminuir la asimetría, mejorar el equilibrio y fortalecer ciertos músculos de forma que las personas puedan hablar y deglutir mejor (Pelissier y Perennou, 2000).

Injertos neurales, o trasplante de células nerviosas (Fillmore et al, 2005). Tienen un carácter experimental que ha dado algunas esperanzas en el tratamiento de esta enfermedad, sin embargo, aun no se han logrado resultados óptimos (Wu and Frucht, 2005).

Un desarrollo interesante son los estimuladores eléctricos posicionados vía estereotáxica en núcleos profundos del cerebro, con algunos resultados muy alentadores (Merello et al, 2008). También se ha investigado la inmuno-terapia, basada en el uso de anticuerpos contra la acumulación de proteínas que gatillan apoptosis en células dopaminérgicas (Eller and Williams, 2011). Por último, se investigan los aspectos farmacocinéticos de los antiparkinsonianos clásicos, mejorando su especificidad, viabilidad en el parénquima cerebral, steady-state y vida media ( $t_{1/2}$ ), desarrollado alternativas en la vía de administración tales como los parches cutáneos (rotigotina) (Hewitt et al, 2007) o L-DOPA en solución (duodopa) (Meppelink et al, 2011).

## 2. Plan de trabajo

Para suplir el déficit de DA en la EP se utilizan dos opciones: (i) reemplazarla con agonistas dopaminérgicos del tipo de la bromocriptina, pergolida, lisurida, pramipexol, etc, y/o (ii) aumentar la biodisponibilidad de la DA remanente en el neoestríado del cerebro de estos pacientes.

Esta segunda alternativa puede ser abordada con sustancias precursoras de la síntesis de DA, como la L-DOPA (Cotzias et al, 1969) que logra atravesar la barrera hematoencefálica, descarboxilándose y formando DA, y fármacos que impiden o retarda la degradación periférica y/o central de la DA. Entre estos pueden mencionarse carbidopa y benserazida, inhibidores de la dopadecarboxilasa periférica, inhibidores de la MAO, como selegilina o pargylina (Pålhagen et al, 2006), y los inhibidores de la COMT, como el tolcapone, entacapone, etc (Leegwater-Kim and Waters, 2007).

La administración simultánea de un precursor de DA (L-DOPA ) y un inhibidor de MAO-B (*L-deprenyl*) o un inhibidor de la COMT (entacapone) debería producir un aumento de la DA disponible en el cerebro, lo que se traduciría en un efecto sinérgico de estos fármacos respecto a los niveles de DA. Sin embargo, hasta el momento solo hay estudios que muestran el efecto separado, junto a fármacos precursores o inhibidores de las enzimas catalizadores de la DA, medidos a nivel sistémico (Castro et al, 2005). Estos estudios no muestran datos cuantitativos *in vivo* de los efectos cerebrales de estas substancias.

En este trabajo se estudió los efectos de L-DOPA y su asociación con *L-deprenyl* y/o entacapone sobre los niveles extracelulares de DA, 5-HT y sus metabolitos ácidos medidos por microdiálisis y HPLC-ED en ratas hemiparkinsonianas.

### **3. Hipótesis de trabajo**

Los fármacos antiparkinsonianos, sean precursores de DA o inhibidores de su degradación, actúan sinérgicamente para elevar los niveles de DA en el cerebro de rata.

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1 Animales y grupos experimentales

Se utilizó ratas (*Rattus norvegicus*) albinas de la cepa Wistar-UchA, sexo masculino, induciéndoles un hemiparkinson experimental por inyección estereotáxica de la toxina 6-OH-DA (Bustamante et al, 2003), procedimiento quirúrgico que antecede al menos un mes al ensayo farmacológico. Durante este período las ratas permanecieron en un vivero con comida y agua *ad libitum*, con ciclo de luz:oscuridad, 12:12 y temperatura regulada a 21° C. Se trasladaron al laboratorio de trabajo en la víspera del experimento.

Durante el ensayo farmacológico, las ratas fueron tratadas intracerebralmente con los fármacos en estudio, L-DOPA, *L-deprenyl* y entacapone, diluidos a una concentración  $10^{-4}$  M en LCR artificial y administrados a través de la sonda de microdiálisis que se implanta estereotáxicamente el día del ensayo farmacológico.

Los grupos experimentales, de 4-5 animales cada uno, se indican en Tabla 5.

<b>Tabla 5</b>	
(1)	Grupo control (medio de perfusión, LCR artificial)
(2)	Grupo L-DOPA (medio de perfusión+ $10^{-4}$ M L-DOPA)
(3)	Grupo <i>L-deprenyl</i> (medio de perfusión+ $10^{-4}$ M L-deprenyl)
(4)	Grupo entacapone (medio de perfusión+ $10^{-4}$ M entacapone)
(5)	Grupo L-DOPA+ <i>L-deprenyl</i> (medio de perfusión+ $10^{-4}$ L-DOPA+ $10^{-4}$ M L-deprenyl)
(6)	Grupo L-DOPA + entacapone (medio de perfusión+ $10^{-4}$ L-DOPA+ $10^{-4}$ M entacapone)
(7)	Grupo <i>L-deprenyl</i> +entacapone (medio de perfusión+ $10^{-4}$ L-deprenyl+ $10^{-4}$ M entacapone)
(8)	Grupo L-DOPA+ <i>L-deprenyl</i> +entacapone (medio de perfusión+ $10^{-4}$ L-DOPA+ $10^{-4}$ deprenyl+ $10^{-4}$ M entacapone)

## 4.2 Cirugía

### 4.2.1 Anestesia general

Previo a la cirugía para la implantación de la sonda de microdiálisis, las ratas fueron pre-tratadas con aproximadamente 0.7 ml i.p. de una solución de hidrato de cloral 7% para facilitar su manejo en el montaje de un equipo estereotáxico Knopf®. Posteriormente, se administró Isoflurano, vía una máscara nasal (1.5-2%) arrastrado con una corriente de aire de 1.5 L/min durante todo el procedimiento quirúrgico. Un termómetro rectal, una camilla con una resistencia eléctrica incorporada y un termostato, permitieron mantener la temperatura de la rata a 37°C. Fig 3.

### 4.2.2 Microdiálisis

La microdiálisis *in vivo* es una técnica que acoplada a un método de detección adecuado permite evaluar la composición química del espacio extracelular en un tejido determinado (Ungerstedt et al, 1982). También permite determinar *in situ* las variaciones en los niveles de las sustancias de interés a lo largo del procedimiento.

La sonda de microdiálisis ha sido diseñada como un capilar sanguíneo, por lo tanto, con ésta se pueden imitar procesos de permeabilidad y difusión que ocurren fisiológicamente. Cuando se hace fluir una solución salina a través de la sonda de microdiálisis se produce intercambio iónico a través de la membrana de diálisis por difusión simple. Así, si el flujo es lo suficientemente bajo para permitir los procesos de difusión y equilibrio, el perfusado contendrá moléculas en la misma concentración que el espacio extracelular. Para estos fines, las sondas de microdiálisis están hechas de dos tubos concéntricos construidos de acero inoxidable, tal que el líquido de perfusión entra a través del tubo interno, fluye a su extremo distal donde se encuentra la membrana de diálisis. El flujo retorna por el tubo externo. La menor longitud del tubo externo (1-5 mm), permite que su extremo distal sea reemplazado por una membrana de diálisis. Fig 5.

Es importante destacar que hay un intercambio de moléculas en ambas direcciones y solamente la diferencia de concentraciones a través de la membrana de diálisis dirigirá la dirección de los flujos. Así, es posible colectar un compuesto endógeno al mismo tiempo que una sustancia exógena, disuelta en el medio de perfusión, se introduce al tejido.

La cantidad de una sustancia colectada dependerá no solamente de la diferencia de concentraciones entre el perfusado y el fluido extracelular, sino que también de la velocidad de flujo del medio de perfusión, de la longitud o área de membrana en la sonda y las características del tejido investigado. También es necesario mencionar que de acuerdo a sus propiedades físico químicas cada sustancia tendrá un coeficiente de difusión a través de la membrana. Todos estos factores determinan la recuperación (*recovery*) de una sustancia.

A continuación se analizan cada uno de los factores que deben considerarse al diseñar un experimento de microdiálisis:

(i) *Propiedades de la membrana de diálisis*: La permeabilidad de la membrana determina el libre pasaje de moléculas de bajo peso molecular y excluye moléculas de alto peso molecular como péptidos y proteínas. Cada membrana tiene un “cut off” característico que representa el tamaño molecular límite de pasaje o exclusión.

(ii) *Longitud de la membrana*: Para estudios en el sistema nervioso central de la rata existen sondas de microdiálisis cuyas longitudes de membrana van desde 1 a 4 mm, siendo mayor la recuperación (*recovery*) en sondas con membranas más largas. Para otros modelos animales y para la clínica se pueden obtener sondas con una mayor longitud de membrana o superficie de diálisis.

(iii) *Velocidad de flujo de perfusión*: Los flujos altos permiten remover o introducir muchas moléculas por unidad de tiempo. Por el contrario, a flujos bajos se obtienen dializados más concentrados, ya que aumenta la recuperación de sustancias.

(iv) *Composición del fluido de perfusión*: Idealmente la composición debería ser lo más parecido posible a la composición del líquido extracelular. Sin embargo, se puede modificar a voluntad las concentraciones de sodio, potasio y calcio con fines específicos, como por ejemplo, producir despolarizaciones prolongadas de membranas biológicas.

(v) *Tipo de sonda*: Una sonda rígida es conveniente para su introducción estereotáxica en el cerebro, mientras que una sonda flexible es más conveniente para dializar tejido adiposo, muscular u órganos periféricos como hígado y riñón. Una sonda cerebral a utilizar en un animal en libre movimiento requiere pre-implantación de una cánula guía al menos un día antes, mientras que una sonda subcutánea puede implantarse incluso una hora antes de comenzar la colección de muestras.

(vi) *Tiempo necesario para obtener condiciones de estado estacionario*: La introducción de

una sonda de microdiálisis en un tejido determinado siempre constituirá una agresión fisiológica, por tanto la recuperación y estabilidad de la funcionalidad tisular (*base line*) tomará un tiempo que dependerá de la extensión del daño ocasionado por la implantación.

(vii) *Animales en vigilia o anestesiados*: Esta técnica permite trabajar con animales en libre movimiento, en condiciones que a menudo se califican de “normales”. Sin embargo, se debe tener en cuenta que un animal en estado de vigilia está sujeto a sentir dolor y estrés, y en movimiento, produciendo vibraciones que afectan el dializado y los resultados.

(viii) *Volumen de muestra requerido para el análisis*: El método de detección determinará los volúmenes de muestras a coleccionar. Si el método de detección es HPLC, se requerirá pequeños volúmenes con altas concentraciones, por el contrario, si el método de detección es *radioinmuno-assay* (RIA), se requerirán grandes volúmenes de muestra para compensar las bajas concentraciones de las sustancias a medir. En estos casos la variable a modificar será la velocidad de flujo de perfusión.

(ix) *Condiciones basales o controles*: Como ya se mencionó, para obtener condiciones de estado estacionario se requiere un tiempo determinado para cada tejido. Sólo una vez obtenido el estado de equilibrio o condición basal se puede iniciar el protocolo experimental que contemple el uso adicional de fármacos.

(x) *Instrumentación*: El equipamiento básico para desarrollar la técnica de microdiálisis contempla un equipamiento de microcirugía, sondas de microdiálisis, bombas de microperfusión, y otros instrumentos de precisión. Además, un sistema colector de muestras y un adecuado sistema de análisis como el HPLC.

(xi) *Recuperación (recovery)*: La capacidad dializante de una sonda de microdiálisis queda definida por el *recovery* para cada sustancia en particular. Se calcula comparando la concentración de sustancia en el flujo que sale de la sonda con la concentración en el medio donde se introdujo la sonda. Por ello se trata de una medida relativa que se expresa en porcentaje y que tiende al 100 % en la medida que el flujo se aproxima a cero; por el contrario, el *recovery* disminuye si el flujo aumenta.



El *recovery* depende de un conjunto de variables que se indican en Tabla 6.

<b>Tabla 6</b>	
•	Área de diálisis
•	Temperatura
•	Forma y peso molecular de las sustancias a dializar
•	Uniones inespecíficas a la membrana de diálisis y tuberías
•	Otros factores a tener en cuenta son el pH y la degradación de la sustancia
•	Tortuosidad y viscosidad del tejido investigado.

En resumen, la técnica de microdiálisis, no esta exenta de limitaciones siendo una de las más importantes el daño tisular producto de la implantación de las sondas en el cerebro. Estas sondas poseen un diámetro externo de 0.5-0.2 mm, se insertan en el cerebro para obtener una transferencia pasiva de sustancias que cruzan la membrana del tubo de diálisis gracias a un gradiente de perfusión entre el liquido extracelular y el fluido de perfusión. Con este método podemos estimar con gran exactitud la liberación de transmisores endógenos y sus metabolitos, por lo que ésta técnica nos aporta información acerca de la farmacodinamia y farmacocinética *in vivo*, así mismo permite estudiar cambios inducidos por drogas que se pueden administrar tanto por vía sistémica, como por el medio de diálisis.

Acoplada a una técnica de monitorización de un neurotransmisor y sus metabolitos en un animal vivo, la microdiálisis cerebral se ha utilizado ampliamente en el estudio de los fenómenos de liberación de neurotransmisores, puesto que presenta grandes ventajas, tales como la oportunidad de trabajar con animales vivos, analizar determinados núcleos cerebrales y correlacionar la actividad metabólica con estudio de comportamiento (Ungerstedt 1991, Herrera-Marschitz et al, 2010). Además, la microdiálisis cerebral presenta ventajas con respecto al análisis tradicional que cuantifica fundamentalmente contenidos de neurotransmisores, sin diferenciar entre niveles intracelulares y extracelulares. De esta forma, se puede analizar el proceso de liberación de estos, otorgando información respecto al fenómeno activo que implica la interacción sináptica.

También la microdiálisis sirve para administrar fármacos directamente al núcleo cerebral intervenido (Zetterström et al, 1983) lo cual ha permitido confirmar o demostrar mecanismos

de acción de drogas como la anfetamina y cocaína, y también los efectos de agentes que actúan a nivel de membrana, como es el caso de la perfusión cerebral con altas concentraciones de KCl.

#### **4.2.3 Protocolo de microdiálisis**

Luego de instalado en el equipo estereotáxico se expone el cráneo, retirando el periósteo, identificando Bregma como punto de referencia (Paxinos y Watson. 1997). Se implanta entonces una o mas sondas de microdiálisis en el hemisferio a investigar (e.g. cuando se implantó en el neostriado lateral de la rata, se usaron las siguientes coordinadas: Bregma: 0.2; L +/-3,2; D-V -6,0).

En el presente estudio se usó sondas de microdiálisis del tipo CMA-12 de 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 para perfundir LCR artificial (pH ~7), con un flujo ajustado a 2  $\mu$ L/min. La salida se conectó a un colector de fracciones automático CMA/140 programado para recolectar muestras de ambos hemisferios durante 30 min. Se tomó quince muestras de cada hemisferio, de los cuales las cuatro primeras correspondieron a los niveles basales, producto de la fase de estabilización dado por la perfusión con LCR artificial. Entre las muestras 5 a 10 se colectaron los perfusados correspondientes a los grupos previamente descritos. Antes de colectar las muestras números 11 y 14 se cambió el medio de perfusión por uno conteniendo D-anfetamina (100  $\mu$ M), o KCl (100 mM), respectivamente. Luego se retornó al medio LCR, para colectar las muestras post-estímulo. Todos los cambios de medio de perfusión se realizaron con selectores de jeringas CMA/111, para evitar el “*dead volumen*”. Finalmente, una vez recolectado el último tubo, cada rata se sacrificó con una sobredosis de Isoflurano, y se disecó su cerebro para comprobar la correcta posición de la sonda mediante el examen morfológico (Fig. 4).

#### 4.2.4 Protocolo de HPLC utilizado

DA, 5-HT y sus metabolitos; DOPAC, HVA y 5-HIAA se determinaron por HPLC acoplada a un detector electroquímico (HPLC-ED), siguiendo una metodología instalada en Chile por Prof. M. H-Marschitz (Herrera-Marschitz et al, 1996). Brevemente, una alícuota de 20  $\mu$ L del perfusado, se inyecta al HPLC mediante un autoinyector CMA/200 programado por un software *ad-hoc* desde un computador. Los diversos compuestos presentes en el perfusado son 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; generando una corriente que, luego de filtrada y amplificada, es enviada a un computador equipado con una tarjeta análogo digital y el software CSW® (Pronexus, Stockholm, Sweden) que permite la integración de los picos del cromatograma. Los resultados de las muestras de perfusado se interpolan con curvas de calibración realizadas con soluciones patrón de aquellas sustancias a cuantificar, por último se procesan los resultados con una planilla Excel® (Fig. 6).

### **4.3 Estadística**

Todos los datos fueron analizados con ANOVA one- or two-ways, seguidos de post-hoc tests de acuerdo con las características de las comparaciones (t-Student test o Schafer) (Stata-10.1 SE).

### **4.4 Resultados esperados**

La expectativa fue obtener mediciones cuantitativas del efecto sinérgico entre los fármacos inhibidores de la degradación de DA (L-deprenyl y entacapone) y el pro-fármaco L-DOPA, efecto que se expresa en los niveles de DA y metabolitos en el estriado lateral lesionado de la rata. Además se comparo los efectos de las intervenciones experimentales en neostriado lesionado y no lesionado.

## **5. Objetivos**

### **5.1 Objetivo General**

Evaluar la eficacia de la terapia farmacológica combinada en la EP para elevar los niveles extracelulares de monoaminas en neostriado lateral de ratas con hemi-parkinsonismo.

### **5.2 Objetivos específicos**

1. Determinar el efecto de L-DOPA en los niveles extracelulares de monaminas y metabolitos medidos en rata con hemiparkinsonismo.
2. Determinar el efecto de inhibidores de MAO y/o COMT en los niveles extracelulares de monaminas y metabolitos medidos en rata con hemiparkinsonismo.
3. Determinar las características de la interacción entre L-DOPA y MAO y/o COMT en los niveles extracelulares de monaminas y metabolitos medidos en rata con hemiparkinsonismo.

## **6.Resultados**

### **6.1.1 Lesión con administración estereotáxica de 6-OH-DA**

El procedimiento quirúrgico, destinado a inyectar 4  $\mu$ l de 6-OH-DA (2  $\mu$ g/ $\mu$ l) en el haz medial cerebral izquierdo, se llevó a cabo en 72 ratas adultas jóvenes cuyo peso en promedio fue de  $170 \pm 5$ , n=72. El tiempo utilizado para cada intervención quirúrgica fue aproximadamente 40 min.

La recuperación quirúrgica de las ratas fue evaluada en el mismo laboratorio de neurocirugía 60-90 min posteriores a la anestesia con isoflurano. Una vez recuperados, todos los animales intervenidos en una misma sesión (n=6-8, por día) fueron retornados a la estación local del bioterio. A las 24h y 48h, los animales fueron evaluados por su estado general, consolidación de incisión quirúrgica, ingesta de agua y alimento, explorando por cualquier señal que amerite eutanasia dirigida a prevenir cualquier sufrimiento del animal.

### **6.1.2 Ensayo Rotacional**

Los animales fueron tratados con apomorfina (Apo) en una dosis de 50  $\mu$ g/kg, s.c., 10-14 días post cirugía evaluando con un sistema automatizado la actividad rotacional (*rotational behaviour*).

El ensayo rotacional permite evaluar el grado de asimetría cerebral con respecto a los sistemas dopaminérgicos. Alta rotación inducida por Apo (50  $\mu$ g/kg, s.c.) (más de 10 giros/min) sugiere un alto grado de asimetría dopaminérgica. Baja rotación (menos de 10 giros/min), sugiere una baja asimetría. Ausencia de actividad rotacional sugiere ineficacia en la lesión (ver Tabla 7). En el presente trabajo se utilizaron animales con promedios de 10 giros/min.

**Tabla 7:** Conducta rotacional inducida por apomorfina (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , s.c.) en ratas lesionadas unilateralmente con 6-OH-DA (n= 72).

Parámetro de Evaluación	Animales (promedio $\pm$ SEM)	Intervalo de observación (min a partir de la inyección de Apo).
Rotación total x 3 h	331 $\pm$ 47	[0—180]
Máximo/min	10.3 $\pm$ 1.6	[0—15]
Giros en 1ra h	321 $\pm$ 47	[0—60]
Giros en 2ra h	7 $\pm$ 2	[60-120]
Giros en 3ra h	5 $\pm$ 2	[120-180]
Duración del episodio	$\approx$ 49 min	

### 6.1.3 Microdiálisis in vivo

Como se estableció en la sección Materiales y Métodos el procedimiento de microdiálisis se realizó simultáneamente en ambos hemisferios, en condiciones equivalentes (flujos, tamaño de sonda, recolección de muestras). Se determinó: (i) niveles basales (0-150 min, 5 muestras de 60  $\mu$ l); (ii) niveles producidos por las drogas en estudio (150-300 min, 6 muestras) (*L-deprenyl*, L-DOPA, o/y entacapone); (iii) niveles producidos por D-anfetamina intracerebral (300-390 min, 3 muestras), y (iv) niveles inducidos por despolarización de  $K^+$  con una solución 100 mM KCl (390-420 min, 2 muestras). El análisis de los resultados sigue el orden establecido del protocolo experimental, comparando, como dato pareado, los efectos observados en hemisferio lesionado y no lesionado.

### 6.2 Niveles basales

Tabla 8 muestra niveles (nM) de DA, 5-HT y sus metabolitos, DOPAC, HVA y 5-HIAA respectivamente, en los dializados de neostriado derecho (no lesionado) (A) e izquierdo (lesionado) (B) en condiciones basales, estimulada con D-anfetamina (100  $\mu$ M), y despolarización con KCl (100 mM). Las diferencias se señalan en C, marcando en porcentaje el efecto durante niveles basales, y estimulados. Se observó que la lesión disminuye los niveles de DA y sus metabolitos (DOPAC, HVA) (>50%;  $p < 0.05$ ) en el neostriado lesionado, sin cambios significativos en 5-HT, y su metabolito (5-HIAA), que solo disminuyen ~10% (ver gráficos).



<b>Tabla 8: Salino (LCR)</b>			
A: No-lesionado (derecho); n=5			
Substancia	Basal (nM)	D-Anfetamina	KCl
Dopamina	4.5±0.7	<b>101.2±4.96 [2240%]<sup>a</sup></b>	<b>87.6±32.4 [1940%]<sup>a</sup></b>
DOPAC	394±24	373±28 [95%]	312±34 [792%]
HVA	378±43	366±29 [97%]	235±15 [62%]
5-HT	0.9±0.3	<b>2.7±1.1 [300%]<sup>a</sup></b>	<b>1.6± 1.0 [178%]<sup>a</sup></b>
5-HIAA	55±14	47±9 [85%]	44±9 [81%]
B: Lesionado (izquierdo); n=6			
Dopamina	<b>0.8±0.2<sup>b</sup></b>	<b>18.4±3.2 [2300%]<sup>a,b</sup></b>	<b>14.1±3.1 [1760%]<sup>a,b</sup></b>
DOPAC	<b>103.4±15<sup>b</sup></b>	<b>106±11 [103%]<sup>b</sup></b>	<b>57±12 [55%]<sup>a,b</sup></b>
HVA	<b>87±12<sup>b</sup></b>	<b>102±9 [116%]<sup>b</sup></b>	<b>46±8 [53%]<sup>a,b</sup></b>
5-HT	0.8±0.1	<b>1.4±0.2 [175%]<sup>a</sup></b>	1.2±0.2 [150%]
5-HIAA	47±6	58±6 [123%]	40±5 [85%]

<sup>a</sup>P<0.05, comparado versus el correspondiente nivel basal; <sup>b</sup>P<0.05, comparado con el correspondiente valor observado en el hemisferio no lesionado (bold)

### **6.3 Efecto mono-droga**

El protocolo utilizado fue el mismo que el indicado en la sección 6.2, terminando el protocolo con perfusión con D-anfetamina y luego KCL. Sin embargo, en merito a la simplicidad, las Tablas terminan con el efecto de D-anfetamina.

#### **6.3.1. Efecto del tratamiento con L-DOPA**

Tabla 9 muestra el efecto de L-DOPA intracerebral (100  $\mu$ M) en niveles extracelulares de DA, 5-HT y sus metabolitos, DOPAC, HVA y 5-HIAA respectivamente, en neostriado derecho (no lesionado, A) y neostriado izquierdo (lesionado, B). En neostriado derecho (A), L-DOPA eleva los niveles de DA (~20 X) y sus metabolitos (~1.5 X), pero no los de 5-HT y 5-HIAA. La estimulación adicional con D-anfetamina solo eleva los niveles de DA (~1.5 X). En neostriado lesionado (B), L-DOPA eleva los niveles de DA (~20 X), y los de 5-HT (>3 X). Además, DOPAC se eleva >4 X. En el lado lesionado, luego de la carga con L-DOPA, D-anfetamina eleva los niveles de DA y 5-HT (>2 X), pero no los niveles de los metabolitos (ver gráficos).

<b>Tabla 9: L-DOPA</b>			
A: No-lesionado (derecho); n=6			
Substancia	Basal (nM)	L-DOPA	D-Anfetamina
Dopamina	3.72±1.47	<b>85.96±29.68 [2311%]<sup>a</sup></b>	<b>141.6±21 [165%]<sup>a</sup></b>
DOPAC	108.9±16.1	<b>157±29.4 [145%]<sup>a</sup></b>	<b>164±23.5 [104%]<sup>a</sup></b>
HVA	158±29.7	216±44.9 [137%]	<b>224±47.1 [104%]<sup>a</sup></b>
5-HT	2.16±0.46	1.75±0.74 [81%]	<b>5.5±2.69 [314%]<sup>a</sup></b>
5-HIAA	44.86±7.4	31.61±11.18 [71%]	32.09±10.33 [102%]
B: Lesionado (izquierdo); n=5			
Dopamina	<b>1.29±0.45<sup>b</sup></b>	<b>30.07±7.72 [2331%]<sup>a,b</sup></b>	<b>85.32±17.4 [284%]<sup>a,b</sup></b>
DOPAC	<b>24.92±8.3<sup>b</sup></b>	<b>112.98±4.41 [453%]<sup>a</sup></b>	123.1±5.25 [109%]
HVA	<b>50.22±18.4<sup>b</sup></b>	<b>93.42±13.68 [186%]<sup>a,b</sup></b>	100.8±17.55 [108%]
5-HT	2.42±1.47	<b>4.73±0.51 [326%]<sup>a,b</sup></b>	<b>10.45±2.13 [221%]<sup>a</sup></b>
5-HIAA	49.78±7.7	27.74±8.42 [56%]	27.57±7.93 [99%]

<sup>a</sup>P<0.05, comparado versus el correspondiente nivel basal; <sup>b</sup>P<0.05, comparado con el correspondiente valor observado en el hemisferio no lesionado (bold)

### 6.3.2 Efecto del tratamiento con L-deprenyl

Tabla 10 muestra el efecto de L-deprenyl intracerebral (100 µM) en niveles extracelulares de DA, 5-HT y sus metabolitos, DOPAC, HVA y 5-HIAA respectivamente, en neostriado derecho (no lesionado, A) y neostriado izquierdo (lesionado, B). En neostriado derecho (A), L-deprenyl sólo eleva los niveles de DA (~2X), pero no los de 5-HT y sus metabolitos. La estimulación con D-anfetamina eleva adicionalmente los niveles de DA (>7X), y los de 5-HT (~1.4X). Un efecto similar se observa en neostriado lesionado (B), aun cuando no se observa efecto en 5-HT (ver gráficos).

<b>Tabla 10: L-deprenyl</b>			
A: No-lesionado (derecho); n=7			
Substancia	Basal	L-deprenyl	D-Anfetamina
Dopamina	2.02±0.52	<b>4.61±1.95 [228%]<sup>a</sup></b>	<b>34.51±6.17 [749%]<sup>a</sup></b>
DOPAC	101.4±8.8	105±14.5 [99%]	104±17.1 [99%]
HVA	165±32.4	174±32.2 [105%]	168±35.7 [97%]
5-HT	5.39±1.45	7.09±1.89 [132%]	<b>10.2±2.63 [144%]<sup>a</sup></b>
5-HIAA	51.69±5.34	54.56±5.62 [106%]	56.34±6.1 [103%]
B: Lesionado (izquierdo); n=6			
Substancia	Basal		D-anfetamina
Dopamina	<b>1.43±0.37<sup>b</sup></b>	<b>3.51±2.34 [245%]<sup>a</sup></b>	<b>18.6±9.97 [530%]<sup>a,b</sup></b>
DOPAC	<b>65.05±25.7<sup>b</sup></b>	<b>39.54±19.52 [61%]<sup>b</sup></b>	<b>40.72±19.43 [103%]<sup>b</sup></b>
HVA	114.4±52.49	100.7±48.9 [88%]	<b>96.02±49.57 [95%]<sup>b</sup></b>
5-HT	6.23±3.43	6.23±4.31 [100%]	5.79±1.9 [93%]
5-HIAA	51.67±11.11	45.96±9.34 [89%]	47.25±9.34 [103%]

<sup>a</sup>P<0.05, comparado versus el correspondiente nivel basal; <sup>b</sup>P<0.05, comparado con el correspondiente valor observado en el hemisferio no lesionado (bold)

### 6.3.3 Efecto del tratamiento con entacapone

Tabla 11 muestra el efecto de entacapone intracerebral (100  $\mu$ M) en niveles extracelulares de DA, 5-HT y sus metabolitos, DOPAC, HVA y 5-HIAA respectivamente, en neostriado derecho (no lesionado, A) y neostriado izquierdo (lesionado, B). En neostriado derecho (A), entacapone solo eleva los niveles de DA (~1.5 X). Sin embargo, ambos DA y 5-HT se elevan (~2X) con la estimulación adicional con D-anfetamina. En neostriado lesionado (B) Entacapone eleva los niveles de DA y DOPAC (~2X). La estimulación adicional con D-anfetamina eleva DA y sus metabolitos (>3X), pero no los de 5-HT o 5-HIAA (ver gráficos).

<b>Tabla 11: entacapone</b>			
A: No-lesionado (derecho); n=7			
Substancia	Basal	entacapone	D-Anfetamina
Dopamina	5.83±0.5	<b>8.32±1.67 [143%]<sup>a</sup></b>	<b>15.64±2.94 [188%]<sup>a</sup></b>
DOPAC	61.5±20.04	53.5±21.3 [87%]	41.1±19.4 [77%]
HVA	111.1±30.4	89.5±34.2 [81%]	78.4±27.6 [88%]
5-HT	2.96±1	1.68±0.35 [57%]	<b>3.13±0.7 [186%]<sup>a</sup></b>
5-HIAA	31.93±3.15	31.63±9.05 [99%]	26.46±4.29 [84%]
B: Lesionado (izquierdo); n=6			
Substancia	Basal	entacapone	D-anfetamina
Dopamina	<b>2.77±2.41<sup>b</sup></b>	<b>5.52±3.71 [199%]<sup>a,b</sup></b>	<b>27.09±18.9 [491%]<sup>a</sup></b>
DOPAC	<b>2.32±1.11<sup>b</sup></b>	<b>5.28±1.73 [228%]<sup>a,b</sup></b>	<b>22.55±19.11 [427%]<sup>a,b</sup></b>
HVA	<b>6.7±2.13<sup>b</sup></b>	<b>7.32±2.62 [109%]<sup>b</sup></b>	<b>24.92±20.64 [340%]<sup>a,b</sup></b>
5-HT	5.2±2.04	9.92±3.01 [121%]	6.41±1.31 [65%]
5-HIAA	38.56±7.98	24.98±7.06 [65%]	20.34±6.12 [81%]

<sup>a</sup>P<0.05, comparado versus el correspondiente nivel basal; <sup>b</sup>P<0.05, comparado con el correspondiente valor observado en el hemisferio no lesionado (bold)

## 6.4 Efecto poli-droga

### 6.4.1 Efecto de L-DOPA+L-deprenyl

Tabla 12 muestra el efecto de L-DOPA+L-deprenyl (100  $\mu$ M) en niveles extracelulares de DA, 5-HT y sus metabolitos, DOPAC, HVA y 5-HIAA respectivamente, en neostriado derecho (no lesionado, A) y neostriado izquierdo (lesionado, B). En neostriado derecho (A), L-DOPA+L-deprenyl solo aumenta los niveles de DA >10X, como también la estimulación adicional con D-anfetamina. En neostriado lesionado (B) L-Dopa+L-deprenyl eleva los niveles de DA (~20), pero también los de DOPAC (~2X). Curiosamente, los niveles de 5-HT y 5-HIAA disminuyen comparados con los basales. El efecto de tratamiento adicional con D-anfetamina es discreto, eleva los niveles de 5-HT (~1.5 X) (ver gráficos).

<b>Tabla 12: L-DOPA+L-deprenyl</b>			
A: No-lesionado (derecho); n=3			
Substancia	Basal	L-Dopa+L-deprenyl	D-Anfetamina
Dopamina	7.32±1.48	<b>74.12±10.12 [1013%]<sup>a</sup></b>	<b>124.32±21.81 [168%]<sup>a</sup></b>
DOPAC	91.9±18.92	127±11.6 [138%]	145±27.8 [114%]
HVA	142±41.7	185±22.3 [130%]	173±52.7 [94%]
5-HT	11.8±5.7	9.9±4.89 [84%]	9.92±4.69 [100%]
5-HIAA	65.59±31.7	56.59±21.18 [86%]	54.4±23.4 [96%]
B: Lesionado (izquierdo); n=3			
Substancia	Basal	L-Dopa+L-deprenyl	D-anfetamina
Dopamina	3.91±2.15b	<b>75.64±18.4 [1934%]<sup>a</sup></b>	102.8±4.38 [137%]
DOPAC	50.49±25.6	<b>97.24±17.17 [193%]<sup>a</sup></b>	89.98±20.9 [93%]
HVA	101.9±17.28	104±46.5 [102%]	85.21±29.9 [82%]
5-HT	10.43±4.52	3.81±1.76 [37%]	6.48±1.23 [170%]
5-HIAA	68.97±20.68	33.58±13.28 [49%]	39.6±8.14 [118%]

<sup>a</sup>P<0.05, comparado versus el correspondiente nivel basal; <sup>b</sup>P<0.05, comparado con el correspondiente valor observado en el hemisferio no lesionado (bold)

#### **6.4.2 Efecto de L-DOPA+ entacapone**

Tabla 13 muestra el efecto de L-DOPA+ entacapone (100  $\mu$ M) en niveles extracelulares de DA, 5-HT y sus metabolitos, DOPAC, HVA y 5-HIAA respectivamente, en neostriado derecho (no lesionado, A) y neostriado izquierdo (lesionado, B). En neostriado derecho (A), L-DOPA+ entacapone solo eleva los niveles de DA (~9 X) y sus metabolitos (~1.5 X). Estimulación adicional con D-anfetamina solo eleva los niveles de 5-HT (~2 X). En neostriado lesionado (B) L-DOPA+ entacapone eleva los niveles de DA y DOPAC (~20X), y también los de 5-HT (~2X). En estas condiciones no se observa efecto adicional con D-anfetamina (ver gráficos).

<b>Tabla 13: L-DOPA + entacapone</b>			
A: No-lesionado (derecho); n=4			
Substancia	Basal	L-DOPA+entacapone	D-Anfetamina
Dopamina	8.89±1.02	<b>80.12±21.03 [901%]<sup>a</sup></b>	86.34±12.01 [108%]
DOPAC	95.6±15.8	121±1.7 [127%]	119±1.4 [98%]
HVA	126±26.8	135±26.3 [107%]	152±34.6 [113%]
5-HT	2.57±0.36	3.24±1.61 [126%]	<b>5.72±3.83 [177%]<sup>a</sup></b>
5-HIAA	37.63±8.12	34.97±6.23 [93%]	44.26±8.14 [127%]
B: Lesionado (izquierdo); n=4			
Substancia	Basal	L-DOPA+entacapone	D-anfetamina
Dopamina	<b>4.6±2.52<sup>b</sup></b>	<b>89.97±29.55 [1956%]<sup>a</sup></b>	78.62±13.36 [87%]
DOPAC	<b>4.17±2.01<sup>b</sup></b>	<b>124.22±10.24 [2979%]<sup>a</sup></b>	131.6±11.14 [106%]
HVA	<b>9.84±2.62<sup>b</sup></b>	65.69±8.29 [125%]	75.83±9.08 [115%]
5-HT	2.57±0.57	3.91±1.35 [152%]	4.96±1.81 [127%]
5-HIAA	45.99±10.68	29.57±7.13 [64%]	31.98±9.18 [108%]

<sup>a</sup>P<0.05, comparado versus el correspondiente nivel basal; <sup>b</sup>P<0.05, comparado con el correspondiente valor observado en el hemisferio no lesionado (bold)

### 6.4.3 Efecto de L-deprenyl+entacapone

Tabla 14 muestra el efecto de L-deprenyl+entacapone (100 µM) en niveles extracelulares de DA, 5-HT y sus metabolitos, DOPAC, HVA y 5-HIAA respectivamente, en neostriado derecho (no lesionado, A) y neostriado izquierdo (lesionado, B). En neostriado derecho (A), L-deprenyl+entacapone no tiene efecto alguno en los niveles de las monoaminas y sus metabolitos. Sin embargo, la estimulación adicional con D-anfetamina eleva los niveles de DA y 5-HT (~2 X), pero no los niveles de sus metabolitos. En neostriado lesionado (B) L-deprenyl+entacapone eleva los niveles de DA y 5-HT (~2X), pero no se observa efecto adicional con D-anfetamina. Ver gráficos.



<b>Tabla 14: L-deprenyl+entacapone</b>			
A: No-lesionado (derecho); n=3			
Substancia	Basal	L-deprenyl+entacapone	D-Anfetamina
Dopamina	13.96±1.02	16.73±3.68 [120%]	<b>26.49±4.18 [158%]<sup>a</sup></b>
DOPAC	65.3±23.5	39.3±9.3 [60%]	36.6±10.9 [93%]
HVA	80.83±26.7	60.1±19.3 [74%]	61.3±23.1 [102%]
5-HT	2.42±0.64	2.8±0.92 [116%]	<b>6.61±2.46 [236%]<sup>a</sup></b>
5-HIAA	23.18±6.78	27.62±7.18 [119%]	28.35±6.97 [96%]
B: Lesionado (izquierdo); n=3			
Substancia	Basal	L-deprenyl+entacapone	D-anfetamina
Dopamina	<b>4.98±4<sup>b</sup></b>	<b>9.54±4.79 [192%]<sup>a,b</sup></b>	<b>9.25±3.39 [96%]<sup>b</sup></b>
DOPAC	<b>13.49±8.8<sup>b</sup></b>	15.66±5.92 [116%]	11.82±6.57 [75%]
HVA	<b>29.92±10.89<sup>b</sup></b>	24±10.79 [80%]	24.25±13.83 [101%]
5-HT	2.38±0.87	3.72±2.59 [156%]	4.96±2.6 [133%]
5-HIAA	33.88±8.9	36.03±13.12 [106%]	33.92±16.39 [94%]

<sup>a</sup>P<0.05, comparado versus el correspondiente nivel basal; <sup>b</sup>P<0.05, comparado con el correspondiente valor observado en el hemisferio no lesionado (bold)

#### 6.4.4 Efecto de L-DOPA+L-deprenyl+entacapone

Tabla 15 muestra el efecto de L-DOPA+L-deprenyl+entacapone (100 µM) en niveles extracelulares de DA, 5-HT y sus metabolitos, DOPAC, HVA y 5-HIAA respectivamente, en neostriado derecho (no lesionado, A) y neostriado izquierdo (lesionado, B). En neostriado derecho (A), L-DOPA+L-deprenyl+entacapone solo eleva los niveles de DA (>8X). La estimulación adicional con D-anfetamina eleva los niveles de DA y 5-HT (~2X). En neostriado lesionado (B) L-Dopa+L-deprenyl+entacapone eleva potentemente los niveles de DA (>10X) y sus metabolitos DOPAC>8X; HVA>4X), y también los niveles de 5-HT (~2X). Estimulación adicional con D-Anfetamina solo eleva los niveles de 5-HT (~2 X). Ver gráficos.

<b>Tabla 15: L-DOPA+L-deprenyl+entacapone</b>			
A: No-lesionado (derecho); n=4			
Substancia	Basal	L-DOPA+L-deprenyl+entacapone	D-Anfetamina
Dopamina	9.05±2.89	76.56±9.42 [846%]a	<b>115.03±15.8 [150%]<sup>a</sup></b>
DOPAC	92.9±17.3	127±8.3 [137%]	136±8.4 [107%]
HVA	151±42.3	127±13.8 [84%]	133±16.2 [105%]
5-HT	2.38±0.53	1.72±0.4 [72%]	<b>2.96±0.45 [172%]<sup>a</sup></b>
5-HIAA	53.92±9.15	45.61±7.35 [85%]	51.72±12.17 [113%]
B: Lesionado (izquierdo); n=4			
Substancia	Basal	L-DOPA+L-deprenyl+entacapone	D-anfetamina
Dopamina	<b>5.68±0.38<sup>b</sup></b>	<b>76.85±19.85 [1353%]<sup>a</sup></b>	88.29±31.76 [115%]
DOPAC	<b>10.99±3.53<sup>b</sup></b>	<b>92.27±28.11 [840%]<sup>a,b</sup></b>	105.1±37.31 [114%]
HVA	<b>12.49±4.37<sup>b</sup></b>	<b>54.01±20.31 [432%]<sup>a,b</sup></b>	52.63±18 [97%]
5-HT	2.57±0.42	6.29±2.3 [245%]	10.11±4.74 [161%]
5-HIAA	51.6±14.81	36.49±8.27 [71%]	35.69±7.6 [98%]

<sup>a</sup>P<0.05, comparado versus el correspondiente nivel basal; <sup>b</sup>P<0.05, comparado con el correspondiente valor observado en el hemisferio no lesionado (bold)

## 7. Discusión

Los resultados con el ensayo rotacional demuestran un efecto parcial de la lesión inducida por 6-OH-DA, lo que se confirma con la microdiálisis. De esta forma los niveles de DA y sus metabolitos disminuyen, en condiciones basales en más de un 70%. 5-HT y su metabolito 5-HIAA solo disminuyen en aproximadamente 10%, sin alcanzar un nivel de significancia estadística. Es interesante destacar, sin embargo, que el efecto de D-anfetamina y KCl en los niveles de monaminas y sus metabolitos es equivalente en el neostriado parcialmente lesionado y el no lesionado.

El diseño experimental permitió evaluar el efecto mono- o poli-droga en neostriado parcialmente lesionado y su control correspondiente. Los resultados muestran efectos específicos de mono-drogas de acuerdo con su mecanismo de acción descrito (Grafico 1). El efecto del precursor dopaminérgico L-DOPA depende de su decarboxilación intracerebral, por neuronas dopaminérgicas o monoaminérgicas, dependiendo de la biodisponibilidad de la enzima dopa-decarboxilasa (*aromatic acid decarboxylase*), expresada no solo por las terminales dopaminérgicas disponibles, sino que también por terminales noradrenérgicas, serotoninérgicas e histaminérgicas.

L-DOPA elevó en forma equivalente los niveles de DA, en neostriado no lesionado (>20x), y lesionado (>20x), aunque su efecto se manifiesta particularmente en los metabolitos DOPAC y HVA, que solo se elevan en neostriado lesionado (>4x y >1.8x, respectivamente). 5-HT solo se elevó en el neostriado lesionado, sugiriendo una decarboxilación acentuada que determina la formación de dopamina, pero también 5-HT. Comparado con lo observado en Tabla 8, el efecto de D-anfetamina es discreto, posiblemente por que el sistema de síntesis esta saturado por el tratamiento con L-DOPA.

L-deprenyl solo elevó los niveles de DA, en forma equivalente en neostriado no-lesionado y lesionado. Interesantemente, L-deprenyl no afectó los niveles de 5-HT, coherente con una inhibición selectiva de la iso-enzima MAO<sub>B</sub>, para la cual la 5-HT no es sustrato. Comparado con lo observado con el tratamiento con L-DOPA, D-anfetamina ejerce un efecto aditivo en la liberación de DA, en neostriado no lesionado y lesionado (c.f. Tabla 10 versus 9). Entacapone elevó los niveles de DA en neostriado no-lesionado y lesionado, sin afectar los niveles de 5-HT, de acuerdo con un efecto selectivo de la enzima COMT en la metilación de catecoles. Interesantemente, entacapone ejerció un efecto prominente en los niveles de

DOPAC evaluados en neostriado lesionado, sin afectar los niveles de HVA, que es un metabolito producto de la 3-metoxitiramina, generado por la COMT. DOPAC es un producto intracelular de la deaminación de monoaminas, previo a un efecto COMT que se considera extracelular. No tenemos explicación para este resultado. Sin embargo, el efecto de entacapone se manifestó en el neostriado lesionado luego del tratamiento con D-anfetamina, condición en la cual DOPAC y HVA aumentan  $>3x$ .

El tratamiento poli-droga imita condiciones clínicas. La combinación L-DOPA+L-*deprenyl* se manifiesta particularmente en el neostriado lesionado ( grafico 3), en el que se elevan los niveles de DA y DOPAC, este ultimo dependiente de deaminación. En esta serie de experimentos los niveles asumidos para 5-HT sobrepasan las expectativas sugeridas por investigaciones inmunocitoquímicas, posiblemente reflejando un inapropiado HPLC.

El efecto de la combinación L-DOPA y entacapone es notable, especialmente en el neostriado lesionado en el que los niveles de DA y DOPAC se elevan  $\sim 20x$  (c.f. DA  $\sim 20x$  versus  $\sim 9x$ , en lado lesionado versus no lesionado, respectivamente; DOPAC  $\sim 30x$  versus  $1.3x$ , respectivamente). No se observa un efecto aditivo con D-anfetamina. El efecto de la combinación L-*deprenyl*+entacapone es menor, sugiriendo la necesidad de la presencia del precursor endógeno para un efecto aditivo, lo que se demuestra luego de la combinación de L-DOPA+L-*deprenyl*+entacapone, cuya acción se manifiesta particularmente en el estriado lesionado, sobre niveles de DA, 5-HT y sus metabolitos, con la excepción de 5-HIAA. Estos resultados sugieren una inhibición no selectiva de la MAO (grafico 3).

## XIX. CONCLUSIONES

Resumen esquemático de los efectos de las drogas individuales o en combinación sobre los niveles extracelulares de DA y 5HT, en neostriado no lesionado (derecho)

Tabla 14

	DA	5HT
L-DOPA	↑↑↑↑↑	⊙
L-deprenyl	↑	⊙
entacapone	⊙	⊙
L-DOPA+ L-deprenyl	↑↑↑↑	⊙
L-DOPA+entacapone	↑↑↑↑	⊙
L-deprenyl+entacapone	⊙	⊙
L-DOPA+ L-deprenyl+entacapone	↑↑↑	⊙

Resumen esquemático de los efectos de las drogas individuales o en combinación sobre los niveles extracelulares de DA y 5HT, en neostriado lesionado (izquierdo)

Tabla 15

	DA	5HT
L-DOPA	↑↑↑↑↑	↑
L-deprenyl	↑	⊙
entacapone	↑	⊙
L-DOPA+ L-deprenyl	↑↑↑↑↑	⊙
L-DOPA+entacapone	↑↑↑↑↑	⊙
L-deprenyl+entacapone	↑	⊙
L-DOPA+ L-deprenyl+entacapone	↑↑↑↑	↑

### Leyenda

⊙	=aumento menor a 2 veces
↑	= aumento 2 veces aprox.
↑↑	= aumento 5 veces aprox.
↑↑↑	= aumento 10 veces aprox.
↑↑↑↑	= aumento 20 veces aprox.
↑↑↑↑↑	= aumento 50 veces aprox.

Los resultados muestran claramente que el mayor efecto sobre los niveles extracelulares de DA se logra utilizando su precursor L-DOPA, demostrando que la principal alteración esta dada por la disminución en el número de células dopaminérgicas, resultando en una disminución en los niveles de DA y sus metabolitos, pero no en 5-HT y 5-HIAA.

Los inhibidores de MAO y COMT aumentan los niveles de DA en forma discreta en la condición de mono-droga, sin embargo, ejercen un efecto aditivo y exponencial al administrarlos en asociación con L-DOPA.

El mayor aumento en los niveles extracelulares de DA se observa cuando se combina el precursor de DA con los inhibidores de MAO y COMT (grafico 1,3). Este efecto se logra principalmente en el hemisferio lesionado. Por lo tanto el uso de poli-drogas es una buena alternativa para aumentar la biodisponibilidad de DA en el hemisferio lesionado, restituyendo de manera fisiológica los niveles y metabolismo de la DA.

Por otro lado los efectos evaluados en esta tesis son agudos, inducidos por la administración intracerebral de los medicamentos. Esto le otorga selectividad a los resultados. Sin embargo, resulta arriesgado llegar a conclusiones definitivas comparadas con los efectos de drogas administradas en forma sistémica, como es el uso de estos medicamentos en el escenario clínico. Estos resultados nos obligan a seguir investigando respecto a la influencia de las terapias a largo plazo y en el tiempo, que es lo que se observa a nivel clínico.

## X BIBLIOGRAFÍA

1. Baba T, Takeda A, Kikuchi A, Nishio Y, Hosokai Y, Hirayama K, Hasegawa T, Sugeno N, Suzuki K, Mori E, Takahashi S, Fukuda H, Itoyama Y. Association of olfactory dysfunction and brain. *Metabolism in Parkinson's disease. Mov Disord.* 26(4):621-628, 2011.
2. Berardelli A, Rothwell JC, Thompson PD, Hallett M. Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. *Brain* 124(Pt 11):2131-46, 2001.
3. Berardelli A, Sabra AF, Hallett M., Physiological mechanisms of rigidity in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 46(1):45-53, 1983.
4. Betarbet R. Sherer TB, Mac Kennie G., Chronic systemic pesticide exposure reproduce features of Parkinson´s disease. *Nat Neuroscience.* 3: 1301-1306, 2000.
5. Birkmayer W, Hornykiewicz O. The L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) effect in Parkinson's syndrome in man: On the pathogenesis and treatment of Parkinson akinesia. *Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr.* 203:560-567, 1962
6. Birkmayer W, Hornykiewicz O., The effect of 1-3,4-dihydroxyphenylalanine (= DOPA) on akinesia in parkinsonism.1961. *Wien Klin Wochenschr.* 113(22):851-4, 2001.
7. Brodsky MC. Chronic anticholinergic administration and Alzheimer disease.*Surv Ophthalmol.* 50(3):290-291.2005
8. Bustamante D, Bustamante L, Segura-Aguilar J, Goiny M, Herrera Marschitz M. Effects of the DT-diaphorase Inhibitor Dicumarol on Striatal Monoamine levels in L-Dopa and L-Deprenyl Pretrated Rats. *Neurotox Res.* 5(8):585-594, 2003
9. Caraceni T, Scigliano G, Musicco M. The occurrence of motor fluctuations in parkinsonian patients treated long term with levodopa: role of early treatment and disease progression. *Neurology.* 41:380-384, 1991.
10. Carlsson A, Hillarp NA, Hokfelt B. The concomitant release of adenosine triphosphate and catechol amines from the adrenal medulla. *J Biol Chem.* 227(1):243-252, 1957.
11. Castro. A., Valldeoriola. F., Rodriguez Oroz M., Granadas. F., Marin. C.,Macias. R., Tolosa.E., Stochi. F., Hernandez. B., Gurutz . C., Rodriguez. M., Obeso. J. A., Vaamonde. J., Jenner. P., Alvarez. L., Pavon. N., Luquin. M., Gimenez-Roldan. S. Optimizacion del uso de la levodopa en la enfermedad de Parkinson. Papel de la combinacion levodopa, carbidopa-entacapona. *Neurologia.* 20(4): 180-188.2005
12. Clarke C, Moore AP. Parkinson's disease. *Clin Evid.* 13:1658-1677, 2005.
13. Clark LN, Afridi S, Karlins E, Wang Y, Mejia-Santana H, Harris J, Louis ED, Cote LJ, Andrews H, Fahn S, Waters C, Ford B, Frucht S, Ottman R, Marder K. Case-Control Study of the Parkin Gene in Early-Onset Parkinson Disease. *Arch Neurol.* 63(4):548-552, 2006.
14. Cotzias GC, Van Woert MH, Schiffer LM. Aromatic amino acids and modification of parkinsonism .*N Engl J Med.* 276(7):374-379, 1967.

15. Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R. Modification of Parkinsonism--chronic treatment with L-dopa. *N Engl J Med.* 280(7):337-345, 1969.
16. Dahlstrom A, Fuxe K. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia.* 20(7):398-399, 1964.
17. Eller M, Williams DR.  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson disease and other neurodegenerative disorders. *Clin Chem Lab Med.* 49(3):403-408, 2011.
18. Fahn, S., et al., Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 351(24): p. 2498-508, 2004.
19. Fillmore HL, Holloway KL, Gillies GT. Cell replacement efforts to repair neuronal injury: a potential paradigm for the treatment of Parkinson's disease. *NeuroRehabilitation.* 20(3):233-242, 2005.
20. Fischer M, Gemende I, Marsch WC, Fischer PA. Skin function and skin disorders in Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 108(2):205-213, 2001.
21. Jellinger KA. Cerebral correlates of psychotic syndromes in neurodegenerative diseases. *J Cell Mol Med.* ahead of print, 2011.
22. Guggenheim P, Cohen L. Theoretical considerations in parkinsonism induced by tranquilizing drugs. *Dis Nerv Syst.* 20:346-352, 1959.
23. Hagan JJ, Middlemiss DN, Sharpe PC, Poste GH. Parkinson's disease: prospects for improved drug therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 18(5):156-163, 1997.
24. Hallett M, Khoshbin S. A physiological mechanism of bradykinesia. *Brain.* 103(2):301-314, 1980.
25. Herrera-Marschitz M, Morales P, Leyton L, Bustamante D, Klawitter V, Espina-Marchant P, Allende C, Lisboa F, Cunich G, Jara-Cavieres A, Neira T, Gutierrez-Hernandez MA, Gonzalez-Lira V, Simola N, Schmitt A, Morelli M, Andrew, Tasker R, Gebicke-Haerter PJ. Perinatal asphyxia: current status and approaches towards neuroprotective strategies, with focus on sentinel proteins. *Neurotox Res.* 19(4):603-627, 2011.
26. Herrera-Marschitz M., You Z.B., Gojny 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. 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, 1996.
27. Horak FB, Dimitrova D, Nutt JG. Direction-specific postural instability in subjects with Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 193(2):504-21, 2005.
28. Hornykiewicz O. A brief history of levodopa. *J Neurol.* 257(Suppl 2):S249-252, 2010.
29. Hornykiewicz O. Dopamine (3-hydroxytyramine) in the central nervous system and its relation to the Parkinson syndrome in man. *Dtsch Med Wochenschr.* 87:1807-1810, 1962.
30. Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 55:181-184, 1992.



31. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 79(4):368-376, 2008.
32. Koller WC. Neuroprotection for Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 44 (Suppl 1):(S155-S159), 1998.
33. Larsen JP. Sleep disorders in Parkinson's disease. *Adv Neurol*. 91:329-334, 2003.
34. Leegwater-Kim J, Waters C. Role of tolcapone in the treatment of Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother*. 7(12):1649-57, 2007.
35. Lees AJ. Evidence-based efficacy comparison of tolcapone and entacapone as adjunctive therapy in Parkinson's disease. *CNS Neurosci Ther*. Spring;14(1):83-93, 2008.
36. Lees AJ. Alternatives to levodopa in the initial treatment of early Parkinson's disease. *Drugs Aging*. 22(9):731-740, 2005.
37. LeWitt PA, Lyons KE, Pahwa R; SP 650 Study Group. Advanced Parkinson disease treated with rotigotine transdermal system: PREFER Study. *Neurology*. 17;68(16):1262-1267, 2007.
38. Louis ED, Levy G, Cote LJ, Mejia H, Fahn S, Marder K. Clinical correlates of action tremor in Parkinson disease. *Arch Neurol*. 58:1630-1634, 2001.
39. Mandel S, Weinreb O, Amit T, Youdim MB. Mechanism of neuroprotective action of the anti-Parkinson drug rasagiline and its derivatives. *Brain Res Brain Res Rev*. 48(2):379-387, 2005.
40. Martinez-Sánchez F. Speech and voice disorders in Parkinson's disease. *Rev Neurol*. 1;51(9):542-550, 2010.
41. Mc de Rij K, Tzourio C, et col. Prevalence of Parkinsonism and Parkinson disease in Europe. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry*. 62:10-15, 1997.
42. Meppelink AM, Nyman R, van Laar T, Drent M, Prins T, Leenders KL. Transcutaneous port for continuous duodenal levodopa/carbidopa administration in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 1;26(2):331-334, 2011
43. Merello M, Tenca E, Pérez Lloret S, Martín ME, Bruno V, Cavanagh S, Antico J, Cerquetti D, Leiguarda R. Prospective randomized 1-year follow-up comparison of bilateral subthalamotomy versus bilateral subthalamic stimulation and the combination of both in Parkinson's disease patients: a pilot study. *Br J Neurosurg*. 22(3):415-422, 2008.
44. Muller T. Dopaminergic substitution in Parkinson's disease. *Expert Opin Pharmacother*. 3(10):1393-1403, 2002.
45. Obuchowicz E, Antkiewicz-Michaluk L, Romanska I, Herman ZS. Increased striatal neuropeptide Y immunoreactivity and its modulation by deprenyl, clonidine and L-dopa in MPTP-treated mice. *J Neural Transm*. 110 (12):1375-1391, 2003.
46. Olanow CW, Fahn S, Muentner M, et al. A multicenter double-blind placebo-controlled trial of pergolide as an adjunct to Sinemet® in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 89:40-47, 1994.
47. Olanow CW, Stern MB, Sethi K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). *Neurology*. 26;72(21 Suppl 4):S1-136, 2009.

48. Pålhagen S, Heinonen E, Hägglund J, Kaugesaar T, Mäki-Ikola O, Palm R; Swedish Parkinson Study Group. Selegiline slows the progression of the symptoms of Parkinson disease. *Neurology*. 66(8):1200-1206, 2006.
49. Pankratz ND, Wojcieszek J, Foroud T. Parkinson Disease Overview. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2004. updated, 2009.
50. Park KW, Kim HS, Cheon SM, Cha JK, Kim SH, Kim JW. Dementia with Lewy Bodies versus Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease Dementia: A Comparison of Cognitive Profiles. *J Clin Neurol*. 7(1):19-24, 2011.
51. Paxinos, G.; Watson, Ch. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Third Edition, Academic Press, San Diego. 1997
52. Pelissier J, Perennou D. Exercices program and rehabilitation of motor disorders in Parkinson's disease. *Rev Neurol*. 156 (Suppl 2): S190-S200, 2000.
53. Pezzoli G, Canesi M, Presenti A, et al. Pergolide mesylate in Parkinson's disease treatment. *J Neural Transm*. 45 (suppl 3): S203-S212, 1995.
54. Piccini P, Burn DJ, Ceravolo R. The role of inheritance in sporadic Parkinson's disease: evidence from a longitudinal study of dopaminergic function in twins: *Ann Neurol*. 45:577-582, 1999.
55. Politis M, Wu K, Loane C, Turkheimer FE, Molloy S, Brooks DJ, Piccini P. Depressive symptoms in PD correlate with higher 5-HTT binding in raphe and limbic structures. *Neurology*. 75(21):1920-1927, 2010.
56. Radad K, Gille G, Rausch WD. Short review on dopamine agonists: insight into clinical and research Studies relevant to Parkinson's disease. *Pharmacol Rep*. 57(6):701-12, 2005.
57. Ramsden DB, Parsons R.B., Ho SL. The etiology of idiopathic Parkinson's disease. *Mol. Pathol*. 54(6):369-380, 2001.
58. Rinne UK: Early combination of bromocriptine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease: a 5-year follow-up. *Neurology*. 37:826-828, 1987.
59. Sharma J, MacMahon D, Stewart D. Dopamine agonists for Parkinson's disease. *Lancet*. 361(9351):84, 2003.
60. Schestatsky P, Kumru H, Valls-Solé J, Valldeoriola F, Martí MJ, Tolosa E, Chaves ML. Neurophysiologic study of central pain in patients with Parkinson disease. *Neurology*. 69(23):2162-2169, 2007.
61. Semchuk K, Love E, Lee R. Parkinson's disease: A test for the multifactorial etiologic hypothesis. *Neurology*. 43:1173-1180, 1993.
62. Stern MB. Contemporary approaches to the pharmacotherapeutic management of Parkinson's disease: an overview. *Neurology*. 49(Suppl 1):S2-S9, 1997.
63. Stiefelhagen P. Dysphagia, constipation, impacted feces: Parkinson disease is also a gastrointestinal disease. *MMW Fortschr Med*. 152(17):13, 2010.
64. Tapia-Nuñez J, Chaná-Cuevas P. Diagnosis of Parkinson's disease. *Rev Neurol*. 1-15; 38 (1): 61-67, review, 2004.

65. Tom T; Cummings JL, Depression in Parkinson's disease. Pharmacological characteristics and treatment. Department of Neurology, UCLA School of Medicine, USA. *Drugs Aging*. 12:55-74, 1998.
66. Ungerstedt U. Microdialysis--principles and applications for studies in animals and man. *J Intern Med*. 230(4):365-73, 1991.
67. Ungerstedt U, Herrera-Marschitz M, Zetterström T. Dopamine neurotransmission and brain function. *Prog Brain Res*. 55:41-49, 1982.
68. Wu SS, Frucht SJ. Treatment of Parkinson's disease : what's on the horizon? *CNS Drugs*. 19(9):723-743, 2005.
69. Zetterström T, Sharp T, Marsden CA, Ungerstedt U. In vivo measurement of dopamine and its metabolites by intracerebral dialysis: changes after d-amphetamine. *J Neurochem*. 41(6):1769-1773, 1983.
70. Zhang SM, Hernan MA, Chen H, Spiegelman D, Willett WC, Ascherio A. Intakes of vitamins E and C, carotenoids, vitamin supplements, and PD risk. *Neurology*. 59(8):1161-1169, 2002.
71. [Sin autores citados. Revision] Anticholinergic therapies in the treatment of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 17 (Suppl 4):S7-S12, 2002.

## XI-ANEXOS

### 1. Figuras

Figura 1: Corte transversal de substancia nigra normal versus *substantia nigra* en EP, donde se observa una severa reducción de las células dopaminérgicas pigmentadas.

(<http://alexanderthomson.files.wordpress.com/2011/03/corpus-nigra.jpg>)

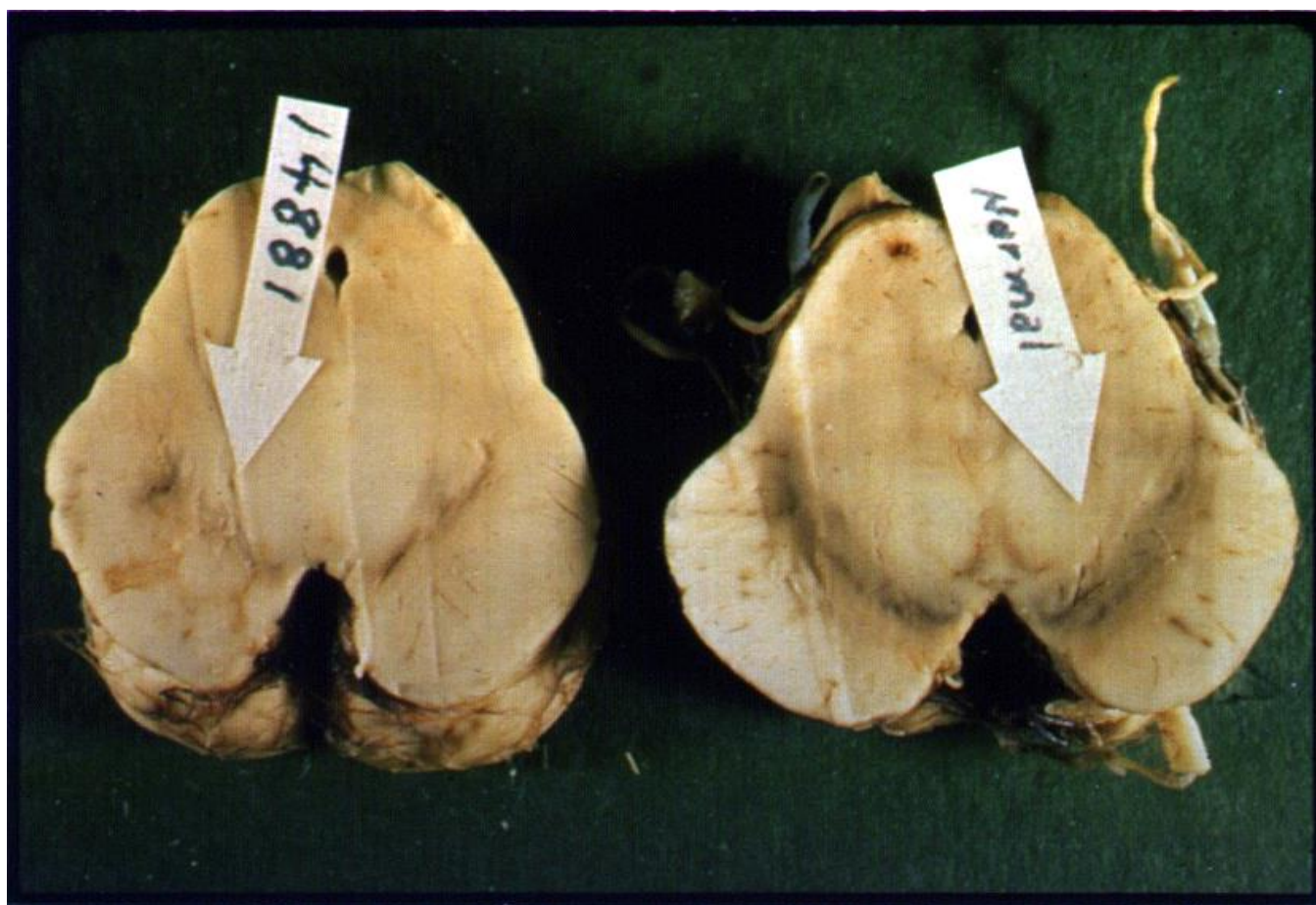


Figura 2. Metabolismo de la dopamina y acción de los fármacos inhibidores.

([http://ww2.ttmed.com/mov\\_anormales/artic/179\\_art\\_02\\_03\\_02.gif](http://ww2.ttmed.com/mov_anormales/artic/179_art_02_03_02.gif))

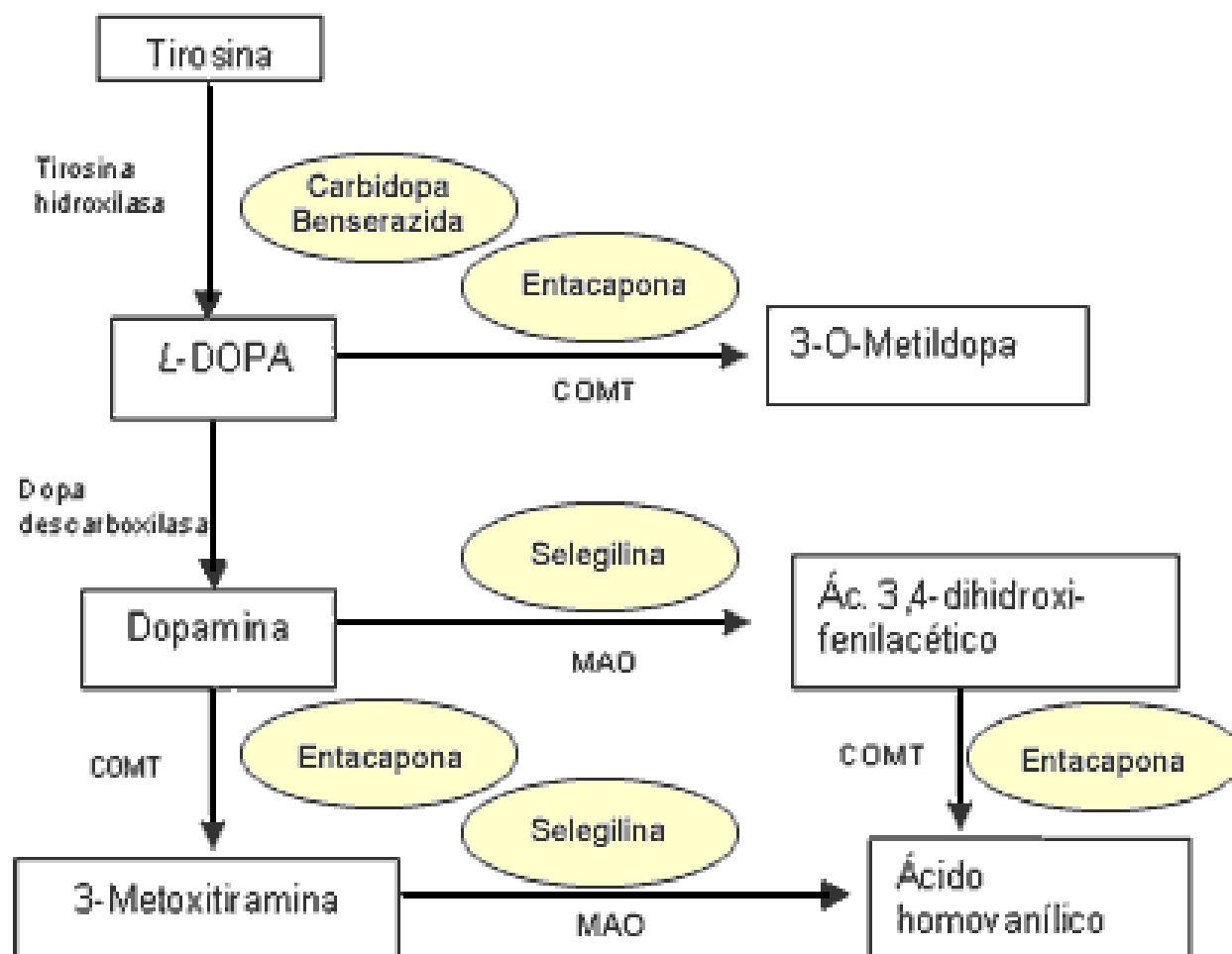


Figura 3. Modelo de estereotáxia y microdiálisis utilizado durante la intervención neuroquirúrgica de la rata.

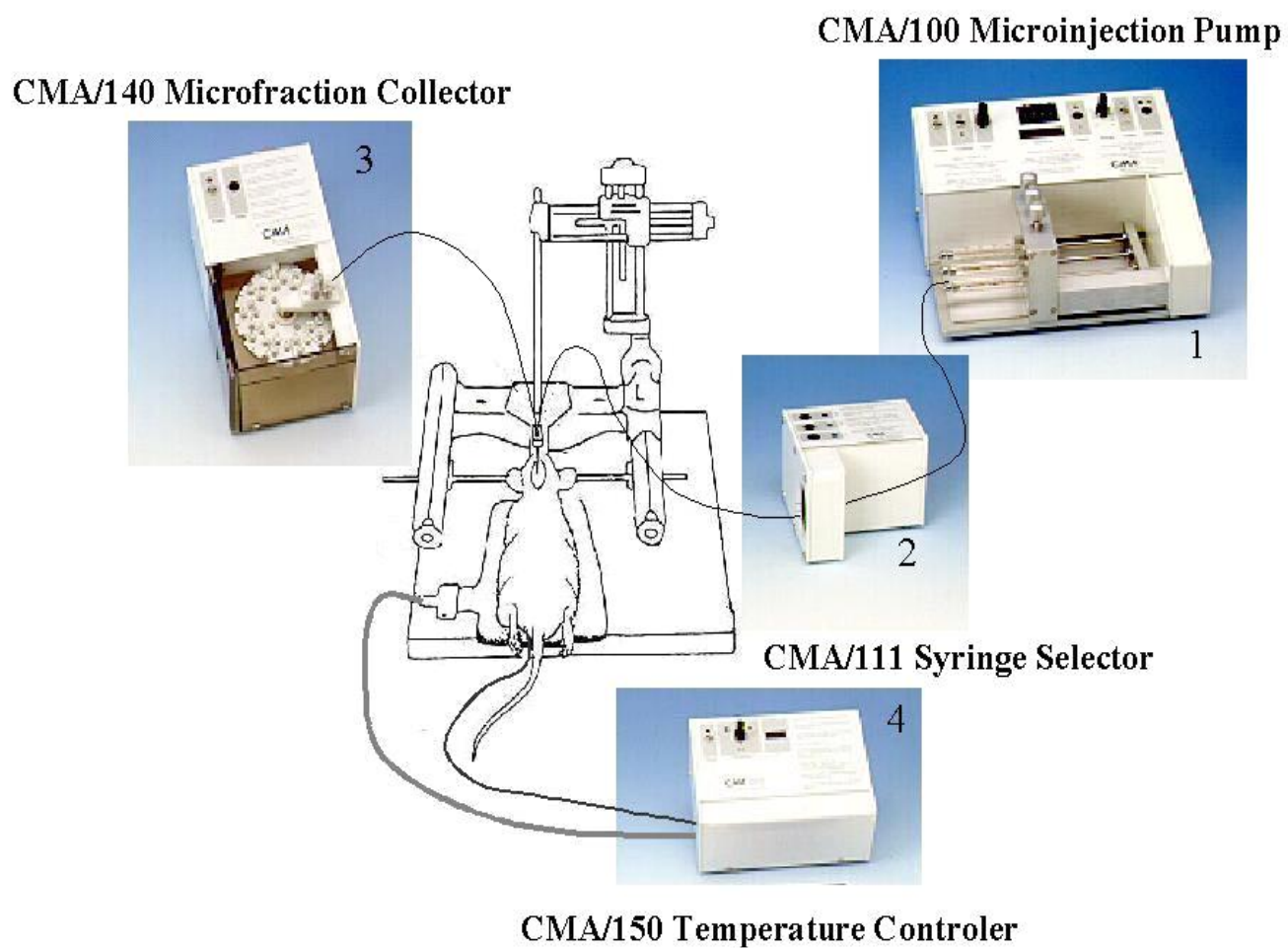


Figura 4: Detalle de sonda de microdiálisis en estriado lateral de rata, posicionado vía estereotáxica.

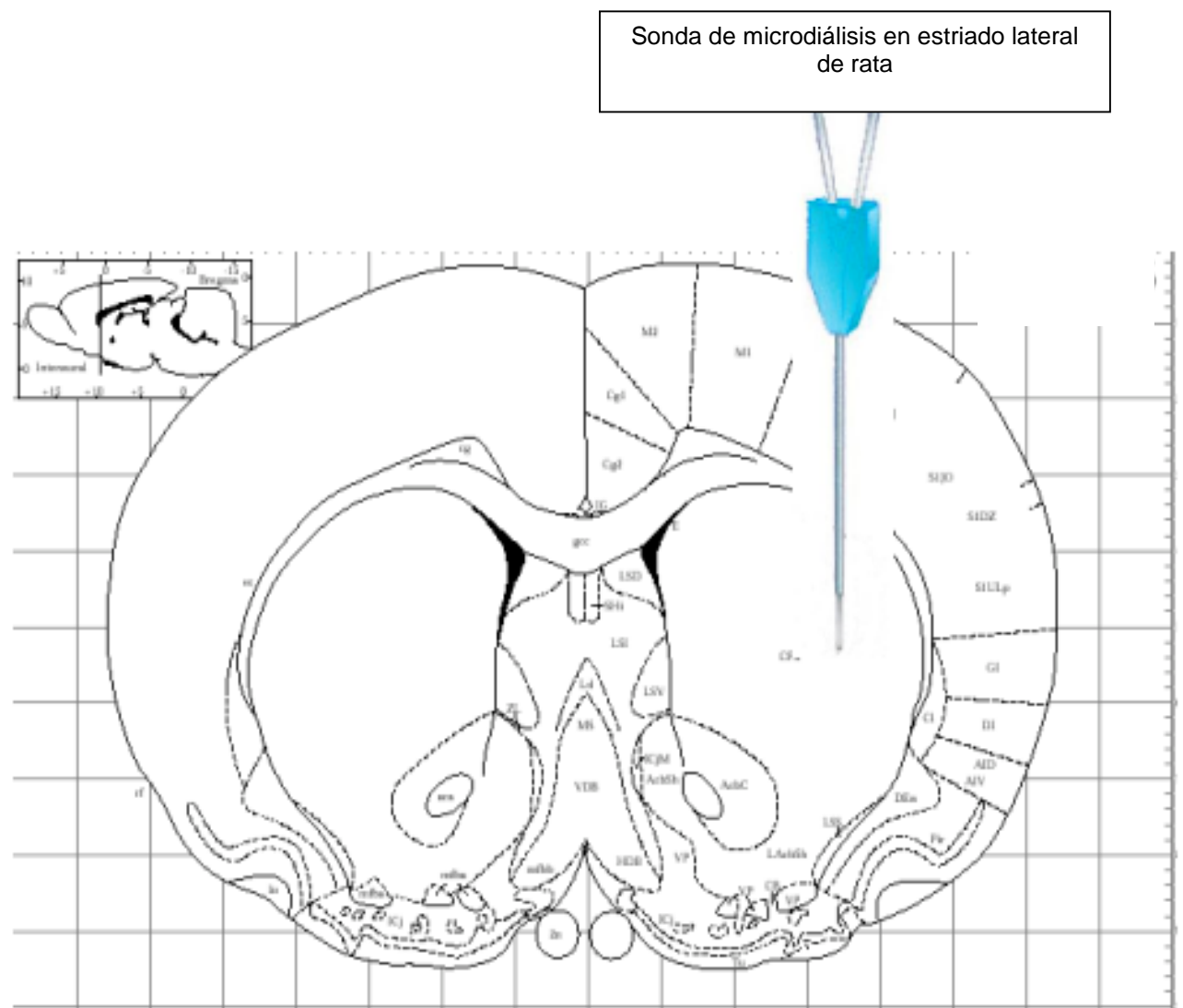


Figura 5: Detalle de sonda de microdiálisis

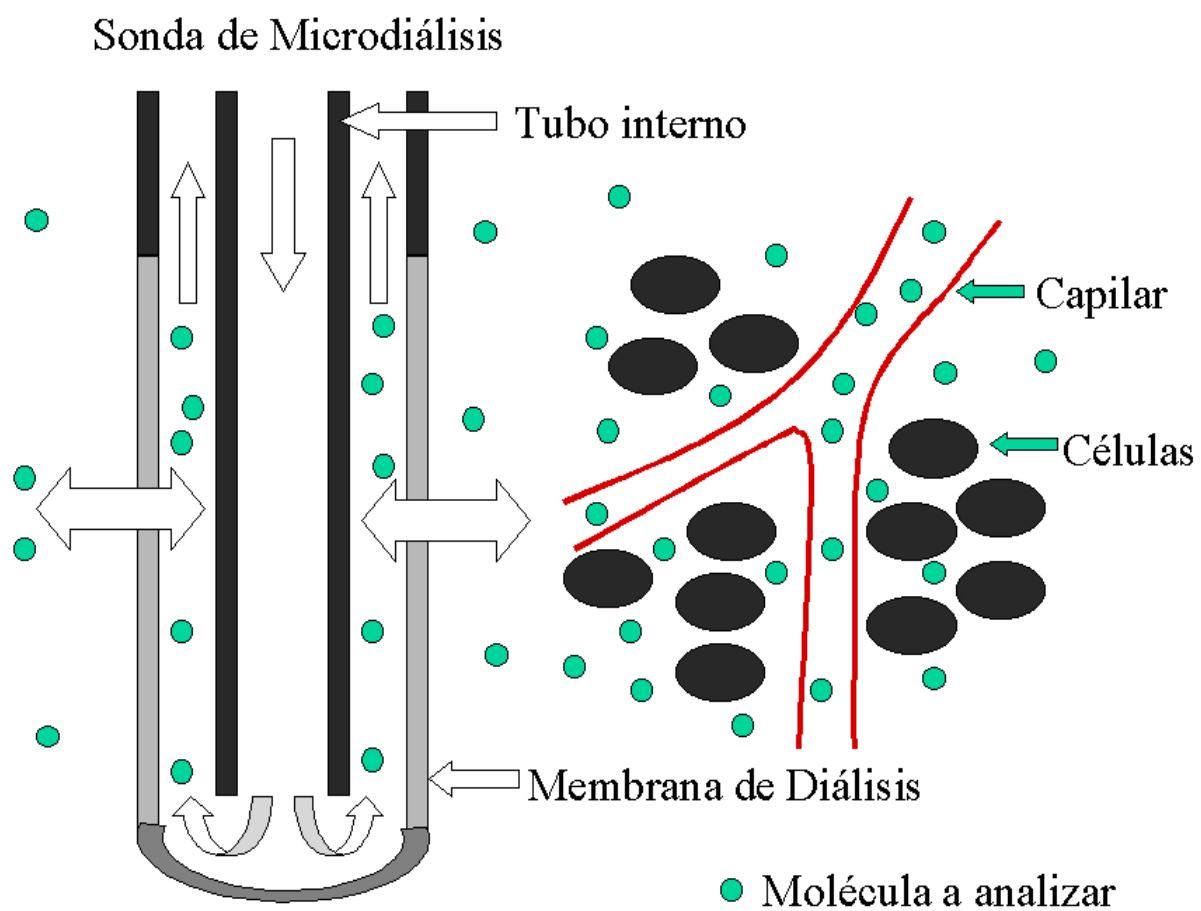
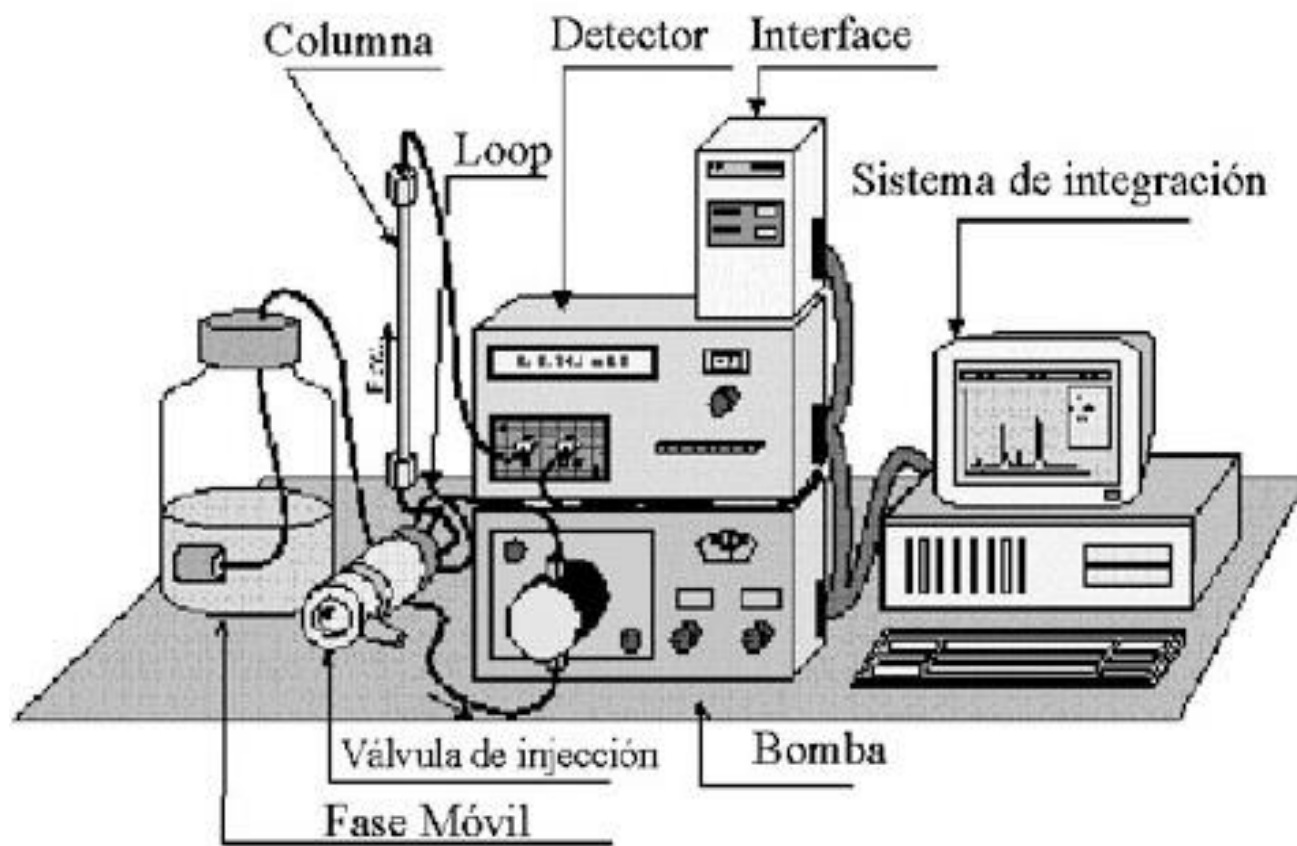




Figura 6: Equipo de HPLC dispuesto para el análisis de monoaminas y sus metabolitos



## 2. Gráficos

Gráfico 1: DA Basal v/s tratamiento en lado lesionado

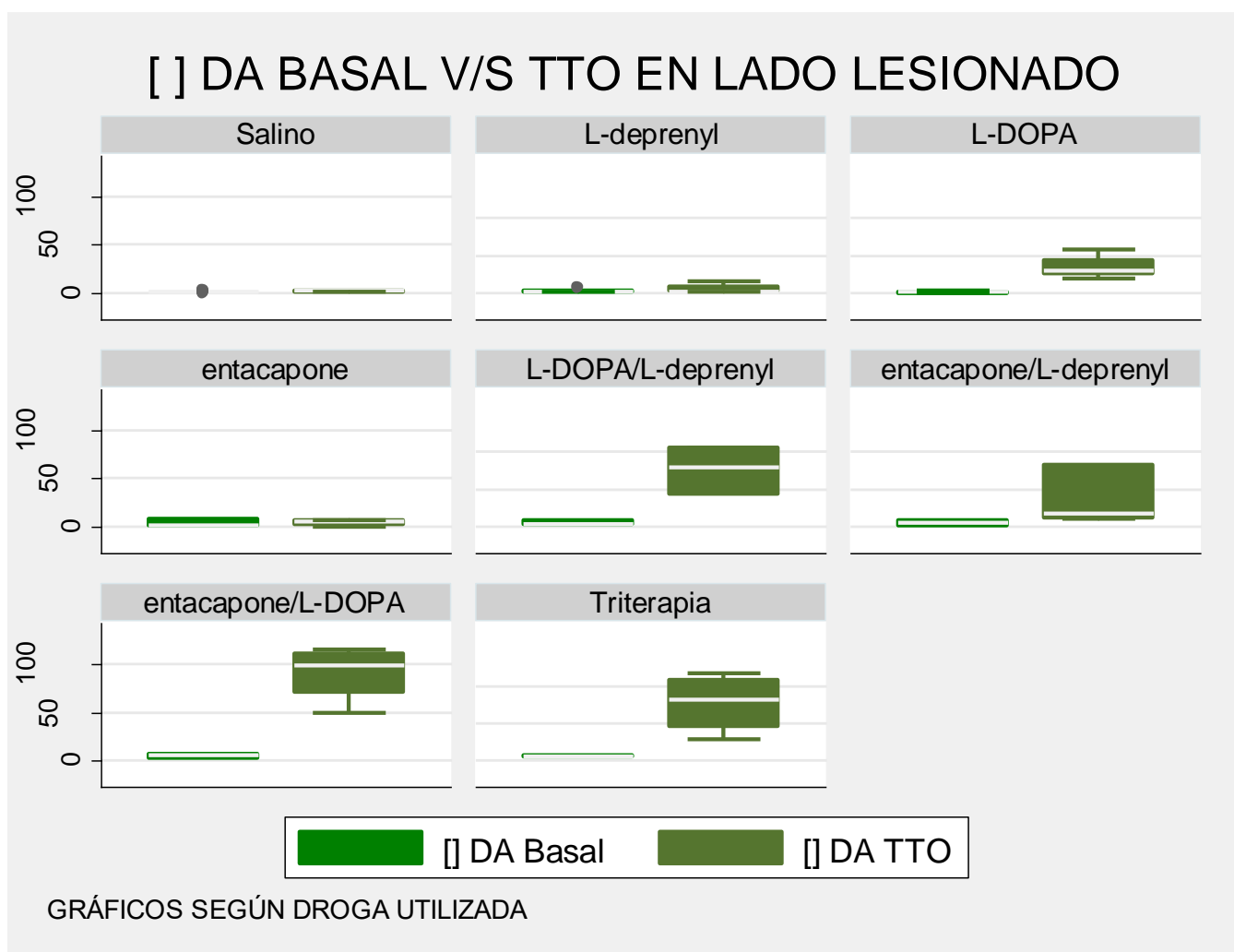


Gráfico 2: DA en lado lesionado con tratamiento

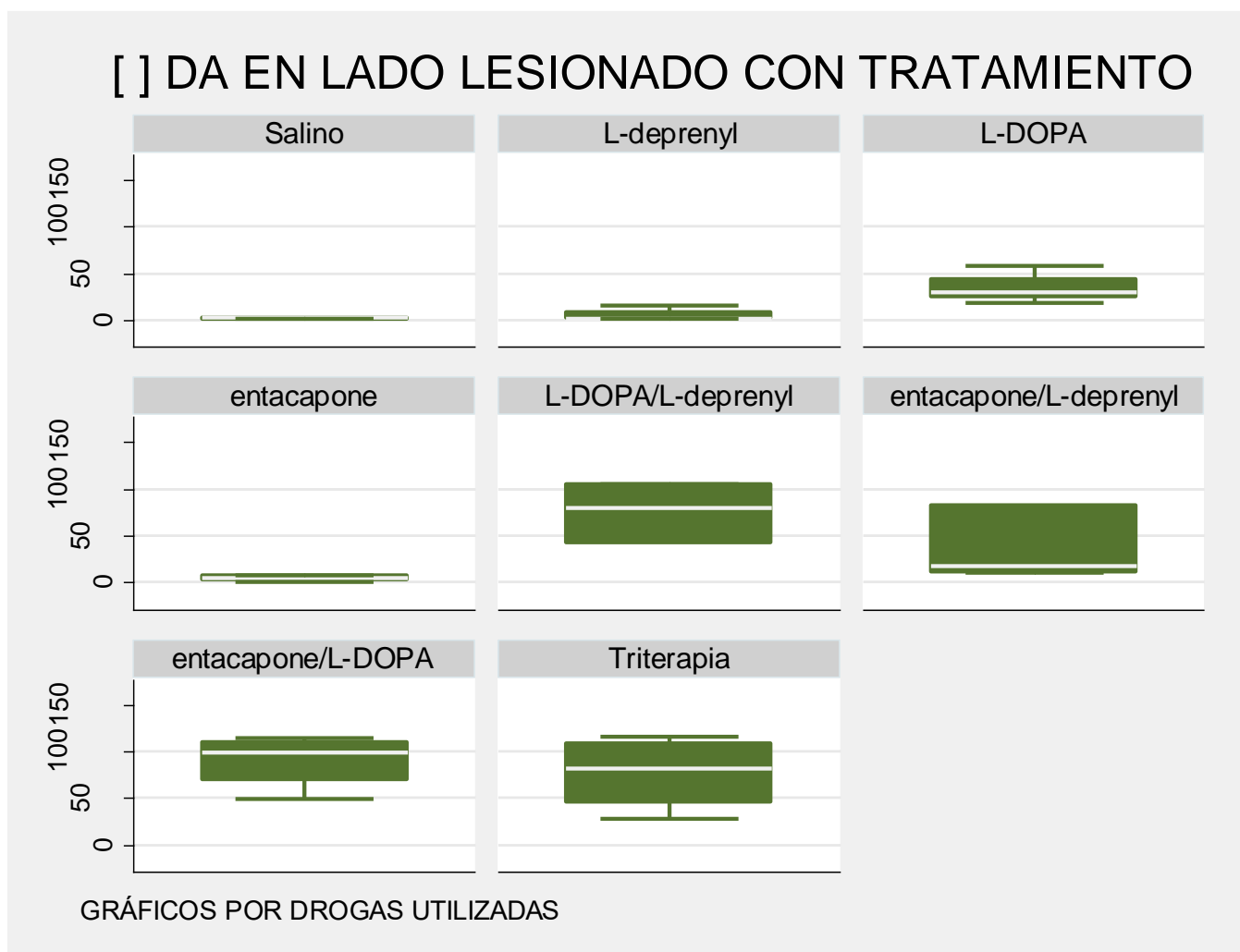
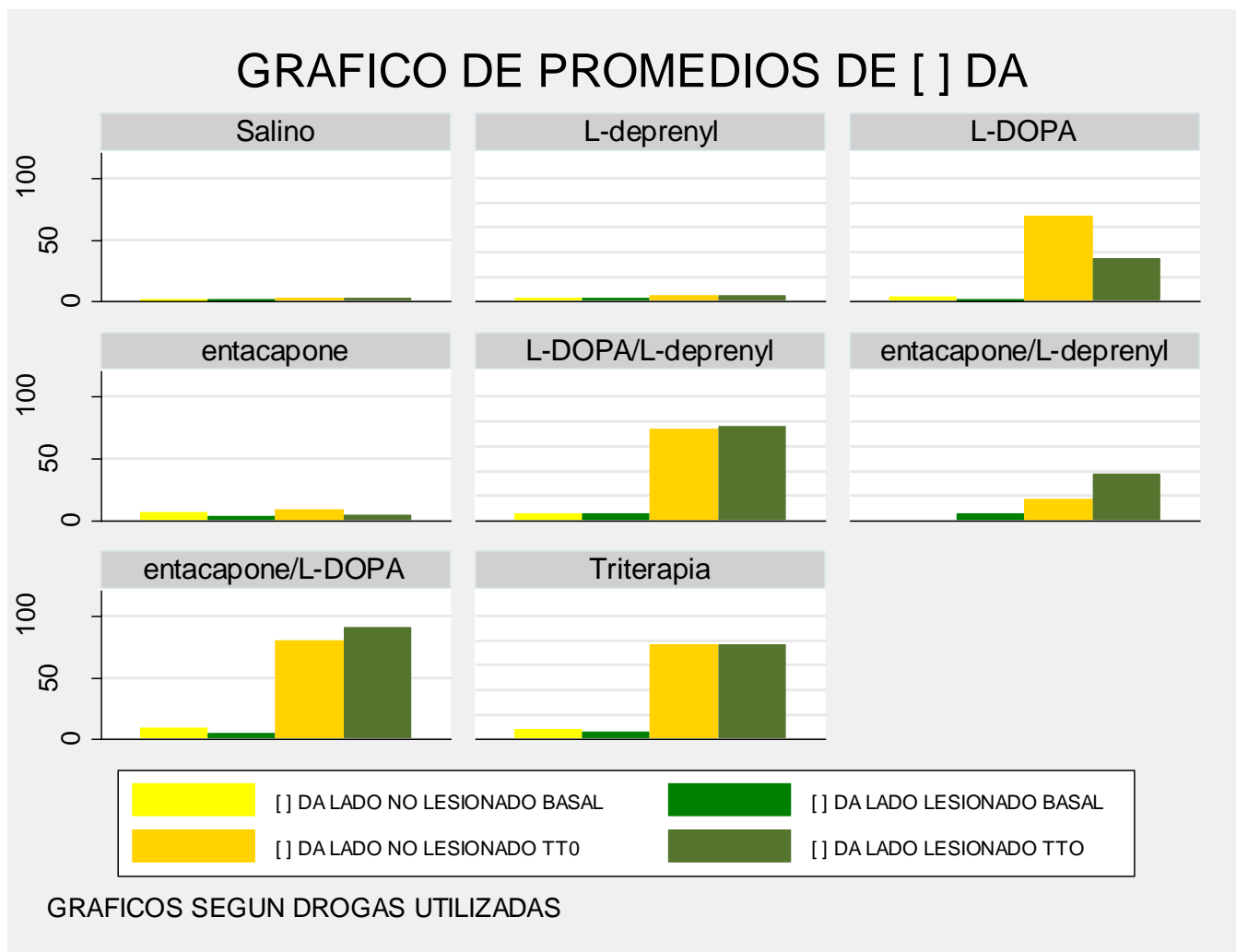


Gráfico 3: Promedios de DA según Drogas utilizadas



### 3. Tablas adicionales

Tabla 16: Resumen de promedios

TABLA RESUMEN DE PROMEDIOS					
	tipo	nolesdo~s	lesdop~l	nolesdo~g	lesdop~g
1.	Salino	1.56	1.26	3.1	2.23
2.	L-deprenyl	2.56	2.783333	5.108334	4.8925
3.	L-Dopa	4.066667	1.88	69.47166	34.4025
4.	entacapone	5.82	2.8	8.326	4.278
5.	L-Dopa/L-deprenyl	4.9	4.766666	74.12	75.63667
6.	entacapone/L-deprenyl	.	4.966667	16.70667	36.91333
7.	entacapone/L-Dopa	8.9	4.766666	80.125	89.955
8.	Triterapia	7.4	5.7	76.565	76.7475

### RESUMEN DESCRIPTIVO DE CONCENTRACION DOPAMINA PRE DROGA (TUBOS 1-5) POR TIPO DE MEDICAMENTO EN LADO NO LESIONADO (NolesionDopaBas)

Tabla 17: Salino

Salino		NolesionDopaBas		
Percentiles		Smallest		
1%	1.3	1.3		
5%	1.3	1.3		
10%	1.3	1.3	Obs	5
25%	1.3	1.8	Sum of Wgt.	5
50%	1.3		Mean	1.56
		Largest	Std. Dev.	.3714835
75%	1.8	1.3		
90%	2.1	1.3	Variance	.138
95%	2.1	1.8	Skewness	.6464196
99%	2.1	2.1	Kurtosis	1.674701

Tabla 18: *L-deprenyl*

<i>L-deprenyl</i>		<b>NolesionDopaBas</b>		
Percentiles	Smallest			
1%	1.5	1.5		
5%	1.5	1.8		
10%	1.5	2.4	Obs	5
25%	1.8	2.4	Sum of Wgt.	5
50%	2.4	Mean		2.56
		Largest	Std. Dev.	1.258173
75%	2.4	1.8		
90%	4.7	2.4	Variance	1.583
95%	4.7	2.4	Skewness	1.145457
99%	4.7	4.7	Kurtosis	2.814638

Tabla 19: L-DOPA

L-DOPA		<b>NolesionDopaBas</b>		
Percentiles	Smallest			
1%	1.9	1.9		
5%	1.9	1.9		
10%	1.9	1.9	Obs	6
25%	1.9	4.1	Sum of Wgt.	6
		Mean		4.066667
		Largest	Std. Dev.	2.664332
75%	6.8	1.9		
90%	7.8	4.1	Variance	7.098667
95%	7.8	6.8	Skewness	.4858475
99%	7.8	7.8	Kurtosis	1.505946

Tabla 20: entacapone

entacapone			NolesionDopaBas	
Percentiles	Smallest			
1%	4.4	4.4		
5%	4.4	5		
10%	4.4	6.2	Obs	5
25%	5	6.2	Sum of Wgt.	5
50%	6.2		Mean	5.82
		Largest	Std. Dev.	1.136662
75%	6.2	5		
90%	7.3	6.2	Variance	1.292
95%	7.3	6.2	Skewness	-.0120131
99%	7.3	7.3	Kurtosis	1.75181

Tabla 21: L-DOPA/L-deprenyl

L-DOPA/L-deprenyl			NolesionDopaBas	
Percentiles	Smallest			
1%	2.1	2.1		
5%	2.1	4.9		
10%	2.1	7.7	Obs	3
25%	2.1	.	Sum of Wgt.	3
50%	4.9		Mean	4.9
		Largest	Std. Dev.	2.8
75%	7.7	.		
90%	7.7	2.1	Variance	7.84
95%	7.7	4.9	Skewness	-1.04e-07
99%	7.7	7.7	Kurtosis	1.5

Tabla 22: entacapone/L-DOPA

entacapone/L-DOPA			NolesionDopaBas	
Percentiles	Smallest			
1%	6.1	6.1		
5%	6.1	8.8		
10%	6.1	10	Obs	4
25%	7.45	10.7	Sum of Wgt.	4
50%	9.4		Mean	8.9
		Largest	Std. Dev.	2.024846
75%	10.35	6.1		
90%	10.7	8.8	Variance	4.1
95%	10.7	10	Skewness	-.6857102
99%	10.7	10.7	Kurtosis	1.941368

Tabla 23: Triterapia

Triterapia			NolesionDopaBas	
Percentiles	Smallest			
1%	2.5	2.5		
5%	2.5	6.3		
10%	2.5	10.1	Obs	4
25%	4.4	10.7	Sum of Wgt.	4
50%	8.2		Mean	7.4
		Largest	Std. Dev.	3.803507
75%	10.4	2.5		
90%	10.7	6.3	Variance	14.46667
95%	10.7	10.1	Skewness	-.4432111
99%	10.7	10.7	Kurtosis	1.59205



RESUMEN DESCRIPTIVO DE CONCENTRACION DOPAMINA PRE DROGA (TUBOS 1-5) POR TIPO DE MEDICAMENTO EN LADO LESIONADO (LesionDopaBasal)

Tabla 24: Salino

Salino		LesionDopaBasal		
Percentiles	Smallest			
1%	0	0		
5%	0	1.3		
10%	0	1.3	Obs	5
25%	1.3	1.3	Sum of Wgt.	5
50%	1.3		Mean	1.26
		Largest	Std. Dev.	.8502941
75%	1.3	1.3		
90%	2.4	1.3	Variance	.7230001
95%	2.4	1.3	Skewness	-.2358051
99%	2.4	2.4	Kurtosis	2.516506

Tabla 25: *L-deprenyl*

<i>L-deprenyl</i>		LesionDopaBasal		
Percentiles	Smallest			
1%	1.5	1.5		
5%	1.5	1.7		
10%	1.5	2.4	Obs	6
25%	1.7	2.4	Sum of Wgt.	6
50%	2.4		Mean	2.783333
		Largest	Std. Dev.	1.767956
75%	2.4	2.4		
90%	6.3	2.4	Variance	3.125667
95%	6.3	2.4	Skewness	1.583347
99%	6.3	6.3	Kurtosis	3.859142

Tabla 26: L-DOPA

L-DOPA		LesionDopaBasal		
Percentiles	Smallest			
1%	.5	.5		
5%	.5	.8		
10%	.5	1.4	Obs	5
25%	.8	2.5	Sum of Wgt.	5
50%	1.4		Mean	1.88
		Largest	Std. Dev.	1.505656
75%	2.5	.8		
90%	4.2	1.4	Variance	2.267
95%	4.2	2.5	Skewness	.7146422
99%	4.2	4.2	Kurtosis	2.077032

Tabla 27: entacapone

entacapone		LesionDopaBasal		
Percentiles	Smallest			
1%	0	0		
5%	0	.8		
10%	0	7.6	Obs	3
25%	0	.	Sum of Wgt.	3
50%	.8		Mean	2.8
		Largest	Std. Dev.	4.176123
75%	7.6	.		
90%	7.6	0	Variance	17.44
95%	7.6	.8	Skewness	.6780261
99%	7.6	7.6	Kurtosis	1.5

Tabla 28: L-DOPA/L-deprenyl

L-DOPA/L-deprenyl			LesionDopaBasal	
Percentiles	Smallest			
1%	1.6	1.6		
5%	1.6	4		
10%	1.6	8.7	Obs	3
25%	1.6	.	Sum of Wgt.	3
50%	4		Mean	4.766667
		Largest	Std. Dev.	3.611555
75%	8.7	.		
90%	8.7	1.6	Variance	13.04333
95%	8.7	4	Skewness	.372412
99%	8.7	8.7	Kurtosis	1.5

Tabla 29: entacapone/L-deprenyl

entacapone/L-Deprenyl			LesionDopaBasal	
Percentiles	Smallest			
1%	.6	.6		
5%	.6	5		
10%	.6	9.3	Obs	3
25%	.6	.	Sum of Wgt.	3
50%	5		Mean	4.966667
		Largest	Std. Dev.	4.350096
75%	9.3	.		
90%	9.3	.6	Variance	18.92333
95%	9.3	5	Skewness	-.0140764
99%	9.3	9.3	Kurtosis	1.5

Tabla 30: entacapone/L-DOPA

entacapone/L-DOPA			LesionDopaBasal	
Percentiles	Smallest			
1%	2.1	2.1		
5%	2.1	5		
10%	2.1	7.2	Obs	3
25%	2.1	.	Sum of Wgt.	3
50%	5		Mean	4.766667
		Largest	Std. Dev.	2.557994
75%	7.2	.		
90%	7.2	2.1	Variance	6.543333
95%	7.2	5	Skewness	-.1661826
99%	7.2	7.2	Kurtosis	1.5

Tabla 31: Triterapia

Triterapia			LesionDopaBasal	
Percentiles	Smallest			
1%	5.3	5.3		
5%	5.3	6.1		
10%	5.3	.	Obs	2
25%	5.3	.	Sum of Wgt.	2
50%	5.7		Mean	5.7
		Largest	Std. Dev.	.5656852
75%	6.1	.		
90%	6.1	.	Variance	.3199998
95%	6.1	5.3	Skewness	0
99%	6.1	6.1	Kurtosis	1

RESUMEN DESCRIPTIVO DE CONCENTRACION DOPAMINA POST DROGA (TUBOS 6-10) POR TIPO DE MEDICAMENTO EN LADO NO LESIONADO (NolesionDopaDrug)

Tabla 32: Salino

Salino		NolesionDopaDrug		
Percentiles		Smallest		
1%	2.02	2.02		
5%	2.02	2.27		
10%	2.02	3.28	Obs	4
25%	2.145	4.83	Sum of Wgt.	4
50%	2.775		Mean	3.1
		Largest	Std. Dev.	1.275487
75%	4.055	2.02		
90%	4.83	2.27	Variance	1.626867
95%	4.83	3.28	Skewness	.6217713
99%	4.83	4.83	Kurtosis	1.812503

Tabla 33: *L-deprenyl*

<i>L-deprenyl</i>		NolesionDopaDrug		
Percentiles		Smallest		
1%	1.52	1.52		
5%	1.52	2.4		
10%	1.52	2.64	Obs	6
25%	2.4	3.03	Sum of Wgt.	6
50%	2.835		Mean	5.108333
		Largest	Std. Dev.	5.467597
75%	5.05	2.64		
90%	16.01	3.03	Variance	29.89462
95%	16.01	5.05	Skewness	1.61589
99%	16.01	16.01	Kurtosis	3.867075

Tabla 34: L-DOPA

L-DOPA		NolesionDopaDrug		
Percentiles		Smallest		
1%	11.34	11.34		
5%	11.34	17.91		
10%	11.34	30.64	Obs	6
25%	17.91	35.06	Sum of Wgt.	6
50%	32.85	Mean		69.47167
		Largest	Std. Dev.	77.16541
75%	114.52	30.64		
90%	207.36	35.06	Variance	5954.5
95%	207.36	114.52	Skewness	1.087282
99%	207.36	207.36	Kurtosis	2.624883

Tabla 35: entacapone

entacapone		NolesionDopaDrug		
Percentiles		Smallest		
1%	4.29	4.29		
5%	4.29	6.18		
10%	4.29	6.94	Obs	5
25%	6.18	10.6	Sum of Wgt.	5
50%	6.94	Mean		8.326
		Largest	Std. Dev.	3.742096
75%	10.6	6.18		
90%	13.62	6.94	Variance	14.00328
95%	13.62	10.6	Skewness	.4365418
99%	13.62	13.62	Kurtosis	1.756928

Tabla 36: L-DOPA/L-deprenyl

L-DOPA/L-deprenyl			NolesionDopaDrug	
Percentiles	Smallest			
1%	54.61	54.61		
5%	54.61	74.12		
10%	54.61	79.21	Obs	4
25%	64.365	88.54	Sum of Wgt.	4
50%	76.665		Mean	74.12
		Largest	Std. Dev.	14.31182
75%	83.875	54.61		
90%	88.54	74.12	Variance	204.8282
95%	88.54	79.21	Skewness	-.5640597
99%	88.54	88.54	Kurtosis	2

Tabla 37:entacapone/L-deprenyl

entacapone/L-deprenyl			NolesionDopaDrug	
Percentiles	Smallest			
1%	10.97	10.97		
5%	10.97	15.64		
10%	10.97	23.51	Obs	3
25%	10.97	.	Sum of Wgt.	3
50%	15.64		Mean	16.70667
		Largest	Std. Dev.	6.337684
75%	23.51	.		
90%	23.51	10.97	Variance	40.16623
95%	23.51	15.64	Skewness	.3004383
99%	23.51	23.51	Kurtosis	1.5

Tabla 38: entacapone/L-DOPA

entacapone/L-DOPA			NolesionDopaDrug	
Percentiles	Smallest			
1%	22.83	22.83		
5%	22.83	74.42		
10%	22.83	109.73	Obs	4
25%	48.625	113.52	Sum of Wgt.	4
50%	92.075		Mean	80.125
		Largest	Std. Dev.	42.05927
75%	111.625	22.83		
90%	113.52	74.42	Variance	1768.982
95%	113.52	109.73	Skewness	-.6470616
99%	113.52	113.52	Kurtosis	1.81641

Tabla 39: Triterapia

Triterapia			NolesionDopaDrug	
Percentiles	Smallest			
1%	57.77	57.77		
5%	57.77	63.07		
10%	57.77	90.81	Obs	4
25%	60.42	94.61	Sum of Wgt.	4
50%	76.94		Mean	76.565
		Largest	Std. Dev.	18.83179
75%	92.71	57.77		
90%	94.61	63.07	Variance	354.6363
95%	94.61	90.81	Skewness	-.0190517
99%	94.61	94.61	Kurtosis	1.078394



RESUMEN DESCRIPTIVO DE CONCENTRACION DOPAMINA POST DROGA  
(MUESTRAS 6-10) POR TIPO DE MEDICAMENTO EN LADO LESIONADO

(LesionDopaDrug)

Tabla 40: Salino

Salino		LesionDopaDrug		
	Percentiles	Smallest		
1%	1.77	1.77		
5%	1.77	2.4		
10%	1.77	2.52	Obs	3
25%	1.77	.	Sum of Wgt.	3
50%	2.4		Mean	2.23
		Largest	Std. Dev.	.4028648
75%	2.52	.		
90%	2.52	1.77	Variance	.1623
95%	2.52	2.4	Skewness	-.6371827
99%	2.52	2.52	Kurtosis	1.5

Tabla 41: *L-deprenyl*

<i>L-deprenyl</i>		LesionDopaDrug		
	Percentiles	Smallest		
1%	1.01	1.01		
5%	1.01	1.02		
10%	1.01	2.4	Obs	4
25%	1.015	15.14	Sum of Wgt.	4
50%	1.71		Mean	4.8925
		Largest	Std. Dev.	6.862795
75%	8.77	1.01		
90%	15.14	1.02	Variance	47.09796
95%	15.14	2.4	Skewness	1.124156
99%	15.14	15.14	Kurtosis	2.307772

Tabla 42: L-DOPA

L-DOPA		LesionDopaDrug			
Percentiles		Smallest			
1%	19.3	19.3			
5%	19.3	29.14			
10%	19.3	31.28	Obs	4	
25%	24.22	57.89	Sum of Wgt.	4	
50%	30.21	Mean		34.4025	
		Largest	Std. Dev.	16.50446	
75%	44.585	19.3			
90%	57.89	29.14	Variance	272.3974	
95%	57.89	31.28	Skewness	.7993188	
99%	57.89	57.89	Kurtosis	2.139653	

Tabla 43: entacapone

entacapone		LesionDopaDrug		
	Percentiles	Smallest		
1%	0	0		
5%	0	1.61		
10%	0	5.05	Obs	5
25%	1.61	7.28	Sum of Wgt.	5
50%	5.05		Mean	4.278
		Largest	Std. Dev.	3.35742
75%	7.28	1.61		
90%	7.45	5.05	Variance	11.27227
95%	7.45	7.28	Skewness	-.2795757
99%	7.45	7.45	Kurtosis	1.397949

Tabla 43: L-DOPA/L-deprenyl

L-DOPA/L-deprenyl		LesionDopaDrug		
	Percentiles	Smallest		
1%	42.13	42.13		
5%	42.13	79.21		
10%	42.13	105.57	Obs	3
25%	42.13	.	Sum of Wgt.	3
50%	79.21		Mean	75.63667
		Largest	Std. Dev.	31.8706
75%	105.57	.		
90%	105.57	42.13	Variance	1015.735
95%	105.57	79.21	Skewness	-.2033883
99%	105.57	105.57	Kurtosis	1.5

Tabla 44: entacapone/*L-deprenyl*

entacapone/ <i>L-deprenyl</i>		<b>LesionDopaDrug</b>		
	Percentiles	Smallest		
1%	10.97	10.97		
5%	10.97	17.03		
10%	10.97	82.74	Obs	3
25%	10.97	.	Sum of Wgt.	3
50%	17.03		Mean	36.91333
		Largest	Std. Dev.	39.80255
75%	82.74	.		
90%	82.74	10.97	Variance	1584.243
95%	82.74	17.03	Skewness	.6887114
99%	82.74	82.74	Kurtosis	1.5

Tabla 45: entacapone /L-DOPA

entacapone/L-DOPA		<b>LesionDopaDrug</b>		
	Percentiles	Smallest		
1%	49.19	49.19		
5%	49.19	89.9		
10%	49.19	105.95	Obs	4
25%	69.545	114.78	Sum of Wgt.	4
50%	97.925		Mean	89.955
		Largest	Std. Dev.	29.06263
75%	110.365	49.19		
90%	114.78	89.9	Variance	844.6363
95%	114.78	105.95	Skewness	-.7581447
99%	114.78	114.78	Kurtosis	1.997782

Tabla 46: Triterapia

Triterapia		LesionDopaDrug		
Percentiles	Smallest			
1%	27.75	27.75		
5%	27.75	62.29		
10%	27.75	100.91	Obs	4
25%	45.02	116.04	Sum of Wgt.	4
50%	81.6		Mean	76.7475
		Largest	Std. Dev.	39.73874
75%	108.475	27.75		
90%	116.04	62.29	Variance	1579.167
95%	116.04	100.91	Skewness	-.2814186
99%	116.04	116.04	Kurtosis	1.520554