

Tesis Doctoral

Efectos y adaptaciones inducidos por el tratamiento prolongado con agonistas dopaminérgicos en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson

Larramendy, Celia

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Larramendy, Celia. (2011). Efectos y adaptaciones inducidos por el tratamiento prolongado con agonistas dopaminérgicos en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Larramendy, Celia. "Efectos y adaptaciones inducidos por el tratamiento prolongado con agonistas dopaminérgicos en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Efectos y adaptaciones inducidos por el tratamiento
prolongado con agonistas dopaminérgicos en un modelo
animal de la enfermedad de Parkinson**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Celia Larramendy

Director de tesis: Dr. Oscar Samuel Gershanik

Consejero de estudios: Dr. Arturo Romano

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA-CONICET)

Buenos Aires, 2011

EFFECTOS Y ADAPTACIONES INDUCIDOS POR EL TRATAMIENTO PROLONGADO CON AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS EN UN MODELO ANIMAL DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Levodopa y pramipexol son drogas de uso frecuente en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Levodopa es el fármaco más efectivo para aliviar las deficiencias motoras pero en la mayoría de los casos induce disquinesias (movimientos involuntarios anormales). Pramipexol ha sido relacionado con efectos neuroprotectores y con una menor inducción de disquinesias. Sin embargo, su eficacia disminuye a medida que progresa la enfermedad. Con el objetivo de analizar si estas diferencias se reflejan a nivel de la expresión de genes, inyectamos ratas con 6-hidroxidopamina en el estriado y caracterizamos un modelo de lesión moderada de la vía nigroestriatal. Luego de la cirugía los animales fueron tratados con levodopa o pramipexol, en dosis que produjeron un beneficio terapéutico similar, determinado como la disminución de la aquinesia, inducida por la lesión, de la pata delantera contralateral al hemisferio lesionado. Un grupo control recibió vehículo. Mediante la tecnología de microarreglos de ADN analizamos 3 tandas independientes de animales a fin de comparar los cambios en la expresión de genes inducidos por los tratamientos de los grupos: normal/vehículo, lesionado/vehículo, lesionado/levodopa, y lesionado/pramipexol. Encontramos que el tratamiento crónico con levodopa y pramipexol indujo cambios en la expresión de numerosos genes, demostrando que, además de las diferencias observadas en el perfil farmacológico y en los efectos clínicos (tanto anti-parkinsonianos como adversos), estas drogas también inducen importantes diferencias a nivel de la expresión génica. La exploración de los genes expresados diferencialmente permitió elaborar nuevas hipótesis, siendo éste el valor principal del análisis masivo de genes.

Palabras claves: Enfermedad de Parkinson, 6-hidroxidopamina, levodopa, pramipexol, microarreglos de ADN, expresión génica.

EFFECTS AND ADAPTATIONS INDUCED BY LONG TERM TREATMENT WITH DOPAMINE AGONISTS IN AN ANIMAL MODEL OF PARKINSON'S DISEASE

Levodopa and pramipexole are frequently used drugs in the treatment of Parkinson's disease. Levodopa is the most effective to alleviate motor disability but induces abnormal involuntary movements (dyskinesias). Pramipexole have been proposed to have neuroprotective effects and less induction of dyskinesias. In order to evaluate possible differences at the gene expression level, rats were injected with 6-hydroxydopamine in the striatum and a partial nigrostriatal lesion model was characterized. After surgery, animals were treated with levodopa or pramipexole at doses that produced similar therapeutic benefit, evaluated by the reversal of akinesia, induced by the lesion, of the forepaw contralateral to the lesioned hemisphere. A control group received vehicle alone. We analyzed 3 independent groups of normal and lesioned rats by DNA microarray technology in order to compare the genetic profile of the groups: normal/vehicle, lesioned/vehicle, lesioned/levodopa, and lesioned/pramipexole. We have found that cronic treatment with levodopa and pramipexole induced changes in gene expression. We have demonstrated that besides the differences seen in the pharmacological profile and the clinic effects (antiparkinsonian and colateral effects) of levodopa and pramipexole, these drugs also have important differences at the gene expression level. The analysis of differentially expressed genes induced by these drugs allowed us to elaborate new hypothesis, being the most valuable result of massive gene analysis.

Key words: Parkinson's disease, 6-hydroxydopamine, levodopa, pramipexole, DNA microarrays, gene expression.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Oscar Gershanik, por su constante dirección y enseñanzas, pero sobre todo, por su generosidad y buen humor.

Al Dr. Modesto Rubio y Dra. Silvia Wikinski, por permitirme llevar a cabo este trabajo en el ININFA.

Al Dr. Arturo Romano, por sus sugerencias y buena disposición.

Al Dr. Gustavo Murer, por su crítica, sus atinados consejos y su comprensión.

Al Dr. Elmer Fernandez, Lic. Germán Gonzalez, Dr. Cristobal Rodriguez-Fresno, por sus invaluable contribuciones a este trabajo.

Al Dr. Juan Ferrario, por mantener el contacto a pesar de la distancia.

A mis compañeros y amigos, Dra. Irene Taravini y Lic. Mariano Saborido... ¡¡¡no me alcanzan las palabras!!!

A Floor Spaans, por su colaboración en este trabajo y por su cariño, a pesar de su breve estadía.

A Lara Lapyckyj por tomarse su tiempo e iniciarme en el diseño de primers.

A mis compañeros del ININFA!! Un agradecimiento especial a las chicas del Lab1: María Clara, Gaby y Stella; a Laura Gutiérrez, Georgina y Fernandita, por su buena onda y por preocuparse cada día. A Andrea Arín.

A Claudia García Bonelli, Silvina Díaz y Marina Cereseto, ¡¡¡por los buenísimos momentos compartidos y por los que vendrán!!! Silvi, ¡gracias por contribuir a la escritura de esta tesis!

A mis “primos” del laboratorio de Fisiología de Circuitos Neuronales, Camila Zold y Gregorio Galiñanes.

A Silvia Pedetta y a Noel Federman por ahorrarme los viajes a Exactas!

A mis queridos amigos de la facu: Mati, Flor, Santi, Silvi, Manu, Andro, Goyo y Mica.

A mis entrañables amigas de la vida: Mai, Ale, Juli, Gaby, Dovile y Cushi.

A mi familia: Mariana, Ricardo, Mari, Ber, Mati, Car, Cata y Annie.

A Guillo, por contagiarme su alegría, por enseñarme a superarme y no permitirme bajar los brazos.

A la gente que estuvo alrededor, de una u otra forma...

A mis amigos Irene y Mariano, porque sin su cariño, contención y ayuda no lo hubiese logrado.

A mis padres, por su confianza y sus palabras de aliento cuando más las necesito.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

Fisiología de los ganglios de la base	1
Neurotransmisión dopaminérgica	6
Enfermedad de Parkinson	8
Etiología	10
Terapéuticas de la enfermedad de Parkinson	
Tratamientos actuales	13
La terapia con Levodopa	16
Agonistas dopaminérgicos: la terapia con pramipexol	18
Fármacos dopaminérgicos e inducción de la expresión génica	21
Modelos animales de la EP y pruebas de evaluación conductual	22
Breve introducción al análisis de la expresión masiva de genes	24

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 27

CAPÍTULO I

Desarrollo y caracterización de un modelo animal de la enfermedad de Parkinson

Consideraciones preliminares

Modelos animales de la EP: desnervación dopaminérgica inducida por 6-OHDA	31
Administración de 6-OHDA en el cuerpo estriado	33
Evaluación de las deficiencias motoras funcionales inducidas por la lesión unilateral con 6-OHDA	34
Prueba del Cilindro	35
Prueba de pasos de ajuste	35

Materiales y Métodos

Animales	37
Inyección intraestriatal de 6-OHDA: determinación de la dosis	37
Inyección intraestriatal de tinta china: verificación de las coordenadas de inyección	38
Efecto de la administración de 6-OHDA: Evaluación conductual e histológica	39
Pruebas comportamentales farmacológicas	
Prueba de amfetamina y prueba de apomorfina	39
Pruebas comportamentales no farmacológicas	
Prueba del cilindro	40
Prueba de pasos de ajuste	42

Obtención del tejido	43
Tinción con violeta de cresilo (técnica de Nissl)	43
Evaluación del grado de desnervación dopaminérgica	
Inmunohistoquímica para Tirosina Hidroxilasa	44
Cuantificación del número de células remanentes	
TH-inmunoreactivas en la SNpc	44
Cuantificación del porcentaje de área TH- ir en el estriado	45
Análisis estadístico	46
Resultados	
Inyección intraestriatal de 6-OHDA: determinación de la dosis	47
Visualización de los sitios de inyección	48
<i>Inyección intraestriatal de 8µg/ 3µl de 6-OHDA por sitio de inyección</i>	
Determinación de la presencia de infiltrado inflamatorio	49
Estudios comportamentales	
Pruebas farmacológicas: prueba de amfetamina y prueba de apomorfina	50
Pruebas no farmacológicas: prueba de pasos de ajuste y prueba del cilindro	50
Determinación del grado de desnervación dopaminérgica	
Inmunohistoquímica para TH	52
Análisis de correlación entre las variables comportamentales e histológicas	56
Discusión	58

CAPÍTULO II

Caracterización del tratamiento farmacológico con levodopa y con pramipexol de animales con lesión moderada de la vía nigroestriatal

Consideraciones preliminares	60
Materiales y Métodos	
Animales	62
Lesión intraestriatal con 6-OHDA	62
Determinación de la estabilidad de la solución de pramipexol en botella por HPLC	63
Generalidades del tratamiento farmacológico	63
Prueba del cilindro bajo efecto de los fármacos	64
Obtención del tejido e inmunohistoquímica para TH	65
Puesta a punto de la dosis de pramipexol	65
Análisis estadístico	66
Resultados	
Curva dosis respuesta de pramipexol: efecto de la dosis sobre la aquinesia de la PDC en la PC	68
Evaluación del efecto de levodopa y pramipexol sobre el uso de la PDC en la PC	69

Evaluación del efecto de las dosis de los fármacos sobre el desarrollo de disquinesias	71
Discusión	72

CAPÍTULO III

Expresión génica inducida por el tratamiento con levodopa y con pramipexole en el estriado desnervado de animales con lesión moderada de la vía nigroestriada

Consideraciones preliminares	74
El uso de la expresión génica como herramienta de estudio de primera aproximación	76
Análisis e interpretación de los datos de un experimento de microarreglos	79
Visualización de expresión génica: gráficos <i>Heatmaps</i>	80
Caracterización funcional: Ontología de genes	81
KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	84
DAVID Bioinformatics (the database for annotation, visualization and integrated discovery)	85
Validación de los resultados de los experimentos de microarreglos	85
Materiales y Métodos	
Animales	87
Lesión intraestriatal con 6-OHDA	87
Protocolo experimental	88
Elección y preparación de las muestras del experimento de microarreglos	88
Obtención del tejido	89
Inmunohistoquímica para TH	90
Extracción del ARN total	90
Cuantificación y determinación de la calidad y pureza del ARN total	91
Procesamiento de las muestras por la técnica de microarreglos	92
Validación de los resultados de los microarreglos por la técnica de qRT-PCR	95
Análisis estadístico	98
Resultados	
RESULTADOS COMPORTAMENTALES	
Efecto del tratamiento con levodopa y con pramipexol sobre el uso de la PDC en la PC	99
RESULTADOS A NIVEL DE EXPRESIÓN GÉNICA	
Expresión génica inducida por el tratamiento con levodopa y pramipexol en el estriado desnervado	103
Comparación grupos Lesionado Levodopa (LL)- Lesionado Agua (LA)	
Efecto del tratamiento con levodopa sobre la expresión de genes	106
Comparación grupos Lesionado Pramipexol (LP)- Lesionado Agua (LA)	
Efecto del tratamiento con pramipexol sobre la expresión de genes	109
Comparación grupos Lesionado Levodopa (LL) – Lesionado Pramipexol (LP)	110

Validación de los resultados del experimento de microarreglos por qRT-PCR	115
Discusión	
Tratamiento con levodopa y con pramipexol: análisis masivo de la expresión de genes	117
Vías KEGG enriquecidas	117
Validación de los resultados de los microarreglos: GFAP y NURR1	122
Otros genes de interés con expresión diferencial	124
¿Levodopa y pramipexol: mecanismos diferentes que favorecen la indemnidad o “salud” celular?	125
Relación entre la respuesta terapéutica bajo efecto de los tratamientos y el grado de desnervación dopaminérgica	128
CONCLUSIONES FINALES	129
APÉNDICES	
Apéndice I: Comparación grupos Lesionado Levodopa (LL)-Lesionado Agua (LA)	130
Apéndice II: Comparación grupos Lesionado Pramipexol (LP)-Lesionado Agua (LA)	138
Apéndice III: Comparación grupos Lesionado Levodopa (LL)-Lesionado Pramipexol (LP)	144
Apéndice IV: Comparación grupo Normal Agua (NA) – Lesionado Agua (LA)	160
BIBLIOGRAFÍA	170

ABREVIATURAS

- 3MT: 3-metoxitiramina
6-OHDA: 6-hidroxidopamina
A₂₃₀: absorbancia a 230 nm
A₂₆₀: absorbancia a 260 nm
A₂₈₀: absorbancia a 280 nm
AADC: descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
AC: adenilato ciclasa
ACh: acetilcolina
AD: autosómica dominante
ADN: ácido desoxiribonucleico
ADNc: ADN copia
AMPA: ácido 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl) propanoico
AMPc: adenosín monofosfato cíclico
AP: anteroposterior
APE 1: del inglés, *apurinic/aprimidinic endonuclease 1*
AR: autosómica recesiva
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ATP13A2: del inglés, *ATPase type 13A2*
BDNF: del inglés, *brain-derived neurotrophic factor*
bFGF: del inglés, *basic fibroblast growth factor*
BI: barra incisal
Cc: concentración
COMT: catecol-O-metil-transferasa
DA: dopamina
DAB: 3,3'-diaminobenzidina
DAT: transportador pre-sináptico de dopamina
DAVID: del inglés, *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*
DBS: del inglés, *deep brain stimulation*
DDC: DOPA descarboxilasa
DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DV: dorsoventral
EP: enfermedad de Parkinson
G: proteína G
GABA: ácido γ -amino-butírico
GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GB: ganglios de la base
GDNF: del inglés, *glial cell line-derived neurotrophic factor*
GFAP: del inglés, *glial fibrillary acidic protein*
Glu: ácido glutámico
GO: del inglés, *gene ontology*
Gpe: globo pálido externo
Gpi: globo pálido interno
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
HBr: bromuro de hidrógeno
HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia; del inglés, *High-performance liquid chromatography*
HPRT: hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa
HtrA2: del inglés, *HtrA serine peptidase 2*
HVA: ácido homo-vanílico
i.p.: intraperitoneal
IEG: genes de expresión temprana; del inglés, *immediate early genes*
IgG: inmunoglobulina G
IHQ: inmunohistoquímica
KEGG: del inglés, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
LA: lesión/agua
L-DOPA: L-3,4-di-hidroxi-fenil-alanina
LL: lesión/levodopa
LP: lesión/pramipexol
LRRK2: del inglés, *leucine-rich repeat kinase 2*
M: molar
MAO: monoamino oxidasa
MBP: del inglés, *myelin basic protein*
mfb: del inglés, *median forebrain bundle*
ML: mediolateral
MM: del inglés, *mismatch*
mM: milimolar
NA: normal/agua
Ndufa12: del inglés, *NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 12*
NMDA: N-Metil-D-aspartato
Nr4a2/ Nurr1: del inglés, *nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2*
NST: núcleo subtalámico
NT-3: del inglés, *neurotrophin-3*
NTC: del inglés, *non template control*
Olr1375: del inglés, *olfactory receptor 1375*
PB: buffer fosfato

PBS: buffer fosfato salina
PC: prueba del cilindro
PCR: reacción en cadena de la polimerasa, del inglés, *polymerase chain reaction*
PDC: pata delantera contralateral
PFA: paraformaldehído
PINK1: del inglés, *PTEN induced putative kinase 1*
PM: del inglés, *perfect match*
PPA: prueba de pasos de ajuste
PSG: del inglés, Parkinson Study Group
Psm14: del inglés, *proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14*
PTN: pleiotrofina
Put: putamen
qRT-PCR: PCR en tiempo real cuantitativa
RCD: respuesta de corta duración
RD1: receptor de dopamina de la familia D₁
RD2: receptor de dopamina de la familia D₂
RLD: respuesta de larga duración
RMA: del inglés, *Robust Multichip Average*
RT: transcriptasa reversa; del inglés, *reverse transcription*
s.c.: subcutánea
S.E.M: error estándar de la media, del inglés, *standard error of mean*
SN: *substantia nigra*
SNC: sistema nervioso central
SNpc: *substantia nigra pars compacta*
SNpr: *substantia nigra pars reticulata*
TB: buffer Tris
TdT: del inglés, *terminal deoxynucleotidyl transferase*
TGF- β : del inglés, *transforming growth factor beta*
Th: tálamo
TH: tirosina hidroxilasa
TH-ir: TH-inmunoreactiva
UCH-L1: del inglés, *ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)*
UDG: del inglés, *uracil DNA glycosilase*
UI: unidades internacionales
UV: ultravioleta
VMAT: transportador vesicular de monoaminas
Xiap: del inglés, *X-linked inhibitor of apoptosis*
 Δ FosB: del inglés, *chronic Fos-related antigens delta*

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Fisiología de los ganglios de la base

Los ganglios de la base (GB) son un conjunto de núcleos grises ubicados en la base del encéfalo. Éstos son el estriado, el globo pálido interno (Gpi), el globo pálido externo (Gpe), la *substantia nigra pars compacta* (SNpc), la *substantia nigra pars reticulata* (SNpr) y el núcleo subtalámico (NST). En primates, el estriado está formado por el núcleo caudado y el putamen, constituyendo el neostriado, y por el estriado ventral, también conocido como estriado límbico.

Actualmente los GB están funcionalmente subdivididos en motor, oculomotor, asociativo, límbico y orbitofrontal, de acuerdo a las principales áreas de proyección cortical. Esta organización anatómica es la base de funciones como la atención, el aprendizaje explícito e implícito, el comportamiento asociado a la recompensa, la formación de hábitos y la estimación del tiempo, las cuales dependen de la activación de los circuitos corticales a través del núcleo caudado y el putamen (anterior y ventral). Esta compleja organización anátomo-funcional ha cambiado la visión tradicional que postulaba a los GB como centros fundamentalmente motores. Sin embargo, el rol de los GB en el control motor es el mejor conocido y la principal manifestación clínica de su disfunción son los trastornos del movimiento, entre ellos la Enfermedad de Parkinson (EP) (revisado por Obeso y col., 2008b). Debido a su participación en la regulación del movimiento y en los cambios fisiopatológicos que subyacen a la EP, revisaremos los detalles de la compleja organización anatómica y funcional de los mismos.

En base a estudios neuroanatómicos y neuroquímicos se delineó el **modelo original o clásico** de los circuitos de interconexión de los GB, el cual se basa en 3 descubrimientos principales:

a) *Organización somatotópica*

Las áreas motoras corticales (área 4, área 6 y área motora suplementaria) y la corteza somatosensorial primaria proyectan de manera organizada somatotópicamente al

estriado. La zona motora involucra la región dorsolateral de los núcleos de los GB (**Figura 1**).

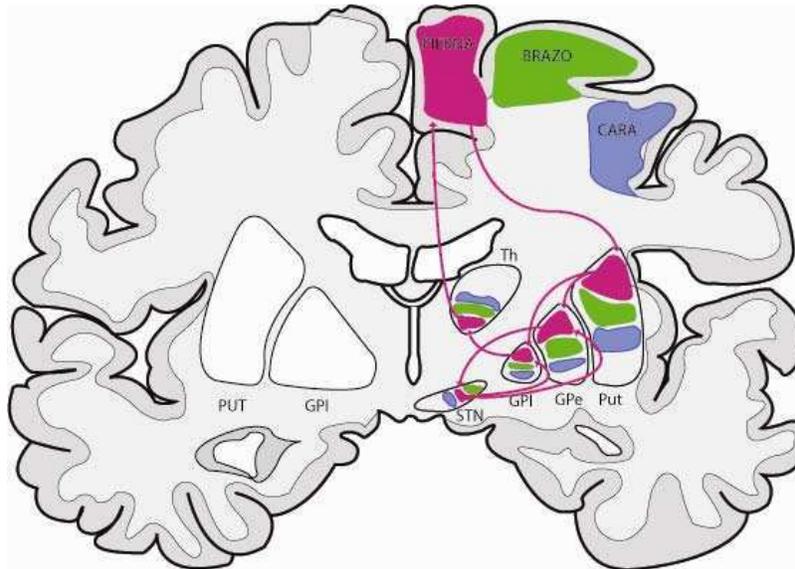


Figura 1. Organización somatotópica de los GB. Los GB están organizados somatotópicamente en un modo que imita la representación cortical del cuerpo. Put: putamen, Th: tálamo, Gpi: globo pálido interno, Gpe: globo pálido externo. *Imagen del laboratorio de Parkinsonismo Experimental, tomada y adaptada de Obeso y col., 2008b.*

b) Vías estriato-palidales

El **estriado** es el núcleo donde converge la información proveniente de diferentes áreas corticales, del hipocampo y de la amígdala (McGeorge y Faull, 1989; Groenewegen y col., 1990), por lo cual ha sido denominado “núcleo de entrada” de la información. Estas proyecciones aferentes conservan una estricta organización topográfica, por lo cual el estriado puede ser dividido funcionalmente en dos compartimentos denominados caudado y putamen. El caudado recibe la información de las áreas límbicas, emotivas y cognitivas, mientras que el putamen procesa la información motora (Alexander y col., 1990). Por otro lado, las neuronas del estriado proyectan sus axones hacia el Gpi y la SNpr, denominados “núcleos de salida” de la información, y éstos a su vez ejercen un control sobre el tálamo y algunas estructuras del tronco encefálico, a través de la liberación del neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA). Como consecuencia de la acción de estos circuitos de control, resultan activados circuitos tálamocorticales que ponen en marcha la actividad motora normal. Paralelamente, el estriado recibe otra aferencia de gran importancia funcional

constituida por los axones de las neuronas de la SNpc, las que, a través de la liberación de dopamina (DA), modulan la actividad neuronal del estriado.

Dentro del estriado más del 90% de las neuronas tiene la característica morfológica de presentar espinas sobre sus dendritas, por lo que se las conoce como neuronas espinosas estríofugales (Wilson y Groves, 1980; Gerfen y Young, 1988). El resto de la población celular del estriado son interneuronas que han sido clasificadas según la expresión de diferentes marcadores neuroquímicos (revisado por Kawaguchi y col., 1995; Mura y col., 2000; Taravini y col., 2005). Sobre las espinas dendríticas de las neuronas estríofugales se forman las sinapsis con las aferencias provenientes de la corteza, de la SNpc y de los axones colaterales de las interneuronas (**Figura 2**). Las neuronas estríofugales son GABAérgicas y, como su nombre lo indica, proyectan sus axones fuera del estriado. Las fibras córticoestriatales, a través de la liberación de glutamato, ejercen un potente efecto excitatorio sobre las neuronas del estriado; esta acción es mediada por receptores para glutamato del tipo AMPA/kainato y NMDA (revisado por Calabresi y col., 1996). Por otro lado, la DA liberada por las terminales axonales de las neuronas de la SNpc modula fuertemente la acción de las aferencias corticales sobre las neuronas estríofugales (Freund y col., 1984; Smith y Bolam, 1990).

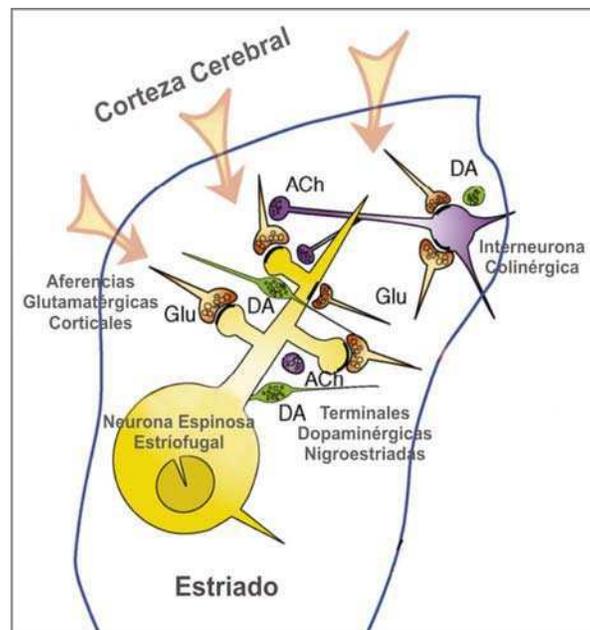


Figura 2: Representación esquemática de los contactos sinápticos sobre las neuronas espinosas estríofugales. Las fibras glutamatérgicas corticales descendentes (naranjas) hacen sinapsis en las cabezas de las espinas dendríticas. Las aferencias dopaminérgicas nígricas (verdes) terminan en el cuello de las espinas dendríticas. Las interneuronas colinérgicas (violeta) hacen contactos en las espinas dendríticas y en las terminales glutamatérgicas. La

acción conjunta de estas conexiones determinan la actividad de las neuronas estriofugales, la que es modulada fundamentalmente por la DA. DA: dopamina, Glu: ácido glutámico, ACh: acetilcolina. *Imagen del laboratorio de Parkinsonismo Experimental, tomada y adaptada de Surmeier y col., 2007.*

El estriado proyecta hacia el GPI a través de dos vías que surgen a partir de dos poblaciones diferentes de neuronas estriofugales y que constituyen circuitos funcionalmente antagonísticos (**Figura 3**).

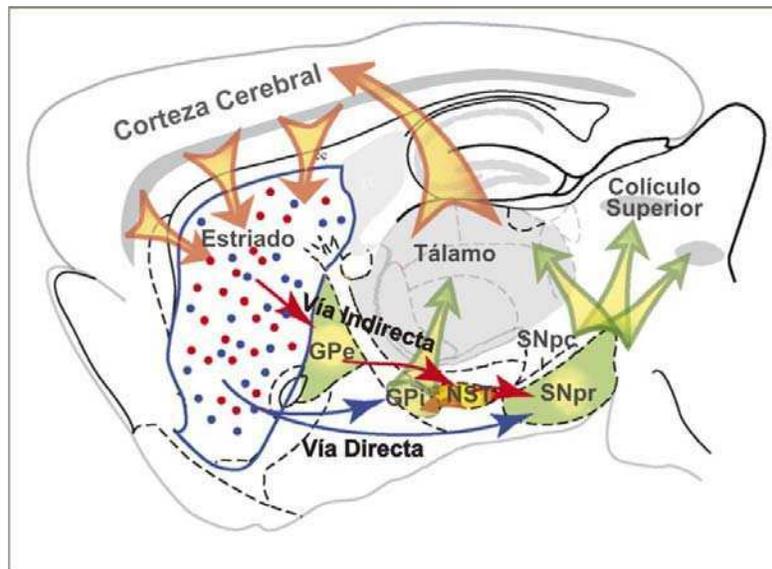


Figura 3: Esquema de las vías directa e indirecta de los GB. Estas vías proyectan desde las neuronas estriofugales del estriado sobre los “núcleos de salida”. Las aferencias excitatorias en el estriado provienen de la corteza cerebral (flechas naranjas) y hacen sinapsis con las neuronas de la vía directa (puntos azules) y de la indirecta (puntos rojos). Las neuronas de la vía directa proyectan sus axones hacia la SNpr y el GPI (flechas azules). Las neuronas de la vía indirecta proyectan sus axones hacia el GPe y las neuronas de este núcleo proyectan hacia el GPI y la SNpr (flechas rojas). *Imagen del Laboratorio de Parkinsonismo Experimental, tomada y adaptada de Surmeier y col., 2007.*

La “vía directa” es monosináptica, las neuronas estriofugales proyectan directamente sobre el GPI o la SNpr. Las neuronas de esta vía constituyen alrededor del 50% de la población de neuronas estriofugales, expresan en su membrana receptores para DA de la familia D1 (RD1) y utilizan como co-transmisor del GABA los péptidos sustancia P y dinorfina. Por otro lado, la “vía indirecta” es polisináptica, constituida por el resto de las neuronas GABAérgicas estriofugales que proyectan hacia el GPe inhibiéndolo, expresan receptores para DA de la familia D2 (RD2) y utilizan como co-transmisor encefalina (Gerfen y col., 1990). Asimismo, las neuronas del GPe envían sus proyecciones GABAérgicas al NST, el que a su vez proyecta inervación estimuladora, a través de la liberación de glutamato, sobre el GPI y la SNpr. Las proyecciones del GPI y la SNpr son GABAérgicas e inervan los núcleos ventral anterior y ventral lateral del

tálamo, entre otros. Las eferencias tálamocorticales son glutamatérgicas y proyectan sobre las áreas sensitivo-motoras corticales (Alexander y Crutcher, 1990).

Los estudios morfológicos de la población celular del estriado no permiten establecer límites regionales dentro de esta estructura dado que las neuronas se distribuyen homogéneamente. Sin embargo, la organización anatómica del estriado es heterogénea. El mismo está formado por regiones llamadas “parches o estriosomas” los cuales se distribuyen a través de la “matriz estriada”. Estos compartimentos también se diferencian por sus características funcionales y bioquímicas. Mientras las neuronas de los estriosomas procesan fundamentalmente información límbica, las neuronas de la matriz procesan la información sensorial-motora (Graybiel, 1990; revisado por Gerfen, 1992). Esta organización topográfica heterogénea permitiría la compleja integración de señales motivacionales, sensoriales y motoras provenientes de aferencias corticales y límbicas (Graybiel y col., 1994).

Dentro del circuito de los GB, la estimulación dopaminérgica tiene un papel fundamental en la regulación de la función de todo el sistema. La DA liberada por las terminales provenientes de la SNpc modula la actividad de las sinapsis córticoestriatales, potenciando o reduciendo la acción del glutamato sobre las neuronas estríofugales. Cuando la DA estimula los RD1 de las neuronas de la vía directa, facilita la acción del glutamato, mientras que cuando actúa sobre los RD2 de las neuronas estríopalidales ejerce un efecto inhibitorio de la neurotransmisión glutamatérgica (Gerfen y col., 1990), resultando en un neto efecto facilitador del movimiento.

c) Eferencias de los GB

Diferentes estudios apoyan el concepto de que la disminución de la actividad de salida de los GB facilita el movimiento mientras que un aumento de la actividad de los mismos lleva a una disminución del movimiento (revisado por Obeso y col., 2008b). Se piensa que el balance dinámico de la estimulación dopaminérgica sobre las vías directa e indirecta de los GB, vías que funcionan de manera opuesta pero complementaria, regula el movimiento (revisado por DeLong y Wichmann, 2007).

La descripción previa sobre los diferentes circuitos por los que transita y se procesa la información en los GB es una forma simplificada de caracterizar dicho

sistema, dado que existen evidencias anatómicas y funcionales que demuestran la complejidad de las interconexiones entre los diferentes núcleos de este sistema. Si bien se acepta que la información procesada en las regiones estriatales motora, cognitiva y límbica, permanece segregada a través de todo el circuito, existe un cierto grado de convergencia e interacción entre dicha información que ingresa al estriado (revisado por Bertran-Gonzalez y col., 2010). Existen evidencias de que cierto número de células estriatales co-expresan ambos tipos de receptores para DA (Aizman y col. 2000; Hasbi y col., 2009); y por otro lado, las neuronas de la vía indirecta tienen también proyecciones “directas” hacia los núcleos de salida. De igual manera, las neuronas de la vía directa tienen proyecciones hacia el GPe (revisado por Smith y col., 1998a; 1998b). Asimismo, se ha postulado que existen proyecciones corticales directas sobre el NST sin pasar por el estriado; si bien estas son cuantitativamente importantes, su significación funcional es poco conocida (revisado por Nambu, 2004). Por último, existirían proyecciones dopaminérgicas desde la *substantia nigra* (SN) hacia el GPe, el GPi y el NST, mientras que el estriado a su vez modificaría la excitabilidad de la SNpc mediante proyecciones estriatonígricas (revisado por Nambu y col., 2002 y por Obeso y col., 2008a, 2008b).

Neurotransmisión dopaminérgica

Las neuronas cuyos somas se encuentran en la SNpc y proyectan sus axones hacia el estriado dan origen a la vía dopaminérgica nigroestriatal. El área donde se ubican estas células se denomina A9 y, junto con las áreas A8, A10 y A12, forman parte del conjunto de vías dopaminérgicas centrales. Como se describió previamente, la vía nigroestriatal regula la función motora mientras que las vías mesocortical, mesolímbica y tuberoinfundibular modulan funciones cognitivas, emocionales y neuroendócrinas, respectivamente (revisado por Lindvall y Bjorland, 1983). El grupo de neuronas A9 presenta características particulares que permiten diferenciarlas del resto de las neuronas adyacentes (A8 y A10). Son células voluminosas, de aproximadamente 33 micrómetros (μm) de diámetro, con largas dendritas que se extienden por la SNpc y por la parte dorsal de la SNpr.

La biosíntesis de DA (como así también de adrenalina y de noradrenalina) se realiza primero por la hidroxilación del aminoácido precursor L-tirosina a L-3,4-di-

hidroxi-fenil-alanina (L-DOPA o levodopa) por acción de la enzima tirosina hidroxilasa (TH). Luego la levodopa es descarboxilada por la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC, también llamada DOPA descarboxilasa o DDC). La velocidad de la síntesis de DA es regulada por la enzima TH que presenta muy baja actividad, convirtiendo a la reacción en la que participa el paso limitante del proceso biosintético.

Una vez que la DA es sintetizada, es transportada dentro de las vesículas pre-sinápticas por medio del transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2) para su almacenamiento, protección y secreción. Cuando un potencial de acción alcanza el terminal nervioso se produce la fusión de las vesículas pre-sinápticas con la membrana plasmática y la consecuente liberación de DA hacia el espacio extracelular. La acción de la DA que se encuentra en el espacio sináptico finaliza por varios procesos que ocurren en forma simultánea. La DA es recapturada por el transportador pre-sináptico de DA (DAT) y también metabolizada por las enzimas monoamino oxidasa (MAO) y/o catecol-O-metil-transferasa (COMT). Por un lado, la DA recapturada puede volver a almacenarse en las vesículas y reutilizarse o puede ser degradada por la MAO, que se encuentra en la membrana externa mitocondrial. La COMT se encuentra en la membrana plasmática de prácticamente todas las células y actúa sobre la DA extracelular (**Figura 4**).

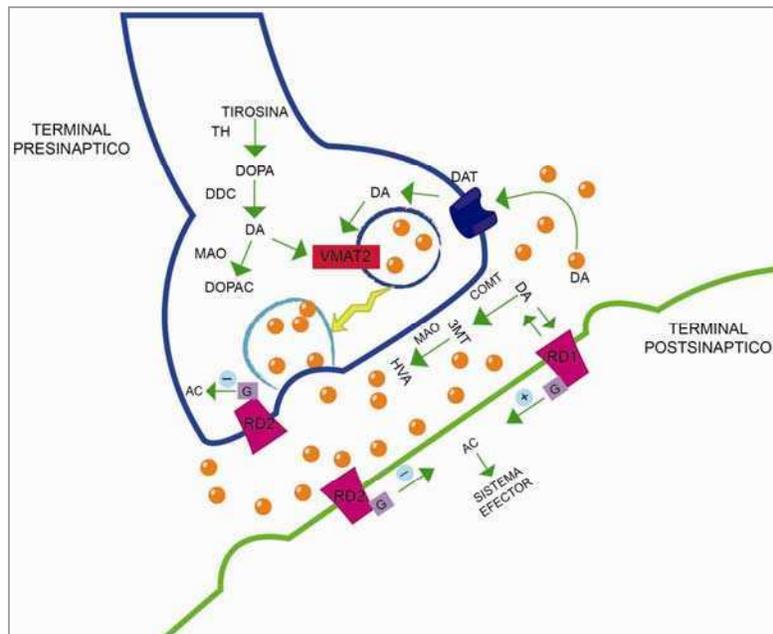


Figura 4: Esquema de la sinapsis dopaminérgica. DA: dopamina; TH: tirosina hidroxilasa; DDC: DOPA descarboxilasa; DAT: transportador de dopamina; VMAT2: transportador vesicular

de dopamina; G: proteína G; AC: adenilato ciclasa; RD1: receptor de dopamina de la familia D1; RD2: receptor de dopamina de la familia D2; DOPAC, 3MT y HVA: metabolitos de la dopamina; MAO y COMT: enzimas metabolizadoras. *Esquema del Laboratorio de Parkinsonismo Experimental.*

La DA ejerce su función a través de la estimulación de los receptores dopaminérgicos D₁, D₂, D₃, D₄, D₅ y sus variantes alélicas. Estos son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G que inicialmente se habían clasificado en dos subtipos, D1 y D2, en función de sus propiedades farmacológicas y sus efectos sobre la enzima adenilato ciclasa (AC). Mientras que los RD1 la activan, incrementando los niveles intracelulares de AMPc, los RD2 ejercen una influencia inhibitoria sobre esta enzima o pueden no estar acoplados a ella. Los receptores del subtipo D₁ y D₅ pertenecen a la familia D1 dado que presentan las propiedades funcionales y farmacológicas mencionadas para los clásicos receptores D1. Por otro lado, los receptores D₂, D₃ y D₄ exhiben las propiedades funcionales y farmacológicas descritas previamente para los clásicos receptores D2 por lo que se los agrupa en la familia D2 (Bunzow y col., 1988; Monsma y col., 1990; Sokoloff y col., 1990; Sunahara y col., 1991; Van Tol y col., 1991). Los RD2 también se localizan en la pre-sinapsis actuando como autoreceptores y regulando la liberación de DA desde la terminal (Goldstein y col., 1990).

Enfermedad de Parkinson

La EP es una afección cosmopolita que afecta al 1% de la población mayor de 65 años de edad. Los pacientes muestran aquinesia o hipoquinesia (ausencia o reducción, respectivamente, de la iniciación de acciones motoras voluntarias), bradiquinesia (ejecución lenta de movimientos), un característico temblor de reposo, rigidez (por aumento del tono de músculos flexores y extensores) y alteraciones de la marcha y la postura (Murer y Gershanik, 2005). Además se presentan signos no motores que comprenden principalmente, disfunción autonómica, trastornos del sueño, complicaciones neuropsiquiátricas, dolor, fatiga, apatía y dificultades motivacionales, las que se agravan con el progreso de la enfermedad.

La EP es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por la pérdida lenta y progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, lo que genera una gradual

disminución de los niveles de DA en el estriado (revisado por Hornykiewicz, 1966). Esta alteración de la transmisión dopaminérgica en el estriado produce un desbalance en el funcionamiento de los GB y tiene como resultado la aparición de los signos clínicos de la EP enumerados anteriormente (**Figura 5**).

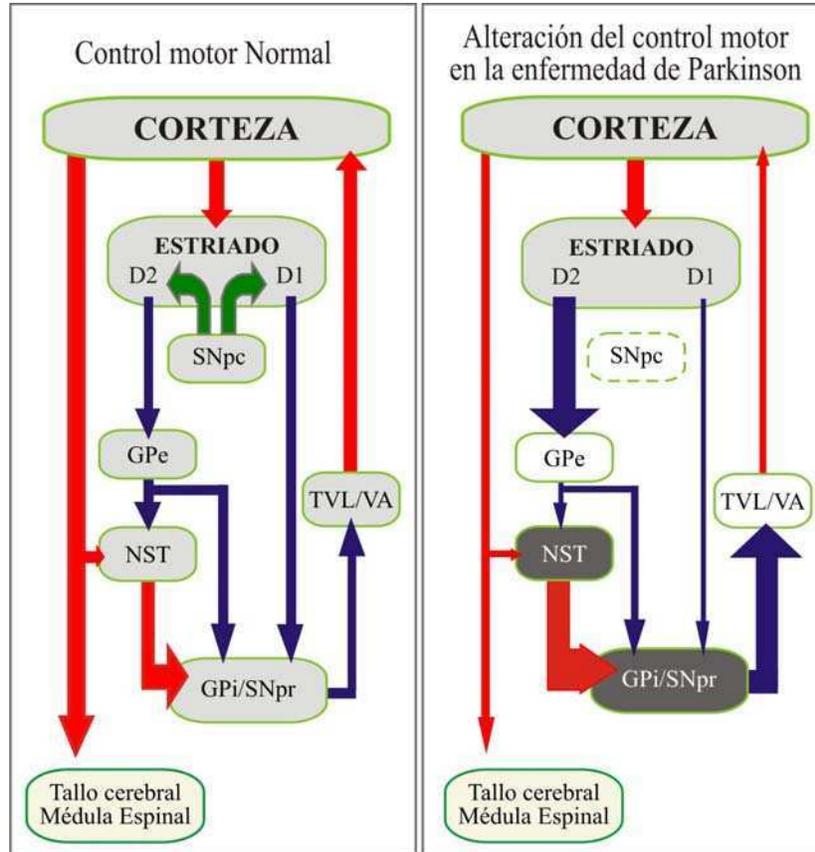


Figura 5: Esquema de los circuitos de los GB en condiciones normales y en el estado patológico que subyace a la EP. La disminución o ausencia del control dopaminérgico sobre las neuronas estriofugales provoca un desbalance en la neurotransmisión GABAérgica de las vías directa e indirecta: la falta de estimulación a través de los RD1 produce una disminución en la señal de la vía directa, mientras que la falta de la inhibición regulada por el RD2 provoca un aumento de la señal de la vía indirecta. La falta de inhibición “directa” y la estimulación del NST resultan en un aumento de la inhibición del tálamo (TVL/VA: tálamo ventral lateral y ventral anterior) y la consecuente disminución de la estimulación cortical. *Flechas rojas:* neurotransmisión glutamatergica; *Flechas azules:* neurotransmisión GABAérgica; *Flechas verdes:* neurotransmisión dopaminérgica. *Imagen del laboratorio de Parkinsonismo Experimental, tomada y adaptada de Albin y col., 1989.*

Sin embargo, además de la disfunción nigroestriatal, se produce un proceso neurodegenerativo con pérdida de células dopaminérgicas en otras áreas encefálicas y sistemas neuronales que involucran otros neurotransmisores, incluyendo la pérdida de células colinérgicas, serotoninérgicas y adrenérgicas (Olanow y Tatton, 1999).

El diagnóstico de la EP puede ser confirmado post mórtem. Las características patológicas de la enfermedad son la pérdida de células dopaminérgicas en la SNpc y la presencia de cuerpos y neuritas de Lewy en poblaciones neuronales vulnerables. Los cuerpos de Lewy son inclusiones citoplasmáticas que ante la tinción con hematoxilina-eosina presentan un centro eosinófilo denso y un halo circundante más claro. El componente principal de los cuerpos de Lewy es α -sinucleína, una pequeña proteína de 140 aminoácidos que se expresa en condiciones normales predominantemente en el neocórtex, el hipocampo, la SN, el tálamo y el cerebelo. Las neuritas de Lewy son procesos de células nerviosas que contienen agregados de α -sinucleína y son más numerosas en la región CA2/3 del hipocampo y en la SN. Ambos elementos se visualizan mediante inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo que reconoce α -sinucleína (Bekris y col., 2010).

Como las neuronas dopaminérgicas sobrevivientes tienen una gran capacidad de compensación, los signos clínicos no se manifiestan hasta que el 50% de ellas degeneró y el contenido de DA estriatal disminuyó un 80% (Fearnley y Lees, 1991; revisado por Stoessl, 2011). Se estima que el proceso degenerativo comienza varios años antes de que se presenten las manifestaciones clínicas, hecho que deja poco margen para la prevención.

Se han propuesto etapas secuenciales de desarrollo topográfico del proceso neurodegenerativo en la EP que serían paralelas al comienzo y al desarrollo gradual de los signos clínicos (Braak y col., 2002). Estas etapas incluyen inicialmente el bulbo olfatorio (lo cual podría explicar el signo temprano de hiposmia) y el núcleo motor dorsal del vago.

Etiología

La causa de la degeneración celular en la SN no ha sido dilucidada aún pero existen varias hipótesis al respecto. Una proporción significativa de enfermos parecería no estar asociada a causas genéticas conocidas y estos enfermos son denominados pacientes idiopáticos o esporádicos. Por otro lado, el 5-10% de los individuos son clasificados como pacientes familiares ya que se sabe que llevan mutaciones hereditarias, asociadas a la EP en una serie de genes llamados genes PARK. La suma de evidencias presentes hasta el momento permite enunciar que el origen de la EP sería la combinación de factores ambientales y genéticos. Respecto de las toxinas ambientales,

se sabe que algunos pesticidas como el paraquat y la rotenona dañan las neuronas dopaminérgicas. Entre las hipótesis que se han postulado, referidas a la causa de la degeneración dopaminérgica, la deficiencia de la actividad mitocondrial (Schapira y col., 1989) y el estrés oxidativo (Jenner, 1991; revisado por Fahn y Cohen, 1992) han centrado la mayor atención en los últimos años. En la SN de los enfermos parkinsonianos, la actividad del complejo I mitocondrial está específicamente disminuida en un 35%. Este defecto del complejo I mitocondrial no se observa en ninguna otra parte del cerebro de estos pacientes (revisado por Schapira, 1993). Además de este defecto de la actividad de las mitocondrias en la EP, hay evidencias sustanciales del daño de proteínas y lípidos mediado por radicales libres en la SN, de la disfunción del sistema proteosoma y de alteraciones inflamatorias. Estos factores son interdependientes y también están reflejados en la naturaleza de las causas genéticas de la EP identificadas hasta la fecha.

En la clínica de la EP, el 5-10% de los casos son de inequívoco origen genético (Nussbaum y Polymeropoulos, 1997). Se han detectado numerosas mutaciones capaces de producir degeneración de las neuronas de la SN. Actualmente se conoce casi una docena de *loci* ligados a la EP, de los cuales ya se han determinado la mayoría de los genes afectados (**Tabla 1**) (revisado por Hardy, 2010), mutaciones de algunos de los cuales también se encontraron en casos esporádicos de la EP.

Mutación	Herencia	Locus	Edad de inicio	Cuerpos de Lewy	Gen
Park1	AD	4q21	40s	Si	α -sinucleína
Park2	AR	6q25	20s	No	Parkina
Park3	AD	2p13	60s	Si	?
Park4	AD	4q21	30s	Si	α -sinucleína
Park5	AD	4p15	50s	Si	UCH-L1
Park6	AR	1p35	30s	?	PINK1
Park7	AR	1p36	30s	?	DJ1
Park8	AD	12p	-	Si/no	LRRK2
Park9	AR	-	-	?	ATP13A2
Park10	AR	1p32	-	?	?
Park11		2q36-37		?	?

Tabla 1: Mutaciones asociadas a la EP de origen genético. AD: autosómica dominante, AR: autosómica recesiva (revisado por Schapira, 2009).

Si bien la función de α -sinucleína en el cerebro es poco conocida, se sabe que las mutaciones o las multiplicaciones del gen que codifica para esta proteína pueden causar una forma genética de la EP. La relación entre α -sinucleína y las formas esporádicas de

la EP está dada por el hecho de que los cuerpos de Lewy están formados por agregados de α -sinucleína fosforilada. En el caso de Parkina, DJ1 y PINK1 (del inglés, *PTEN-induced kinase 1*), éstas se localizan parcialmente en la mitocondria. Parkina, es una ligasa E3 y participa en la vía proteosoma-ubiquitina por medio de la cual α -sinucleína es parcialmente metabolizada. Estudios recientes demostraron que parkina tiene influencia sobre la función mitocondrial. DJ1 es un homodímero que pertenece a la familia de proteínas peptidasas C56. Si bien es una proteína citoplasmática, la misma puede trasladarse a la mitocondria, donde actuaría como antioxidante. Además, podría actuar como una proteína sensor redox y como tal, podría prevenir la agregación de α -sinucleína (Bekris y col., 2010). PINK1 y LRRK2 (del inglés, *leucine-rich repeat kinase 2*) son quinasas. El gen de PINK1 se transcribe de forma ubicua y codifica para una quinasa mitocondrial. En ciertas circunstancias, α -sinucleína estaría internalizada en la matriz y LRRK2 estaría asociada con la membrana externa mitocondrial. Parkina se encuentra localizada corriente abajo de PINK1. Asimismo, HtrA2 (del inglés, *HtrA serine peptidase 2*) es una serin-proteasa, también sustrato de PINK1, que se localiza en la mitocondria y que es liberada al citosol luego de un estímulo apoptótico. Se piensa que HtrA2 induce apoptosis uniéndose a la proteína inhibidora de la apoptosis Xiap (del inglés, *baculoviral IAP repeat-containing 4*) (Shapira, 2006; revisado por Schapira, 2008). Por otro lado, UCH-L1 (del inglés, *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1*) degrada las cadenas de poli-ubiquitina y provee de mono-ubiquitina a la célula. La disfunción de esta proteína se traduce en una disfunción del sistema proteosoma-ubiquitina y, por lo tanto, en una acumulación de agregados de α -sinucleína en el citosol de las células dopaminérgicas (Schulz, 2008). La proteína de la membrana lisosomal ATP13A2 es un miembro de la subfamilia de ATPasas P5, la que participa en el transporte de cationes inorgánicos y otros sustratos. Sin embargo, la función exacta de esta proteína es aún desconocida, así como los genes, y las funciones de los mismos, de las mutaciones PARK3, PARK10 y PARK11 (Schulz, 2008; Bekris y col., 2010).

La relación de las funciones celulares de estas proteínas, y por lo tanto, de estos genes, con el sistema de detoxificación celular ha permitido aproximarse al mecanismo que conduce a la puesta en marcha del proceso neurodegenerativo (Lansbury y Brice, 2002). Estos avances llevaron a los primeros ensayos de inhibición farmacológica del sistema proteosoma. La inhibición de este sistema induce en roedores la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y la formación de cuerpos de

Lewy (McNaught y col., 2002). Más aún, la administración sistémica en roedores de inhibidores de la función proteosomal, tanto sintéticos como naturales, induce la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y, paralelamente, la de otros grupos neuronales que se encuentran también afectados en los pacientes parkinsonianos (McNaught y col., 2004). Este modelo resultó ser poco reproducible (Kordower y col., 2006) y ampliamente debatido. Sin embargo, recientemente, un grupo logró reproducir los resultados del trabajo de McNaught (2004) al administrar el inhibidor proteosomal en el líquido cefalorraquídeo del pez medaka (Matsui y col., 2010). Los inhibidores naturales del proteosoma son producidos por microorganismos y podrían encontrarse en algunos alimentos. Este reciente aporte refuerza la hipótesis propuesta sobre la participación de agentes tóxicos ambientales en la patogénesis de la EP. Como los cuerpos de Lewy también se observan en los casos esporádicos de la enfermedad, se ha sugerido que la misma podría ser causada por una falla adquirida en la función del proteosoma, en personas con alguna predisposición de tipo genético.

Terapéuticas de la enfermedad de Parkinson

Tratamientos actuales

Dado que no existen tratamientos curativos para la EP, actualmente el tratamiento farmacológico está dirigido al mejoramiento de la sintomatología, sin influenciar directamente el proceso patobiológico subyacente (revisado por Murer y col., 1999b). No obstante, la diversidad de fármacos disponibles brinda un significativo alivio sintomático acompañado por una mejoría en la calidad de vida y un aumento de la expectativa de vida de los pacientes aproximándose a la media poblacional.

La terapia sintomática de uso frecuente está dirigida, principalmente, a compensar el déficit dopaminérgico administrando precursores de DA (levodopa), derivados sintéticos o semisintéticos que mimetizan las acciones de la DA a nivel receptorial (agonistas dopaminérgicos) y drogas que potencian, directa o indirectamente, la neurotransmisión dopaminérgica (agentes liberadores de DA, inhibidores de la recaptación neuronal, inhibidores de la degradación enzimática de levodopa o DA) (revisado por Goetz y col., 2005).

Las dificultades emergentes del tratamiento actual (las que se discuten en las secciones correspondientes) llevaron a la búsqueda de nuevas terapias. Además de las netamente farmacológicas sobre los receptores dopaminérgicos, se han desarrollado drogas para manipular otros sistemas de neurotransmisores que participan en el funcionamiento de los GB (por ejemplo, anticolinérgicos y antiglutamatérgicos) (Katzenschlager y col., 2003; Thomas y col., 2004). Asimismo, existe una serie de terapias, en fase experimental, con el objetivo de reparar o revertir la patología subyacente a la EP, como las intervenciones quirúrgicas (revisado por Goetz y col., 2005), la administración de factores tróficos (Rangasamy y col., 2010) y los implantes cerebrales de células embrionarias o células modificadas genéticamente (Olanow y col., 2003).

La forma más difundida de neurocirugía funcional consiste en implantar electrodos para estimular de manera crónica el NST y producir así una “inactivación funcional” del mismo, que restauraría el balance entre las acciones de las vías directa e indirecta. Las lesiones o la inactivación eléctrica del NST o del globo pálido mostraron revertir muchas de las características del parkinsonismo; sin embargo, los pacientes que responden exitosamente (80%) tienen que continuar bajo tratamiento farmacológico, aunque a dosis menores. A las desventajas descritas puede sumarse el riesgo que implica una operación de ese tipo y los costos de la misma (revisado por Betchen y Kaplitt, 2003).

Los factores neurotróficos que regulan la supervivencia y el crecimiento neuronal surgen como los candidatos naturales a la neuroprotección. Una gran variedad de ellos, hallados en diversos sistemas, fueron buscados e identificados en modelos animales de la EP (BDNF, GDNF, NT-3, bFGF y TGF- β) y su acción sobre las neuronas dopaminérgicas fue probada en cultivos de neuronas mesencefálicas (Alexi y Hefti, 1993; Beck y col., 1993; Lin y col., 1993; Nikkah y col., 199; Poulsen y col., 1994; Kriegstein y col., 1995; Studer y col., 1995; Murer y col., 1999a) y en modelos animales de la EP (Hadjiconstatinou y col., 1991; Hagg y Varon, 1993; Altar y col., 1994; Kirik y col., 2000). Recientemente, se han realizado los primeros ensayos clínicos que involucran la administración intracerebroventricular de GDNF (Nutt y col., 2003; Lang y col., 2006) y la administración de neurturina mediante el uso de virus adeno-asociados (Marks y col., 2010). Si bien ambos ensayos demostraron la actividad biológica del factor trófico administrado, aún no se ha podido establecer la eficacia anti-

parkinsoniana de este tipo de terapia. Estudios futuros involucrarían un seguimiento más prolongado de los pacientes, la administración del adeno-asociado directamente en la SN, conjuntamente con dosis mayores en el putamen para obtener un beneficio terapéutico significativo (Marks y col., 2010).

Respecto a las terapias de reemplazo celular, se han realizado una amplia variedad de ensayos tanto en modelos animales como en pacientes (Dunnett y col., 2001; Björklund y col., 2003; Mochizuki y Mizuno, 2003), en los cuales si bien se observó sobrevida del implante celular, arborización neuronal, expresión de TH y síntesis de DA por parte de las células implantadas (Lindvall y col., 1990; Kordower y col., 1995, 1998; Piccini y col., 1999; Olanow y col., 2001), algunos ensayos clínicos debieron suspenderse abruptamente debido al desarrollo de severos efectos adversos en algunos de los pacientes transplantados (Freed y col., 2001; Hagell y col., 2002; Olanow y col., 2003).

A pesar de los importantes avances, ninguna de ellas logró imponerse como terapia de elección, requiriendo todavía una substancial investigación y un esfuerzo mayúsculo en el estudio sobre los beneficios proporcionados por todas ellas. De la experiencia recolectada hasta el momento se desprende que:

1) Mientras no se demuestre fehacientemente la eficacia de una terapia alternativa al uso de levodopa o agonistas dopaminérgicos, éstas continúan siendo las drogas de elección en la terapéutica anti-parkinsoniana, y por lo tanto, el estudio de los mecanismos adaptativos como respuesta a una terapia crónica con dichos fármacos continúa siendo un tema de relevante interés científico.

2) La postura actual respecto a la búsqueda de terapias alternativas a la farmacología clásica es la combinación de ellas potenciando las ventajas de cada una, es decir que las investigaciones se centraron en torno al mejoramiento de los enfoques ya conocidos. Para ello resulta trascendente un conocimiento profundo de los mecanismos biológicos que regulan la sobrevida, el rebrote de las neuronas dopaminérgicas y el medio ambiente celular que favorece cada fenómeno.

A pesar del importante avance logrado en la terapéutica anti-parkinsoniana, aun subsisten varios problemas a resolver, relacionados principalmente con los cambios progresivos y desconocidos del sistema dopaminérgico dañado, la progresión de la

enfermedad y la administración de fármacos poco selectivos que provocarían cambios en el estado de equilibrio (interacciones) entre los distintos receptores de DA y fallas en el control motor (efectos colaterales indeseables tales como los movimientos involuntarios anormales). Estos cambios constituyen las adaptaciones del sistema nigroestriatal ante la desnervación progresiva como así también ante la exposición crónica a fármacos. Este es un punto central en las investigaciones actuales relacionadas con la terapéutica de la EP.

La terapia con levodopa

El descubrimiento de Carlsson y colaboradores (1957) demostrando que la levodopa puede revertir la aquinesia inducida por la depleción de catecolaminas en el ratón y la demostración de Ehringer y Hornykiewicz (1960) de una deficiencia de DA estriatal en esta enfermedad, sentaron las bases para los primeros ensayos terapéuticos con 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) (Birkmayer y Hornykiewicz, 1962). Posteriormente Cotzias y colaboradores (1967) mostraron que el tratamiento crónico oral con D, L-DOPA presentaba efectos anti-parkinsonianos, estableciendo las bases de la farmacoterapia moderna de la EP. Sin embargo, poco tiempo después Cotzias (1969) y otros describieron los principales efectos adversos del tratamiento, que incluyen movimientos involuntarios y fluctuaciones en la respuesta motora y que continúan siendo una complicación mayúscula en la terapia anti-parkinsoniana, limitando de manera significativa su efectividad.

La levodopa es descarboxilada a DA en el sistema nervioso central por las neuronas remanentes y probablemente por otros mecanismos. Como la levodopa también puede ser descarboxilada y transformada en noradrenalina y adrenalina en el sistema nervioso periférico, se la co-administra con un inhibidor de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos que no puede atravesar la barrera hematoencefálica (carbidopa o bencerasida), y, por lo tanto, no afecta a la descarboxilación central de la levodopa.

El efecto terapéutico de la levodopa parece ser el resultado de dos acciones diferentes. Primero, la levodopa produce una respuesta de corta duración (RCD), que se prolonga de 2 a 3 horas y que decae conjuntamente con la concentración de levodopa en plasma. La misma sería producida por la ocupación de receptores centrales (principalmente estriatales) para DA. En segundo lugar, produce una respuesta de larga duración (RLD), que sólo se aprecia plenamente después de la administración repetida y

tiene una vida media de varios días. Ya en sus primeras publicaciones, Cotzias y colaboradores (1969) observaron la presencia de la RLD, la cual se extiende de 4 a 11 días. La RLD aumenta gradualmente durante el tratamiento crónico hasta llegar a una meseta y declina lentamente cuando el mismo se interrumpe de forma abrupta; en este caso los pacientes tardan varios días en alcanzar su “línea de base”, en cuanto a los signos clínicos se refiere (Nutt y col., 1997). La RLD contribuye sustancialmente al efecto terapéutico de la levodopa en estadios tempranos de la enfermedad, y reduce las fluctuaciones en la respuesta motora dependiente de los cambios rápidos en la concentración plasmática que ocurren cada vez que la levodopa es administrada. Si bien la magnitud de la RLD declina con la progresión de la enfermedad, contribuye a la mejoría clínica aún en pacientes de larga evolución y severamente afectados. Debido a esto, se ha propuesto que maximizando la RLD mientras se reduce la RCD debiera incrementarse el beneficio obtenido por el tratamiento (revisado por Nutt, 2000). Si bien los mecanismos que producen la RLD no han sido clarificados, durante años se ha propuesto que esta respuesta es sostenida por el almacenamiento de levodopa/DA en un compartimiento intracerebral, probablemente las terminales pre-sinápticas dopaminérgicas. Sin embargo, trabajos posteriores sugieren que la RLD se origina a partir de cambios farmacodinámicos post-sinápticos (Barbato y col., 1997; Nutt y Carter, 2000). Como la magnitud de la RLD disminuye durante el curso de la enfermedad, los pacientes fluctúan entre estados de actividad (*on*) y estados aquinéticos (*off*), que reflejan claramente la RCD (revisado por Obeso y col., 2000).

Aunque la levodopa es muy eficaz para revertir los signos clínicos de los enfermos, después de algunos años de tratamiento más del 50% de ellos desarrolla complicaciones motoras (principalmente movimientos involuntarios anormales llamados “disquinesias”), que en ocasiones resultan sumamente incapacitantes. Los factores que aumentan la probabilidad de riesgo para el desarrollo de estas complicaciones incluyen la temprana edad de aparición de los signos clínicos, la severidad de la enfermedad y altas dosis de levodopa (Linazasoro, 2005). Los cambios moleculares y celulares involucrados en el desarrollo de los efectos colaterales de la terapia anti-parkinsoniana no han sido clarificados aún. El desarrollo de las disquinesias dependería principalmente de dos factores: i) el régimen de administración pulsátil de levodopa o agonistas dopaminérgicos, y ii) el grado de desnervación dopaminérgica, que aparece como determinante del umbral en la aparición de las mismas. Además, se

observó que los fármacos que estimulan directamente los RD2 son menos eficaces para controlar los signos clínicos de la enfermedad, pero provocan menos disquinesias (Parkinson Study Group: PSG, 2000; Holloway y col., 2004; PSG, 2009). En base a los datos de la farmacología clínica, se dedujo que los mecanismos que inducen las complicaciones motoras son principalmente post-sinápticos, involucran la estimulación RD1 y un estado "hiperglutamatérgico" y son favorecidos por la falta de terminales dopaminérgicas pre-sinápticas (revisado por Obeso y col., 2000; por Rascol, 2000a, 2000b). Datos recientes, pre-clínicos y clínicos, provenientes de prometedoras líneas de investigación enfocadas en estudiar la patofisiología de las disquinesias inducidas por levodopa hacen hincapié en el rol diferencial de los mecanismos pre-sinápticos versus los post-sinápticos, en los subtipos de receptores para DA, en los receptores para glutamato, ionotrópicos y metabotrópicos, y en los sistemas de neurotransmisores no dopaminérgicos (revisado por Calabresi y col., 2010).

Las opciones farmacológicas para el manejo de las disquinesias inducidas por levodopa severas involucran la administración continua de apomorfina subcutánea, de levodopa intraduodenal y la administración oral de amantadina (antagonista glutamatérgico no específico). Otra terapia eficiente para tratar las disquinesias inducidas por levodopa es el tratamiento quirúrgico del Gpi o del NST [(por ejemplo, la palidotomía o la estimulación cerebral profunda bilateral (DBS, del inglés, *deep brain stimulation*)] (revisado por Voon y col., 2009).

Agonistas dopaminérgicos: la terapia con pramipexol

La otra línea de tratamiento de la EP corresponde a la de los agonistas dopaminérgicos. Estos poseen algunas ventajas sobre la administración de levodopa: i) estimulan directamente los receptores dopaminérgicos post-sinápticos, sin la necesidad de modificación metabólica, liberación o almacenamiento por parte de las neuronas remanentes de la SN; ii) no requieren conversión enzimática a DA por enzimas como la AADC cuya actividad disminuye con el avance de la enfermedad y con la edad; iii) no compiten con los aminoácidos plasmáticos por la absorción y transporte intestinal y cerebral; iv) su metabolismo no genera radicales libres y v) tienen vidas medias plasmáticas más prolongadas (revisado por Radad y col., 2005).

Existen agonistas naturales, sintéticos y semisintéticos. Los más importantes se dividen en dos grupos: los derivados ergolínicos (por ejemplo, bromocriptina,

pergolida, lisurida, cabergolina) y los derivados no-ergolínicos (por ejemplo, ropinirol, rotigotina y pramipexol). Estos presentan algunas diferencias en cuanto a la capacidad de activar a los distintos tipos de receptores de DA, como así también en las vidas medias plasmáticas. Todos ellos tienen la capacidad de estimular a los receptores de DA produciendo un efecto anti-parkinsoniano y suplantando las acciones de la DA (Olanow y col., 2000). Todos los agonistas dopaminérgicos desarrollados para uso en la EP tienen actividad principalmente sobre los RD2, sin embargo, ninguno de los agentes disponibles es selectivo de un único subtipo de receptor de DA. Los agonistas presentan además acciones variadas sobre otros receptores de DA como así también sobre receptores de serotonina y de noradrenalina.

La racionalidad para el uso de agonistas dopaminérgicos en monoterapia en etapas tempranas de la enfermedad es retrasar el inicio del tratamiento con levodopa o disminuir la exposición total a levodopa, reduciendo las complicaciones motoras asociadas a ella. Sin embargo, la monoterapia con agonistas dopaminérgicos no parece ser útil como tratamiento a largo plazo para la mayoría de los pacientes, aún a pesar de producir pocas fluctuaciones motoras y/o disquinesias. Esto es debido a su menor eficacia anti-parkinsoniana, hecho que se refleja en una menor capacidad para revertir los signos clínicos en estadios avanzados de la enfermedad. Los agonistas dopaminérgicos hoy en día son usados como tratamiento inicial de la EP, seguidos más tarde por la adición de levodopa o también, en combinación temprana con la misma (revisado por Ogawa, 1998 y por Schapira, 2007).

Es bien sabido que la estimulación de los RD2 alivia la deficiencia motora y los síntomas de la EP en pacientes y modelos animales, pero a la vez una buena respuesta terapéutica parece requerir la estimulación simultánea de ambos tipos de receptores, RD1 y RD2. Sin embargo, existe gran controversia acerca del rol de los RD1 en el tratamiento de la EP. La activación de estos receptores también parece ser importante en términos de la producción y manipulación de las disquinesias (Berthet y Bezard, 2009).

Pramipexol es un agonista dopaminérgico sintético perteneciente al grupo de los derivados no-ergolínicos (**Figura 6**). Se introdujo en la clínica de la EP en 1997 y hoy es uno de los agonistas de primera elección. Es un potente agonista de los RD2 (Mierau

y Schingnitz, 1992; Mierau y col., 1995), con una mayor afinidad por los receptores D₃ (Gerlach y col., 2003).

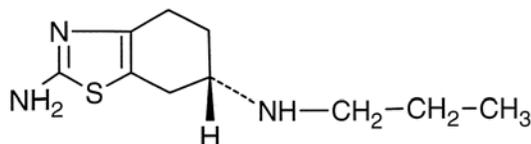


Figura 6: Molécula de pramipexol.

Pramipexol presenta una vida media plasmática más prolongada que levodopa (Hubble y Novak, 2001) (**Tabla 2**). Éste ha demostrado ser eficaz en mejorar la función motora tanto en monoterapia (Guttman y col., 1997; Shannon y col., 1997) como en combinación con levodopa (Poewe y col., 2007; PSG, 2007). Como monoterapia existen evidencias de que pramipexol tiene una eficacia comparable a la terapia con levodopa en etapas tempranas de la EP, sin inducir disquinesias (Holloway y col., 2004). En combinación con levodopa, pramipexol redujo la duración de los períodos *off* y mejoró los períodos *on*, con menor inducción de disquinesias (Poewe y col., 2007; PSG, 2009).

Agonista	Vida media plasmática (horas)	Afinidad por receptores de DA
Levodopa/carbidopa	1 a 1,5	Todos
Pramipexol	8 a 12	D ₃ > D ₂ > D ₄ (específico familia D2)

Tabla 2: Vida media plasmática y afinidad receptorial de levodopa y de pramipexol.

Estudios realizados tanto en modelos animales (Willner y col., 1994; Maj y col., 1997) como en pacientes (Corrigan y col., 2000; Kano y col., 2008) demostraron que pramipexol es especialmente efectivo en mejorar la depresión.

Existen evidencias preclínicas, en modelos *in vitro* e *in vivo*, de que pramipexol posee acciones neuroprotectoras sobre las neuronas dopaminérgicas (revisado por Constantinescu, 2008). Estas acciones se producirían por distintos mecanismos. Éstos se han relacionado con sus propiedades antioxidantes (Vincenzi y Hinds, 1998; Zou y col., 1999; Ferger y col., 2000; Le y col., 2000) y con la inhibición de mecanismos apoptóticos (Cassarino y col., 1998; Kitamura y col., 1998; Abramova y col., 2002). En modelos animales de parkinsonismo, pramipexol ha sido asociado a una disminución de la pérdida neuronal dopaminérgica secundaria a tóxicos (Hall y col., 1996; Iravani y

col., 2006). Además, se ha demostrado que pramipexol estimula la producción de un factor neurotrófico dopaminérgico en cultivos tisulares (Carvey y col., 2001) y que produce un aumento de la expresión del gen y de los niveles de la proteína Nurr1 (Pan y col., 2005). Sin embargo, la interpretación de los datos pre-clínicos se vio obstaculizada debido a las diferencias entre los distintos modelos y por las limitaciones de cada uno para remedar los signos de la EP. Por último, la mayoría de los protocolos requiere el tratamiento con altas concentraciones de pramipexol previo a la administración del factor de neurodegeneración. Según estudios de neuroimágenes en humanos, pramipexol redujo la velocidad de pérdida de marcadores de la función dopaminérgica (PSG, 2002).

Fármacos dopaminérgicos e inducción de la expresión génica

La RLD del tratamiento con levodopa y la aparición de complicaciones motoras como las disquinesias involucrarían, entre otros, cambios profundos en la expresión de genes. Estudios realizados en modelos animales de la EP están comenzando a dilucidar los mecanismos moleculares que conducen al desarrollo de cambios en el comportamiento durante la administración repetida de levodopa (revisado por Canales y Graybiel, 2000b; Westin y col., 2001).

Existe un gran número de estudios en los que se han analizado los efectos de la estimulación dopaminérgica aguda y crónica sobre la regulación génica en las neuronas estriatales de ratas hemiparkinsonianas. Por ejemplo, la administración aguda de levodopa o de agonistas D1 induce una *up-regulation*¹ transitoria de varios genes tempranos inmediatos (IEG, del inglés, *immediate early genes*) en el estriado desnervado (Morelli y col., 1993). Por el contrario, la estimulación crónica de los receptores para DA (por la administración repetida de levodopa o de psicoestimulantes) dispara modificaciones de larga duración de otros genes, como Δ FosB (Andersson y col., 1999), los neuropéptidos estriatales dinorfina y encefalina (Cenci y col., 1998), así como de varios genes relacionados con plasticidad y citoarquitectura

¹ El término *up-regulation* se refiere a un efecto regulatorio positivo sobre procesos fisiológicos, a nivel molecular, celular o sistémico. A nivel molecular, los sitios principales de regulación incluyen los receptores de membrana, los genes (regulación de la expresión), los ARNm y las proteínas.

(revisado por Nestler, 2001; Sgambato-Faure y col., 2005). En las neuronas estriatales de animales con lesiones de la vía nigroestriatal con 6-OHDA, la administración crónica de levodopa está asociada a la sobre-expresión del ARNm de pre-prodinorfina y de la descarboxilasa de glutamato (Cenci y col., 1998). Asimismo, en un trabajo previo de nuestro grupo, demostramos que el tratamiento por 6 meses con levodopa de ratas con lesiones de la vía nigroestriatal con 6-OHDA modificó la expresión de múltiples genes en el estriado lesionado. Entre ellos fueron identificados genes relacionados con mecanismos neurotróficos y de plasticidad, como el factor neurotrófico pleiotrofina (PTN), MBP (del inglés, *myelin basic protein*) y calmodulina (Ferrario y col., 2004).

Numerosos estudios han demostrado, en modelos animales de disquinesias, alteraciones moleculares persistentes, notablemente relacionadas con la señalización dopaminérgica y glutamatérgica, que ocurren en el estriado y que están íntimamente involucradas tanto en la aparición como en la severidad de las disquinesias (revisado por Chase, 2004; por Jenner, 2008). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se enfocaron en el análisis de la expresión de uno o dos genes en particular y no permitieron tener una visión completa de las alteraciones bioquímicas y moleculares que subyacen al fenómeno de cebamiento² (en inglés, *priming*) de levodopa y de las disquinesias inducidas por la misma. Recientemente, se ha publicado una serie de trabajos en modelos animales de disquinesias, en los cuales se utilizaron tecnologías de análisis masivo de genes o proteínas con el fin de develar los mecanismos moleculares que subyacen al desarrollo de estos movimientos involuntarios anormales inducidos por la administración de levodopa u otros agonistas dopaminérgicos (Konradi y col., 2004; Valastro y col., 2007).

En conjunto, los datos arriba presentados indican que la estimulación repetida de receptores para DA puede inducir cambios sostenidos en el comportamiento y en la expresión de genes, tanto en animales con lesiones nigroestriatales como en animales normales.

Modelos animales de la EP y pruebas de evaluación conductual

² El término cebamiento (en inglés, *priming*) se refiere al fenómeno que involucra la modificación de una respuesta frente a un estímulo debido a la exposición previa al mismo.

Existen diferentes modelos animales de la EP que se utilizan habitualmente en investigación básica (revisado por Beal, 2001; por Schober, 2004; por Dawson y col., 2010). En nuestro laboratorio tradicionalmente hemos trabajado con un modelo de rata con lesión unilateral de la vía nigroestriatal, inducida por la administración intracerebral de 6-OHDA (Gershanik y col., 1983, Murer y col., 1998; Ferrario y col., 2003; Delfino y col., 2004; Ferrario y col., 2004; Larramendy y col., 2008, Taravini y col., 2011). La lesión unilateral involucra la administración del neurotóxico en un solo hemisferio cerebral. Este tipo de lesión es la más utilizada ya que un animal con una lesión bilateral tiene menos probabilidades de sobrevivir a la cirugía y, de lograrlo, necesita cuidados especiales. Además, este tipo de lesiones permite comparar en el mismo animal efectos fisiológicos y comportamentales en el hemisferio ipsilateral en relación al hemisferio contralateral a la lesión (revisado por Schwarting y Huston, 1996a, 1996b). El sitio de inyección de la 6-OHDA puede variar según los propósitos de la investigación, siendo la SN (Ungerstedt y Arbuthnott, 1970), el *mfb* (Gershanik y col., 1983) o el cuerpo estriado (Berger y col., 1991) los sitios más ampliamente utilizados. El estriado es un núcleo grande y la administración de 6-OHDA permite obtener lesiones selectivas y moderadas del sistema nigroestriatal, circunscriptas regionalmente (Przedborski y col., 1995). La administración de 6-OHDA en el estriado causa degeneración retrógrada de las terminales dopaminérgicas y cambios en sitios distantes del área manipulada, como es la SN (Berger y col., 1991; Ichitani y col., 1991; Sauer y Oertel, 1994). Este modelo permite estudiar los cambios que suceden en el estriado lesionado (que puede incluir las terminales axónicas dopaminérgicas remanentes, dependiendo de la severidad de la lesión) como consecuencia de los tratamientos farmacológicos en estudio. El estriado ha sido descrito como un núcleo donde tienen lugar fenómenos plásticos en respuesta a la desnervación de las terminales dopaminérgicas de las neuronas de la SN (Anglade y col., 1996; Ingham y col., 1998; Gerfen y col., 2002) y a la administración de fármacos (Ferrario y col., 2004; Belujon y col., 2010). Muchos de estos cambios estarían involucrados en el desarrollo de los movimientos involuntarios anormales (revisado por Picconi y col., 2005; por Cenci y Lundblad, 2006). Además, según la dosis administrada del neurotóxico, se pueden obtener lesiones moderadas o severas de la vía dopaminérgica nigroestriatal, que puede determinarse, por ejemplo, cuantificando el porcentaje de células dopaminérgicas remanentes en la SN mediante inmunohistoquímica para TH. Así, un porcentaje de células remanentes TH inmunoreactivas (TH-ir) del 1-5% indica un daño completo, total de la vía, del 10-20%

un daño severo y mayor al 20% un daño moderado (revisado por Schwarting y Huston, 1996a). Un daño moderado implica que persista cierta proporción de la población de células dopaminérgicas en la SN luego de la neurodegeneración inducida por la administración de 6-OHDA, concomitantemente con la supervivencia de sus terminales axónicas en el cuerpo estriado. Además, una degeneración moderada simula etapas tempranas de la EP y esto se relaciona directamente con la eficacia terapéutica de algunos fármacos anti-parkinsonianos. Por ejemplo, la eficacia anti-parkinsoniana del tratamiento con agonistas dopaminérgicos, como es el caso de pramipexol, disminuye a medida que progresa la enfermedad, es decir, a medida que la neurodegeneración es mayor (revisado por Schapira, 2007).

El daño unilateral de la vía nigroestriatal en roedores causa deficiencias crónicas en la función somatosensorial y en el uso de la pata delantera contralateral (PDC). Tales asimetrías sensorimotoras pueden ser fácilmente cuantificadas utilizando pruebas conductuales simples, confiables y sensibles. Existen numerosas pruebas comportamentales para evaluar los efectos funcionales de la desnervación dopaminérgica, algunas involucran la administración de drogas, la manipulación directa del animal por parte del investigador, o la evaluación de conductas espontáneas, entre otras (revisado por Mokrý, 1995; Olsson y col., 1995; Schallert y col., 2000; Whishaw y col., 2008). Entre ellas destacaremos la *prueba del cilindro* (PC) (Schallert y col., 2000) y la *prueba de pasos de ajuste* (PPA) (Olsson y col., 1995), las cuales evalúan la habilidad en el uso de la PDC. La primera evalúa una conducta espontánea y la segunda una conducta “forzada”, con intervención directa del investigador. Estas pruebas son utilizadas de rutina en nuestro laboratorio (ver *Consideraciones preliminares, Capítulo I*).

Breve introducción al análisis de la expresión masiva de genes

Desde el descubrimiento de los mecanismos de transcripción y traducción, el análisis de la expresión de los genes, ya sea a nivel del ARNm o a nivel de proteínas, se convirtió en una metodología de estudio de utilización ineludible en todas las áreas biológicas. El estudio de la expresión de genes involucra una gran variedad de métodos, entre ellos los microarreglos de ADN para el análisis de expresión del ARNm. Esta

técnica es una herramienta poderosa para estudiar la actividad de una enorme cantidad de genes simultáneamente, permitiendo obtener conclusiones sobre las funciones y la importancia de genes específicos y vías moleculares, en distintas condiciones fisiológicas y celulares (revisado por Walker y Hughes, 2008). No obstante, los experimentos de microarreglos son en general complejos, generan una inmensa cantidad de datos y requieren un planeamiento cuidadoso.

Un gran número de estudios ha examinado la regulación de genes en modelos animales (Bassilana y col., 2005; Pattarini y col., 2008; Na y col., 2010; Zhou y col., 2011) y en tejidos *postmortem* de pacientes con EP (Grünblatt y col., 2004; Hauser y col., 2005; Duke y col., 2006; Miller y col., 2006; Moran y col., 2006; Vogt y col., 2006; Duke y col., 2007; Moran y Graeber, 2008; Simunovic y col., 2010) usando la técnica de microarreglos y se han demostrado cambios en la expresión de numerosos genes. Otra serie de trabajos ha analizado el efecto del tratamiento con levodopa sobre la expresión de genes (Ferrario y col., 2004; Konradi y col., 2004; El Atifi-Borel y col., 2009; Grünblatt y col., 2010) y sobre el proteoma (conjunto de proteínas expresadas en un momento dado bajo una determinada condición) (Valastro y col., 2007; Scholz y col., 2008) y su relación con el desarrollo de disquinesias. Por otro lado, poco se sabe sobre los efectos subcelulares que podría inducir el tratamiento prolongado con pramipexol y, hasta la fecha, desconocemos la existencia de trabajos publicados sobre el estudio de la expresión masiva de genes bajo efecto de pramipexol.

A pesar de la gran cantidad de datos que se obtienen de este tipo de experimentos, el análisis de los mismos representa un gran desafío necesario para entender la complejidad del sistema biológico relacionado con los genes identificados. Por lo tanto, mientras muchos estudios han identificado un número sustancial de genes con expresión diferencial relacionados con un proceso celular, el poder comprender la relevancia de estos cambios sobre un proceso biológico específico es aún una tarea limitada. Por ello, el esfuerzo constante de la comunidad científica y el trabajo en conjunto con expertos en el tema son absolutamente necesarios. Así podremos obtener la mayor cantidad de información biológica a partir de un número tan importante de datos valiosos, producto de un único experimento. En este trabajo utilizamos el recurso bioinformático DAVID para el análisis de ontología de genes y la visualización de las vías KEGG enriquecidas (ver *Consideraciones preliminares, Capítulo III*).

El uso de fármacos en la terapéutica de la EP es la modalidad de tratamiento predominante y de largo plazo. Se sabe que los mismos, administrados durante períodos prolongados, son capaces de modificar la expresión de genes. En vista de las diferencias farmacológicas y de las diferencias clínicas, tanto en su efecto anti-parkinsoniano como en los efectos adversos o colaterales, entre levodopa y los agonistas dopaminérgicos D2, como pramipexol, resulta relevante analizar la influencia de estos fármacos sobre la expresión de genes. El identificar qué genes ven modificada su expresión frente al tratamiento con levodopa y con pramipexol, además de aportar al conocimiento general, ayudaría a comprender los factores que subyacen a las diferencias antes mencionadas. La herramienta que elegimos para llevar a cabo este objetivo es la de los microarreglos de ADN. A pesar del espectacular avance que promete el estudio masivo de genes, éste resulta solo el punto de partida para el estudio de hipótesis funcionales. El estudio masivo de genes no es la demostración de una hipótesis, pero en cambio es el disparador de múltiples hipótesis experimentales. Esta suerte de fotografía permitirá “ver” los elementos conocidos que se esperarían encontrar, pero también elementos novedosos e inesperados. Tal vez sea éste el aporte más importante del estudio masivo de la expresión génica.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Ante la falta de conocimiento respecto de los cambios moleculares que subyacen al uso prolongado de los fármacos anti-parkinsonianos, nos propusimos estudiar los efectos y adaptaciones a nivel génico inducidos por levodopa y pramipexol sobre el estriado desnervado en un modelo animal de la EP. Levodopa y pramipexol son dos fármacos anti-parkinsonianos de amplio uso en la clínica de la enfermedad, cuyos efectos farmacológicos, funcionales y moleculares presentan diferencias y similitudes.

Levodopa y pramipexol son fármacos que ejercen su acción farmacológica por mecanismos diferentes. Levodopa es el precursor en la vía de síntesis de DA y como tal estimula todos los subtipos de receptores para DA. En cambio, pramipexol es un agonista de los RD2 y como tal estimula únicamente los receptores para dopamina D₂, D₃ y D₄, con especial preferencia por los D₃. Sin embargo, a pesar de estas diferencias, ambos fármacos son capaces de controlar los signos motores de la EP con una eficacia similar en etapas tempranas de la misma. La eficacia anti-parkinsoniana de pramipexol disminuye a medida que progresa la neurodegeneración.

Por otro lado, los movimientos involuntarios anormales como las disquinesias constituyen el principal efecto adverso de la terapia con levodopa y en la mayoría de los casos limitan la continuidad del tratamiento. En el caso de los agonistas dopaminérgicos D2 se ha descrito una menor inducción de disquinesias, tal como ha sido reportado para pramipexol.

Por último, existe una gran controversia en cuanto a si levodopa tiene un efecto tóxico sobre las neuronas dopaminérgicas remanentes en la SN. Nuestro grupo ha publicado una serie de trabajos en los cuales probamos que, por el contrario, levodopa produce una recuperación de marcadores dopaminérgicos en ratas lesionadas con 6-OHDA. Por otro lado, a pramipexol se le han atribuido efectos neuroprotectores, los que ejercería a través de diferentes mecanismos. Sin embargo, no hay estudios en la clínica de la EP que avalen estos hallazgos experimentales.

En base a las evidencias arriba expuestas nos preguntamos...

...¿Qué genes se expresan con cada tratamiento?

...¿Estos efectos farmacológicos, funcionales y moleculares del tratamiento con levodopa y con pramipexol se ven reflejados en la expresión de genes?

...Y, de ser así, ¿el tratamiento con ambos fármacos resulta en la expresión de los mismos genes para el caso de las similitudes o de genes diferentes para el caso de las diferencias?

¿Cuál es el mejor modelo animal de la EP para responder a estas preguntas? En primer lugar, este modelo debe presentar deficiencias comportamentales claramente cuantificables, las cuales posteriormente permitan evaluar la eficacia terapéutica de los fármacos en estudio y de esta manera determinar las dosis de los mismos. En segundo lugar, una pérdida moderada de neuronas dopaminérgicas en la SN simula estadios tempranos de la enfermedad y por lo tanto, estadios donde en la clínica pramipexol genera una efectiva respuesta terapéutica. Además, permite estudiar fenómenos de plasticidad los que han sido relacionados con los mecanismos de inducción y desarrollo de disquinesias. Por todo esto, nos propusimos, como primer objetivo, desarrollar y caracterizar un modelo animal con lesión moderada unilateral inducida por la administración de 6-OHDA en el núcleo estriado de ratas adultas.

El siguiente paso consistió en establecer un protocolo de administración de los fármacos. Esperamos que las dosis de los fármacos elegidas produzcan una mejoría de las deficiencias comportamentales inducidas por la desnervación dopaminérgica y además, que dicha respuesta terapéutica sea similar entre levodopa y pramipexol.

Por último, para estudiar los efectos y adaptaciones a nivel de expresión de genes inducidos por los tratamientos farmacológicos, se utilizará la tecnología de los microarreglos de ADN, la que permite evaluar la expresión de miles de genes simultáneamente. Esperamos que los genes cuya expresión sea inducida en el estriado desnervado de aquellos animales en los que el tratamiento a largo plazo resulte efectivo, den indicios sobre su relación con: i) el/los mecanismo/s por el cual los fármacos ejercen su acción farmacológica, ii) la respuesta anti-parkinsoniana, iii) los mecanismos

de neuroprotección/indemnidad celular y/o iv) los cambios moleculares que subyacen al desarrollo de disquinesias.

Este tipo de experimento que involucra el uso de microarreglos y donde se realiza un *screening* de la expresión de genes son experimentos *data-driven*¹ mientras que la mayoría de los experimentos en investigación fundamentalmente son *hypothesis-driven*². De esta forma, los resultados de los experimentos de microarreglos, validados previamente mediante una técnica alternativa, permiten la elaboración de nuevas hipótesis.

¹ El término *data-driven* se refiere a un tipo de diseño experimental que involucra la exploración de datos, sin una hipótesis previa. El objetivo de estos experimentos es la de generar nuevas hipótesis.

² El término *hypothesis-driven* se refiere a los clásicos experimentos del método científico, los que implican poner a prueba una hipótesis previamente planteada.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar los efectos y adaptaciones inducidos por el tratamiento prolongado con dos fármacos anti-parkinsonianos, de amplio uso en la clínica, en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson.

Objetivos específicos

1. Desarrollar y caracterizar un modelo animal con lesión unilateral inducida por la inyección de 6-OHDA en el núcleo estriado de ratas adultas, tal que presente deficiencias motoras comportamentales claramente cuantificables.
2. Establecer la dosis y el régimen de administración de levodopa y de pramipexol capaces de producir una mejoría de las deficiencias comportamentales en animales con lesión moderada intraestriatal.
3. Comparar la expresión de genes inducida luego del tratamiento con levodopa y con pramipexol en el estriado desnervado de ratas con lesión moderada de la vía nigroestriatal.

CAPÍTULO I

*Desarrollo y caracterización de un modelo animal de la
enfermedad de Parkinson*

CONSIDERACIONES PRELIMINARES

Existen diferentes modelos animales de la EP que se utilizan habitualmente en investigación básica (revisado por Beal, 2001; por Schober, 2004; por Dawson y col., 2010). En nuestro laboratorio tradicionalmente hemos utilizado como modelo experimental la rata con lesión unilateral de la vía nigroestriatal, inducida por la administración intracerebral de 6-OHDA (Gershanik y col., 1983; Murer y col., 1998; Ferrario y col., 2003; Delfino y col., 2004; Ferrario y col., 2004; Larramendy y col., 2008; Taravini y col., 2011).

Modelos animales de la EP: desnervación dopaminérgica inducida por 6-OHDA

Los modelos experimentales de la EP son una herramienta que permiten esclarecer los posibles mecanismos fisiopatológicos de esta enfermedad. Asimismo, son necesarios para el desarrollo y prueba de nuevos fármacos anti-parkinsonianos y de nuevas estrategias terapéuticas (como son las estrategias de neuroprotección/neurorestauración).

En 1968, Ungerstedt demostró que la 6-OHDA, un análogo hidroxilado de la DA, inyectada en la SNpc era capaz de causar degeneración de las terminales nerviosas y de los somas neuronales. La 6-OHDA es transportada a través del sistema de transporte de alta afinidad de catecolaminas (DAT en el caso de las neuronas dopaminérgicas) en los cuerpos celulares y fibras de neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas (Ungerstedt, 1968; Bloom y col., 1969; Uretsky e Iversen, 1970). Además, entre otros cambios bioquímicos inducidos por este agente, se observa una disminución del número de neuronas con inmunoreactividad para TH (Ichitani y col., 1991). La neurotoxicidad de la 6-OHDA se basa en un potente efecto inhibitorio de las enzimas respiratorias mitocondriales (complejos I y IV de la cadena), lo que lleva a déficits metabólicos que hacen que las neuronas no puedan ejercer sus funciones fisiológicas normales y consecuentemente degeneran (Deumens y col., 2002). La 6-OHDA no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que debe administrarse en forma intracerebral para inducir lesiones a ese nivel. Como en la EP la vía nigroestriatal es la

que principalmente degenera, se desarrollaron modelos animales en los cuales se realizó la lesión con 6-OHDA en distintos sitios de dicho sistema dopaminérgico.

En la investigación pre-clínica, uno de los modelos de roedores más ampliamente utilizados es aquel en el que la 6-OHDA se inyecta en el *mfb* (del inglés, *medial forebrain bundle*) (Gershanik y col., 1983). El pre-tratamiento de los animales con desipramina, un bloqueante del transportador de noradrenalina, impide el transporte de 6-OHDA en las neuronas noradrenérgicas, garantizando una selectividad razonable por las neuronas dopaminérgicas (Breese y Traylor, 1970). Los animales con lesión unilateral de la vía dopaminérgica muestran una conducta motora asimétrica por un período corto de tiempo post-quirúrgico, pero pronto recuperan su conducta normal, exhibiendo asimetría motora solo ante un estímulo estresante. Cuando estos animales reciben la administración sistémica de agonistas dopaminérgicos directos o indirectos (estimuladores de la liberación de DA) aparece una asimetría en el eje longitudinal del cuerpo y se inicia una conducta rotatoria característica que puede ser cuantificada en cajas de rotación (o rotámetros) (Ungerstedt y Arbuthnott, 1970; Hefti y col., 1980). La administración de agonistas mixtos (como levodopa o apomorfina) o selectivos, inducen una conducta rotatoria del animal en sentido contralateral al hemisferio inyectado con la toxina, mientras que los agonistas indirectos (como amfetamina) provocan una conducta rotatoria en sentido ipsilateral. Este tipo de conducta se explica como sigue: i) la degeneración de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales provoca una supersensibilidad de los receptores para DA post-sinápticos en el cuerpo estriado (aumento del número de receptores y modificaciones de las vías de señalización intracelular de los mismos). De esta manera, los receptores del estriado lesionado son más sensibles a los agonistas dopaminérgicos directos, que los del estriado intacto; ii) las drogas liberadoras de DA pueden estimular a los receptores para DA en el cuerpo estriado intacto y no hacerlo en el estriado lesionado, donde las terminales pre-sinápticas han degenerado y, por lo tanto, no pueden ejercer sus efectos; y iii) fibras nerviosas eferentes del cuerpo estriado inhiben la actividad locomotora ipsilateral. Esta influencia inhibitoria del estriado disminuye al ser activados los receptores para DA supersensibles, llevando a una importante activación motora del lado ipsilateral a la lesión en comparación al lado intacto. Esto resulta en una estimulación dominante, provocando giros en dirección contralateral. En cambio, los agonistas indirectos inducen una estimulación predominante de los receptores del hemisferio intacto resultando en

giros ipsilaterales a la lesión (revisado por Gerlach y Riederer, 1996). Asimismo, se demostró que la lesión de la vía nigroestriatal inducida por 6-OHDA debe ser severa para que los animales exhiban el comportamiento rotatorio ante la administración de agonistas directos (Creese y col., 1977). En cambio, animales que presentan una lesión leve y, por lo tanto, una pequeña reducción de los niveles de DA son capaces de rotar ante la administración de anfetamina. Estos resultados sugieren que si bien una asimetría en la cantidad de terminales nerviosas disponibles permite la rotación inducida por agonistas indirectos, la degeneración de neuronas dopaminérgicas debe ser severa para disparar el fenómeno de supersensibilidad post-sináptica.

La administración de 6-OHDA en el *mf*b o en la SNpc conduce a una degeneración inmediata de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y, dependiendo de la dosis administrada o de las coordenadas de inyección, una degeneración completa (severa) o parcial (moderada) de estas neuronas (revisado por Schwarting y Huston, 1996a). Una degeneración severa simula etapas tardías de la EP y es útil a la hora de probar tratamientos sintomáticos, como la eficacia de nuevos fármacos. Una degeneración moderada, en cambio, simula etapas tempranas de la EP y es útil para estudiar estrategias de neuroprotección/neurorestauración. Sin embargo, debido al pequeño tamaño del *mf*b y la SN es difícil obtener con alta eficiencia lesiones moderadas reproducibles.

Administración de 6-OHDA en el cuerpo estriado

Una forma de obtener lesiones selectivas y moderadas del sistema nigroestriatal es administrar la 6-OHDA en el cuerpo estriado. En relación al *mf*b y la SN, el estriado es un núcleo de mayor tamaño, convirtiéndose en una alternativa para producir la destrucción, circunscripta regionalmente, de las terminales nerviosas dopaminérgica y una degeneración moderada de los cuerpos celulares en la SNpc (Przedborski y col., 1995). La administración de 6-OHDA en el estriado causa degeneración retrógrada de las terminales dopaminérgicas y cambios en sitios distantes del área manipulada, como en la SN (Berger y col., 1991; Ichitani y col., 1991; Sauer y Oertel, 1994). El daño directo de los axones dopaminérgicos que se produce alrededor del área de inyección es seguido por una pérdida gradual de las neuronas dopaminérgicas en la SN ipsilateral, sobre todo de aquellas neuronas que proyectan al área afectada por la lesión (Sauer y Oertel, 1994; Przedborski y col., 1995; Lee y col., 1996). La pérdida retrógrada de

células ocurre en dos etapas, una etapa rápida y masiva que se completa al cabo de 3-4 semanas, seguida de una etapa lenta de pérdida celular que puede continuar durante meses después de la lesión (Sauer y Oertel, 1994; Kirik y col., 1998).

Los efectos funcionales inducidos por la lesión intraestriatal con 6-OHDA dependen, no solo de la dosis y del volumen total de la toxina inyectada, sino también del sitio de administración de la misma (es decir, de la región del complejo estriatal afectada por la desnervación). En particular, las lesiones que involucran la parte dorsomedial del estriado tienen efectos sobre la locomoción y el comportamiento rotatorio inducido por drogas, mientras que aquellas lesiones que involucran la región ventrolateral del caudado-putamen tienen un efecto pronunciado sobre la iniciación del movimiento, la orientación sensoriomotora y la motricidad fina (Kirik y col., 1998).

Evaluación de las deficiencias motoras funcionales inducidas por la lesión unilateral con 6-OHDA

El daño unilateral de la región cortical sensoriomotora del cerebro de la rata que controla el movimiento de la pata delantera causa deficiencias crónicas de la función somatosensorial y del uso de la PDC. Estos efectos también se observan luego del daño de las proyecciones nigroestriatales ascendentes. Tales asimetrías sensoriomotoras pueden ser fácilmente cuantificadas usando pruebas conductuales simples, confiables y sensibles. Estas pruebas han sido muy útiles en estudios de recuperación de función luego de un daño en el sistema nervioso central (SNC), como así también para evaluar la eficacia de intervenciones farmacológicas o conductuales. Existen múltiples pruebas para evaluar estas deficiencias, sin embargo centraremos nuestra atención en las que se utilizan de rutina en nuestro laboratorio y que fueron utilizadas en este trabajo, llamadas prueba del cilindro y prueba de pasos de ajuste. Estas pruebas se utilizan con más frecuencia para evaluar conductas motoras asimétricas y voluntarias en animales que no reciben ningún fármaco (revisado por Lane y Dunnett, 2008). Asimismo, ambas pruebas conductuales se utilizan para evaluar la asimetría en el uso de la PDC al hemisferio lesionado, asimetría que es inducida por la administración unilateral de 6-OHDA en la vía dopaminérgica nigroestriatal.

Prueba del Cilindro

En la PC el animal es colocado en una cámara de acrílico transparente. La forma cilíndrica y las dimensiones del cilindro favorecen la exploración vertical del nuevo ambiente, para lo cual el animal erguido apoya las patas delanteras sobre la pared del cilindro. Durante el tiempo que dura la prueba se evalúa el nivel de preferencia en el uso de las patas delanteras durante la exploración vertical espontánea. La prueba es altamente confiable, aún para el caso de investigadores con poca experiencia (Schallert y col., 2000).

La PC ha sido utilizada para seleccionar animales con lesiones severas de la vía nigroestriatal (Delfino y col., 2004) y para analizar los efectos de intervenciones clínicas potencialmente beneficiosas en un modelo con depleción unilateral de DA. Por ejemplo, la inyección estriatal de un vector adenoviral que codifica para GDNF humano (Choi-Lundberg y col., 1998), o la provisión de levodopa mediante la transferencia del gen de TH en el estriado desnervado (Kirik y col., 2002), previno el desarrollo de asimetrías en el uso de la PDC causada por la administración del neurotóxico 6-OHDA. Además, esta prueba ha sido utilizada para establecer el beneficio terapéutico inducido por la administración de fármacos anti-parkinsonianos, como es el caso de levodopa (Konradi y col., 2004).

Prueba de pasos de ajuste

La PPA permite analizar deficiencias en la iniciación de movimientos motores en las patas delanteras, análogas a la aquinesia de extremidades y desbalances posturales observadas en los pacientes de EP. La prueba, introducida en 1992 por Schallert y colaboradores (Schallert y col., 1992), fue luego modificada y utilizada para monitorear cambios en el uso de las patas delanteras inducidos, ya sea por la lesión de la vía nigroestriatal o por transplantes de células en el estriado, y también para explorar la sensibilidad de la misma frente a la administración sistémica de agonistas de receptores para DA.

En esta parte del trabajo nos propusimos desarrollar un modelo de lesión unilateral inducida por la administración de 6-OHDA con una pérdida moderada de neuronas dopaminérgicas de la SN. La elección de este modelo está relacionada con la necesidad de que persista cierta proporción de la población de células dopaminérgicas

en la SN luego de la administración de 6-OHDA, concomitantemente con la supervivencia de sus terminales axónicas en el cuerpo estriado. Para tal fin elegimos el cuerpo estriado como el sitio de inyección de la 6-OHDA. Este modelo nos permitirá estudiar los cambios que suceden en el estriado lesionado (que incluye las terminales axónicas dopaminérgicas remanentes) como consecuencia de los tratamientos farmacológicos en estudio. Numerosos trabajos han demostrado que el estriado es una estructura en la que ocurren fenómenos plásticos en respuesta a la desnervación de las terminales dopaminérgicas de la SN (Anglade y col., 1996; Ingham y col., 1998; Gerfen y col., 2002) y a la administración de fármacos (Ferrario y col., 2004; Belujon y col., 2010). Además, una degeneración moderada simula etapas tempranas de la EP y esto se relaciona directamente con la eficacia terapéutica de algunos fármacos anti-parkinsonianos. Por ejemplo, la eficacia anti-parkinsoniana del tratamiento con agonistas dopaminérgicos, como es el caso de pramipexol, disminuye a medida que progresa la enfermedad, es decir, a medida que la neurodegeneración es mayor (revisado por Schapira, 2007). El modelo a desarrollar también debe presentar deficiencias comportamentales evidentes y cuantificables. En nuestro caso, las deficiencias comportamentales serán útiles en el criterio de selección de los animales efectivamente lesionados y además, en el establecimiento posterior de las dosis de los fármacos, las que deberán ser equipotentes en cuanto a la capacidad de producir un beneficio terapéutico (ver *Capítulo II*). El daño unilateral de la vía nigroestriatal causa deficiencias crónicas funcionales, como es la aquinesia de la PDC. Las pruebas comportamentales que utilizaremos en este trabajo para evaluar la aquinesia de la PDC y el beneficio terapéutico de los fármacos en estudio son *la prueba del cilindro y la prueba de pasos de ajuste*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires) de entre 200 y 220 gr de peso corporal al inicio de los experimentos. Los animales se mantuvieron en grupos de 3 o 4 individuos por jaula, con libre acceso a comida y agua, en un ambiente con temperatura controlada ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y un período de 12 horas de luz-oscuridad, de acuerdo con las regulaciones locales (SENASA, Argentina). Todos los procedimientos que involucraron el uso de animales se realizaron en conformidad con las normativas de la comisión institucional local y la Guía para el Cuidado y Uso de los animales de Laboratorio (Publicación N°80-23/96, *National Institute of Health*, NIH, USA).

Inyección intraestriatal de 6-OHDA: determinación de la dosis

El modelo animal de la EP en el cual nos basamos fue descrito por Kirik y colaboradores (1998) en ratas de la cepa Sprague-Dawley. El modelo original consiste en 3 inyecciones unilaterales de 7 μg de 6-OHDA (droga base) en el cuerpo estriado, en las siguientes coordenadas según el atlas de Paxinos y Watson (1986) (en mm desde el bregma):

Coordenadas	Anteroposterior (AP)	Mediolateral (ML)	Dorsoventral (DV)
Sitio 1	+1,0	+3,0	-5,0
Sitio 2	-0,1	+3,7	-5,0
Sitio 3	-1,2	+4,5	-5,0

Tabla 3: Resumen de las coordenadas de los sitios de inyección de la 6-OHDA en el estriado.

La cirugía se realizó bajo un estado de anestesia inducido por ketamina (60 mg/kg, Ketamina 50, Holliday Scott, Argentina) y xylazina (10 mg/kg, Kensol, König, Argentina). Para prolongar el efecto de la anestesia durante el tiempo que insume la cirugía 10 minutos después de la dosis inicial se reforzó con 0,2 ml de ketamina por animal. El animal se colocó en un marco estereotáxico (Stöelting Co., USA) y se procedió a inyectar la neurotoxina 6-OHDA (6-OHDA-HBr Sigma o MP Biomedicals,

USA) en el cuerpo estriado del hemisferio izquierdo, disuelta en 0,02% de ácido ascórbico en solución salina (NaCl 0,9%), utilizando una aguja 30G x 1". Se probaron diferentes dosis de 6-OHDA (**Tabla 4**) y distintas posiciones de la barra incisal (BI), que se detallan en la **Tabla 5** (ver *Resultados, Capítulo I*), a fin de obtener una lesión con las características relevantes para el desarrollo de nuestro proyecto. La administración de la toxina se realizó utilizando una bomba de infusión continua (Stöelting Co., USA), a una velocidad de 0,56 µl/minuto. En los casos especificados, un grupo de animales se inyectó con la solución vehículo (ácido ascórbico 0,02% en solución salina) (grupo Vehículo). Al término de cada inyección la aguja permaneció en el lugar durante un periodo de tiempo igual a la mitad del tiempo de infusión para evitar el reflujó de líquido. Luego de retirar la aguja y de suturar el sitio de la incisión, los animales se colocaron en una cama térmica y se controlaron hasta recuperarse de la anestesia.

Tanda	1	2	3	4	5	6
Dosis						7,5 µg/2µl
6-OHDA	7 µg/2µl	7 µg/2µl	7 µg/2µl	9 µg/2µl	8 µg/2µl	
(droga base)						8 µg/3µl

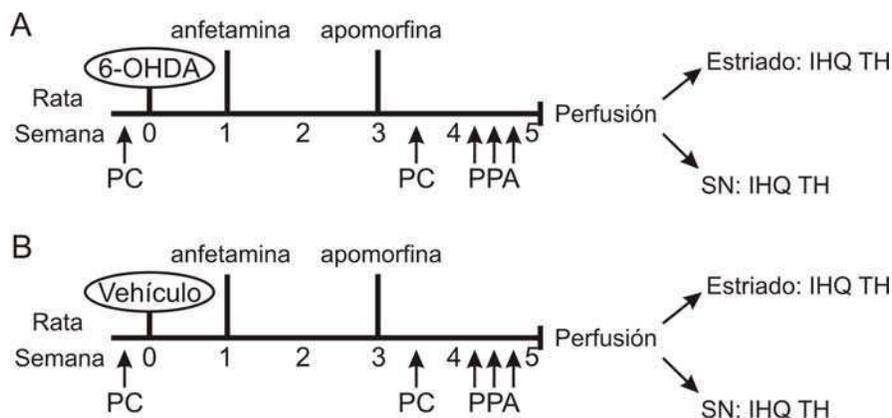
Tabla 4: Dosis de 6-OHDA ensayadas en grupos independientes de animales.

Inyección intraestriatal de tinta china: verificación de las coordenadas de inyección

Con el objetivo de establecer la posición real del sitio de administración, un grupo independiente de animales normales fue inyectado con 1 µl de tinta china (Eureka, Argentina) en cada sitio de inyección, según las coordenadas arriba especificadas. Los animales fueron sacrificados antes de recuperarse de la anestesia por perfusión intracardíaca con paraformaldehído (PFA) 4% en buffer fosfato (PB) 0,1M. Luego la remoción del cerebro, se obtuvieron secciones coronales del estriado de 40 µm utilizando un micrótopo de congelación a nivel de los sitios de inyección. Los cortes se colocaron sobre un portaobjetos y se los dejó secar al aire. Por observación directa se procedió a determinar los sitios de inyección mediante la localización del tracto de la aguja y se determinaron los planos aproximados en el atlas de Paxinos y Watson (1986). Una serie de cortes de tejido se reservó para la posterior tinción con violeta de cresilo y evaluación del tracto de la aguja (ver descripción de la técnica más adelante).

Efecto de la administración de 6-OHDA: Evaluación conductual e histológica

En cada una de las tandas de cirugía evaluamos los efectos comportamentales inducidos por la desnervación dopaminérgica (**Esquema 1**). Una semana después de la cirugía los animales fueron sometidos a la prueba de amfetamina y a las 3 semanas a la prueba de apomorfina (Kirik y col., 1998). Antes de la lesión y antes de la prueba de apomorfina se realizó la prueba del cilindro (PC) (Schallert y col., 2000) y en la cuarta semana la prueba de pasos de ajuste (PPA) (Olsson y col., 1995). Los animales se sacrificaron por perfusión con PFA 4% y posteriormente se extrajo el cerebro para realizar cortes coronales a la altura del estriado y de la SN de forma seriada en un micrótopo de congelación. Sobre este tejido se realizó la determinación de la enzima TH por inmunohistoquímica a nivel de ambas estructuras. La cuantificación de las neuronas TH-inmunoreactivas (TH-ir) en la SNpc se realizó en ambos hemisferios para evaluar el grado de desnervación dopaminérgica alcanzado con la lesión, sólo en aquellas tandas de animales en las cuales se observaron deficiencias comportamentales evidentes.



Esquema 1: Curso temporal del experimento de determinación de dosis de 6-OHDA. (A) Protocolo correspondiente a los animales lesionados con 6-OHDA (**Grupo 6-OHDA**). **(B)** Protocolo correspondiente a los animales sham o vehículo (**Grupo Vehículo**). PC: prueba del cilindro; PPA: prueba de pasos de ajuste; SN: *substantia nigra*; IHQ TH: inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa.

Pruebas comportamentales farmacológicas

Prueba de amfetamina y prueba de apomorfina

Entre las pruebas comportamentales farmacológicas más frecuentemente utilizadas se encuentran la prueba de amfetamina y la prueba de apomorfina. Cuando la

lesión alcanza cierto grado de severidad, en el estriado desnervado aumenta el número de receptores dopaminérgicos en la post-sinapsis, o se alteran las vías de señalización relacionadas con su estimulación (Gerfen y col., 2002), como mecanismos adaptativos post-sinápticos frente a la desnervación. Esta característica queda en evidencia ante la administración de agonistas dopaminérgicos directos, como la apomorfina, los cuales promueven un comportamiento rotatorio de los animales en sentido contralateral al hemisferio lesionado (en este caso giros hacia la derecha). La apomorfina es un agonista de receptores de DA que estimula ambas familias de receptores, D1 y D2, tanto pre-sinápticos como post-sinápticos. Por otra parte, la anfetamina es un agonista dopaminérgico indirecto ya que estimula los receptores dopaminérgicos al promover la liberación de DA de las terminales, hecho que ocurre principalmente en el hemisferio control o intacto y por lo tanto induce rotaciones en sentido ipsilateral a la lesión (en este caso giros hacia la izquierda). De esta manera, la inducción de rotaciones ante la administración de anfetamina indica una diferencia en el contenido de DA entre ambos hemisferios (Hefti y col., 1980; Heikkila y col., 1981).

Se evaluó el comportamiento rotatorio inducido por la administración de anfetamina (2,5 mg/kg, i.p.) y apomorfina (0,25 mg/kg, s.c., Rontag) a la primer y tercer semana posteriores a la lesión, respectivamente (Kirik y col., 1998). La actividad rotatoria se cuantificó en rotámetros automáticos, los cuales registran en forma continua los giros de 360° que el animal realiza, diferenciando la dirección de los mismos, en giros hacia la derecha o hacia la izquierda (Urgerstedt y Arbuthnott, 1970; Larramendy y col., 2008). En el caso de anfetamina las rotaciones se monitorearon durante 1 hora, mientras que para el caso de apomorfina las rotaciones se registraron durante 40 minutos luego de la administración de cada droga. Los valores se representan como número de vueltas ipsilaterales o vueltas contralaterales por minuto.

Pruebas comportamentales no farmacológicas

Prueba del cilindro

Para seleccionar los animales con deficiencias comportamentales, se evaluó la habilidad del uso de la PDC a la lesión (derecha en este caso, controlada por el hemisferio izquierdo) mediante la PC (**Figura 7**). Esta prueba evalúa la conducta

espontánea del animal sin intervención del investigador durante el desarrollo de la misma. Para ello el animal es colocado en un cilindro de acrílico, de 20 cm de diámetro y 30 cm de alto, donde inicia la actividad exploratoria del nuevo ambiente. Una de las formas de exploración que presentan estos animales es la exploración vertical, para la cual se elevan sobre sus patas traseras y apoyan las delanteras sobre la pared del cilindro. Una de las consecuencias de una lesión unilateral de la vía nigroestriatal es la aquinesia de la PDC, lo que se traduce en la falta de apoyo de la misma durante la exploración vertical, utilizando más frecuentemente la pata ipsilateral a la lesión. Esta asimetría en el uso de las patas delanteras es la característica que se aprovecha durante la prueba, ya que el observador cuenta durante 5 minutos el número total de veces que el animal se para sobre sus patas traseras y, de éstas, en cuántas apoya primero una u otra pata delantera. Es importante señalar que debido a la corta duración de la prueba no se genera habituación. En los casos en los que el animal no realizaba la actividad exploratoria al ser colocado en el cilindro se modificaron las condiciones de la prueba original. Dichas modificaciones consistieron en sacar y volver a introducir al animal, prender y apagar la luz y/o golpear suavemente las paredes del cilindro (Schallert y col., 2000). Los valores se representaron como porcentaje de uso de la PDC (% uso PDC), el que se calculó como (Woodle y col., 2005):

$$\% \text{ uso PDC} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de veces que apoya la PDC} + \frac{1}{2} (\text{N}^\circ \text{ de veces que apoya ambas patas delanteras})}{\text{N}^\circ \text{ total de subidas}}$$

La PC se realizó previamente a la cirugía y dos semanas después de la misma en una única sesión.



Figura 7: Prueba del Cilindro. En estas fotografías se ilustra a una rata realizando la PC. El animal se eleva sobre sus patas traseras y, en este caso, apoya sobre la pared del cilindro la pata izquierda. Nótese la retracción de la pata derecha, característica de una lesión de la vía nigroestriatal con aquinesia de la PDC.

Prueba de pasos de ajuste

La PPA permite seleccionar los animales que presentan deficiencias comportamentales así como la PC, pero ésta involucra la manipulación directa del animal por parte del investigador. El experimentador sujeta con una mano las patas traseras y eleva levemente la parte posterior del cuerpo del animal. Con la otra mano sujeta la pata delantera que no será monitoreada y permite que el animal apoye sobre la superficie la otra pata en estudio. El animal es inducido a recorrer una distancia de 90 cm en 5 segundos mientras que el investigador cuenta el número de pasos que realiza hacia la derecha y hacia la izquierda, con una u otra pata delantera alternativamente (Olsson y col., 1995) (**Figura 8**).

La PPA se realizó durante la cuarta semana después de la cirugía. Luego de 2 sesiones de prueba para lograr que el animal se acostumbre a la manipulación por parte del experimentador, la prueba se realizó durante tres días seguidos, 2 veces por día. Con los datos obtenidos se calcula un valor promedio del número de pasos de ajuste para cada pata delantera en dirección derecha y en dirección izquierda. En nuestro modelo animal la deficiencia en el uso de las patas delanteras se manifestó en la PDC en dirección izquierda. Se obtuvieron así 6 mediciones que se promediaron resultando en el parámetro “número de pasos de ajuste con PDC” que se observa en los gráficos. El máximo establecido fue de 16 pasos.

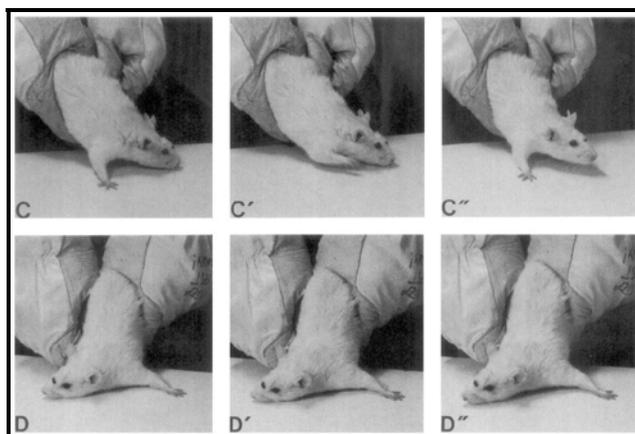


Figura 8: Prueba de pasos de ajuste. Fotografías que ilustran la secuencia de pasos de ajuste en dirección derecha de la pata ipsilateral (**C-C''**) y de la pata contralateral (**D-D''**) de una ratita lesionada con 6-OHDA en el hemisferio derecho. El animal arrastra la pata contralateral pasivamente cuando es conducido hacia la derecha mientras que con la pata ipsilateral realiza pasos frecuentes. Tomado de Olsson y col., 1995.

Obtención del tejido

Cada animal fue anestesiado con ketamina (60 mg/kg, Bayer) y xylazina (10 mg/kg, Rompun) y fue perfundido trascardíacamente con 100 ml de solución fisiológica 0,9% heparinizada (1000 UI heparina sódica/litro) y seguido de 250 ml de PFA 4% en PB 0,1M. Se extrajo el cerebro y se fijó 2 horas en PFA a 4°C, cumplidas las cuales se crioprotegió en sacarosa 30% en PB 0,1M por 48 horas.

Se obtuvieron secciones coronales seriadas del cerebro a nivel de la SN y del estriado, de 40 µm de espesor, en un micrótopo de congelación. Los cortes se conservaron a 4°C en PBS 0,1M conteniendo azida sódica 0,01%.

Tinción con violeta de cresilo (técnica de Nissl)

Con el objetivo de analizar la naturaleza y extensión del infiltrado inflamatorio inducido por la inyección de 6-OHDA, al cabo de 3 semanas después de la lesión, realizamos la tinción con violeta de cresilo. El violeta de cresilo es un colorante básico que interacciona con los ácidos nucleicos y se utiliza para la tinción del núcleo celular y la visualización de los cuerpos de Nissl (retículo endoplasmático rugoso) en el citoplasma de las neuronas (Finn Geneser, 3° Ed. Capítulo 14, Tejido nervioso).

La tinción se realizó sobre secciones histológicas de 40 µm a la altura del estriado, previamente dispuestas sobre portaobjetos. Las mismas se incubaron en etanol 70% y luego en violeta de cresilo 0,8% (Sigma, USA) por 5-10 minutos. Se realizó la diferenciación por inmersión en etanol 96% y los cortes se deshidrataron por pasajes sucesivos en etanol 96% y 100%, finalmente se aclararon en xilol 100% y se cubrieron con bálsamo sintético (PMYR, Argentina). Este procedimiento también se realizó en las secciones histológicas en las que se determinó la ubicación de los sitios de inyección mediante la inyección de tinta china.

Evaluación del grado de desnervación dopaminérgica

Inmunohistoquímica para Tirosina Hidroxilasa

A fin de establecer el grado de desnervación dopaminérgica de los animales lesionados con 6-OHDA realizamos la determinación inmunohistoquímica de TH, enzima que participa en la vía de síntesis de DA y, como tal, es un marcador específico de neuronas catecolaminérgicas.

La detección inmunohistoquímica fue realizada con los cortes en suspensión (“*free floating*”) (Taravini y col., 2011). A lo largo de toda la determinación se utilizó como buffer de lavado y como *buffer* de dilución de todos los reactivos PBS 0,1M conteniendo Tritón X-100 0,15% (PBS-T 0,15%). Entre todas las incubaciones con anticuerpos y reactivos se realizaron lavados con dicho *buffer*. Inicialmente, se realizó la inhibición de la peroxidasa endógena con H₂O₂ 0,3% por 30 minutos. Luego, los cortes se incubaron por 30 minutos en suero normal de cabra 10% para bloquear los sitios de unión inespecífica. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario anti-TH (dilución 1:1000, Pel Freez, USA) a 4°C durante toda la noche y con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con biotina (dilución 1:250, Vector Laboratories, USA) durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, la presencia del anticuerpo primario se visualizó por incubación con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (dilución 1:125, Kit Vectastain, Vector Laboratories, USA) y se reveló colorimétricamente con 3,3'-diaminobenzidina 0,5 mg/ml (DAB, Sigma, USA) y H₂O₂ 0,015% en TrisB 0,1M (TB, pH 7,4). La reacción de color indica las estructuras celulares donde se encuentra la proteína detectada con el anticuerpo primario. Se lavó con TB 0,25M y se procedió a disponer los cortes sobre portaobjetos gelatinizados. Se dejó secar 24 horas y luego se deshidrató mediante pasajes sucesivos en soluciones de alcohol de graduación creciente (30, 70, 95, 95, 100, 100%), se aclaró en xilol 100% y los cortes se cubrieron con medio de montaje a base de xilol (PMYR, Argentina).

Cuantificación del número de células remanentes TH-ir en la SNpc

Bajo microscopio (Nikon, Eclipse 50i, USA) se procedió a contar el número de células TH-ir en 4 niveles de la SNpc de ambos hemisferios utilizando el software Mercator Pro (Explora Nova, Francia) (con una amplificación de 40x). Para determinar el grado de lesión de los animales, se sumó el número de células de cada hemisferio de

los cuatro niveles elegidos (4,80; 5,30; 5,80 y 6,04 mm posterior al bregma, según el atlas de Paxinos y Watson, 1986) y se relativizó al hemisferio control, obteniéndose así un porcentaje de células TH-ir remanentes por animal.

Cuantificación del porcentaje de área TH- ir en el estriado

La integridad del sistema dopaminérgico a nivel del estriado se evaluó mediante la determinación de la densidad óptica (DO) de secciones inmunomarcadas para TH y reveladas con DAB (**Figura 9**). Se analizaron 7 secciones coronales, separadas 400 μm , entre 1,6 y -1,3 mm en relación al bregma (niveles estereotáxicos aproximados). Se tomaron fotos de cada nivel anatómico con una amplificación de 4x, con una resolución de 255 niveles de grises/pixel. Luego se compaginaron las fotos en el programa CorelDraw. Empleando las herramientas del programa de procesamiento y análisis de imágenes Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>, NIH, USA), el valor umbral de DO se estableció de manera que permitió diferenciar la señal específica de la inespecífica. Este valor umbral se determinó en el hemisferio control para cada nivel y se utilizó como referencia para medir el área inmunoreactiva en el estriado lesionado, obteniendo directamente el porcentaje de área TH-ir en dicha estructura (% área TH-ir) (Taravini y col., 2011).

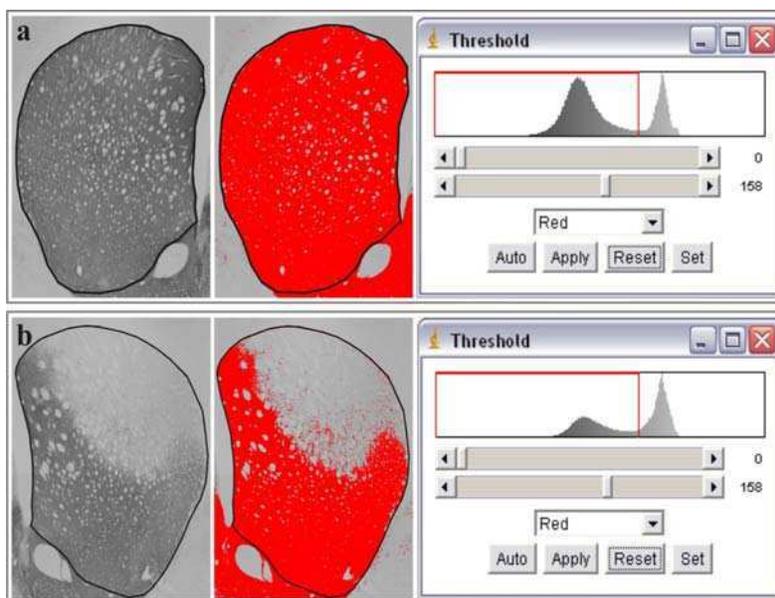


Figura 9: Determinación del porcentaje de área inmunoreactiva para TH en el estriado. En este ejemplo se muestra en (a) el hemisferio control y el histograma en el que se estableció el valor umbral de densidad. Este valor se utilizó como referencia para medir en (b) la DO del estriado lesionado respectivo, obteniendo el porcentaje de área TH-ir de la región delimitada con el trazo negro. En este caso se muestra un solo nivel de un animal inyectado con 6-OHDA. *Imagen del laboratorio de Parkinsonismo Experimental.*

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism versión 5.00 para Windows. (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). En todos los casos un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Para el análisis de las comparaciones entre el grupo Vehículo y el grupo 6-OHDA de las distintas variables, comportamentales e histológicas, se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para muestras independientes. Se utilizó una prueba no paramétrica debido al bajo número de animales del grupo Vehículo.

Para analizar si dos variables están asociadas se realizaron los análisis de correlación entre los distintos pares de variables, utilizando la prueba de correlación de Spearman o de Pearson, según corresponda. Se utilizó un método no paramétrico ya que las variables “porcentaje de células TH-ir remanentes” y “porcentaje de uso de la PDC” no siguen una distribución normal.

RESULTADOS

Inyección intraestriatal de 6-OHDA: determinación de la dosis

A los efectos de obtener un modelo que cumpla de manera satisfactoria los requerimientos de nuestro proyecto, inyectamos diferentes dosis de 6-OHDA y probamos distintas posiciones de la BI, con la intención de cambiar la inclinación del cráneo en el estereotáxico. Asimismo, nos propusimos inducir el menor daño inespecífico posible en los sitios de inyección, variando la dosis y el volumen de 6-OHDA inyectado. Para ensayar estas condiciones se realizaron tandas de animales independientes, detalladas en la **Tabla 5**. Se analizaron los efectos funcionales de la administración de 6-OHDA con la finalidad de obtener deficiencias comportamentales claramente cuantificables a través de la PC y la PPA. En ambas pruebas se evalúa la habilidad en el uso de la PDC a la lesión. En aquellos animales en los cuales se evidenció una deficiencia en el uso de la PDC inducida por la lesión se procedió a realizar una inmunohistoquímica para TH en el estriado y la SN con el objetivo de caracterizar bioquímicamente el grado de desnervación dopaminérgica alcanzado. Por otro lado se determinó el grado de daño inespecífico mediante la evaluación de cortes histológicos coloreados con violeta de cresilo.

Tanda	Dosis 6-OHDA (droga base)	Nº de ratas 6-OHDA (posición BI)	Ratas Vehículo	Deficiencia en el uso de la PDC en las pruebas comportamentales	Daño inespecífico severo en el cuerpo estriado
1	7µg/2µl	8 (BI 0)	Si	No	-
		8 (BI -3,3)	Si		
2	7µg/2µl	7 ($\lambda=\beta$)	No	No	-
		11 (BI -3,3)			
3	7µg/2µl	13 ($\lambda=\beta$)	No	No	-
		15 (BI -3,3)			
4	9µg/2µl	15 (BI -3,3)	Si	Si	Si
5	8µg/2µl	21 (BI -3,3)	Si	Si	Si
6	7,5µg/2µl	12 (BI -3,3)	Si	No	No
	8µg/3µl	13 (BI -3,3)	Si	Si	No

Tabla 5: Determinación de la dosis de 6-OHDA a inyectar en el estriado de ratas. Datos correspondientes a las 6 tandas de animales utilizadas para determinar la posición de la BI y la dosis y el volumen de 6-OHDA a utilizar. Se realizaron 3 inyecciones de 6-OHDA por estriado,

en la tabla se enumeran las dosis de 6-OHDA correspondientes solo a un punto de administración. BI: barra incisal; λ : lamda; β : bregma.

La dosis elegida fue 8 μ g/3 μ l de 6-OHDA. Esta dosis indujo deficiencias comportamentales en el uso de la PDC claramente cuantificables, tanto en la PC como en la PPA, con el mínimo grado de daño inespecífico en los sitios de inyección.

Visualización de los sitios de inyección

Mediante la inyección de tinta china y la tinción con violeta de cresilo caracterizamos la ubicación de la aguja en los 3 sitios de inyección. Para poner a punto nuestro modelo de lesión nos basamos en uno publicado por Kirik y colaboradores (1998). Comparamos las coordenadas del sitio de administración del trabajo de Kirik (**Figura 10 A**) y las obtenidas en nuestra experiencia (**Figura 10 B**) y observamos que en nuestro modelo existe una diferencia anteroposterior aproximada de 600 μ m en la ubicación de la cánula en el sitio número 3.

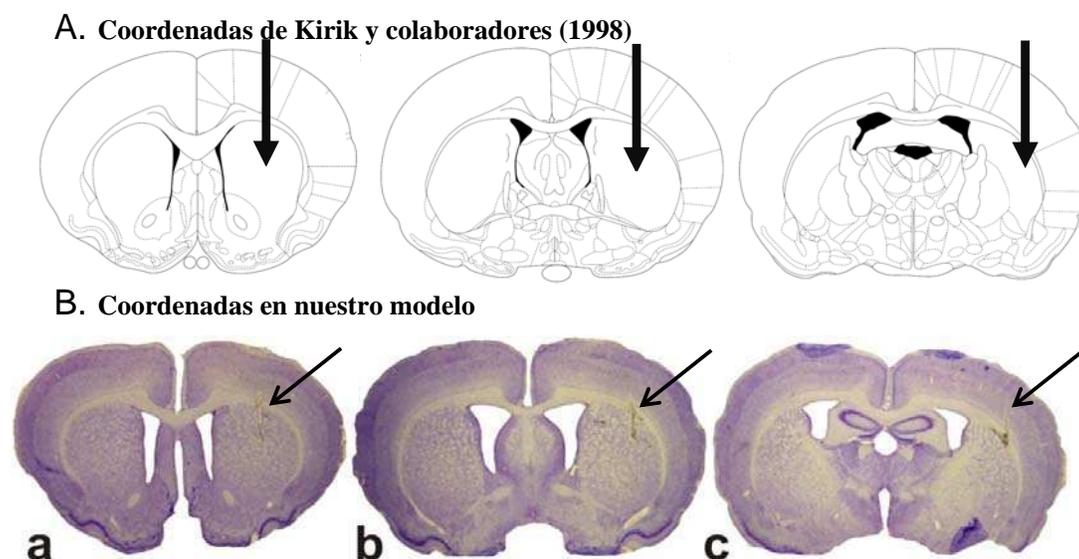


Figura 10: Visualización de los sitios de inyección. (A) Planos aproximados del atlas de Paxinos y Watson (1986) que ilustran las coordenadas utilizadas por Kirik y colaboradores (1998) en su modelo. (B) Tinción con violeta de cresilo de secciones coronales a nivel del estriado de una rata representativa operada con tinta china: (a) sitio de inyección 1, (b) sitio de inyección 2, (c) sitio de inyección 3. En las tres fotos se puede observar el trayecto de la aguja.

En vista de estos resultados pudimos establecer las coordenadas reales de los sitios de inyección de 6-OHDA en nuestro modelo (**Tabla 6**).

Coordenadas	Anteroposterior (AP)	Mediolateral (ML)	Dorsoventral (DV)
Sitio 1	+1,0	+3,0	-5,0
Sitio 2	-0,1	+3,7	-5,0
Sitio 3	-1,2	+4,5	-5,0

Tabla 6: Coordenadas aproximadas de los sitios de inyección de 6-OHDA en nuestro modelo animal según el atlas de Paxinos y Watson (1986).

Inyección intraestriatal de 8µg/3µl de 6-OHDA por sitio de inyección

Determinación de la presencia de infiltrado inflamatorio

La dosis de 8µg/3µl de 6-OHDA, administrada en 3 sitios en el estriado izquierdo o lesionado, indujo deficiencias comportamentales claramente cuantificables con el mínimo grado de daño inespecífico en los sitios de inyección y en regiones adyacentes a los mismos, como pudo comprobarse analizando el infiltrado inflamatorio, puesto de manifiesto mediante la tinción con violeta de cresilo (**Figura 11**). En el hemisferio desnervado (lesionado), el infiltrado inflamatorio está circunscripto a los puntos de inyección.

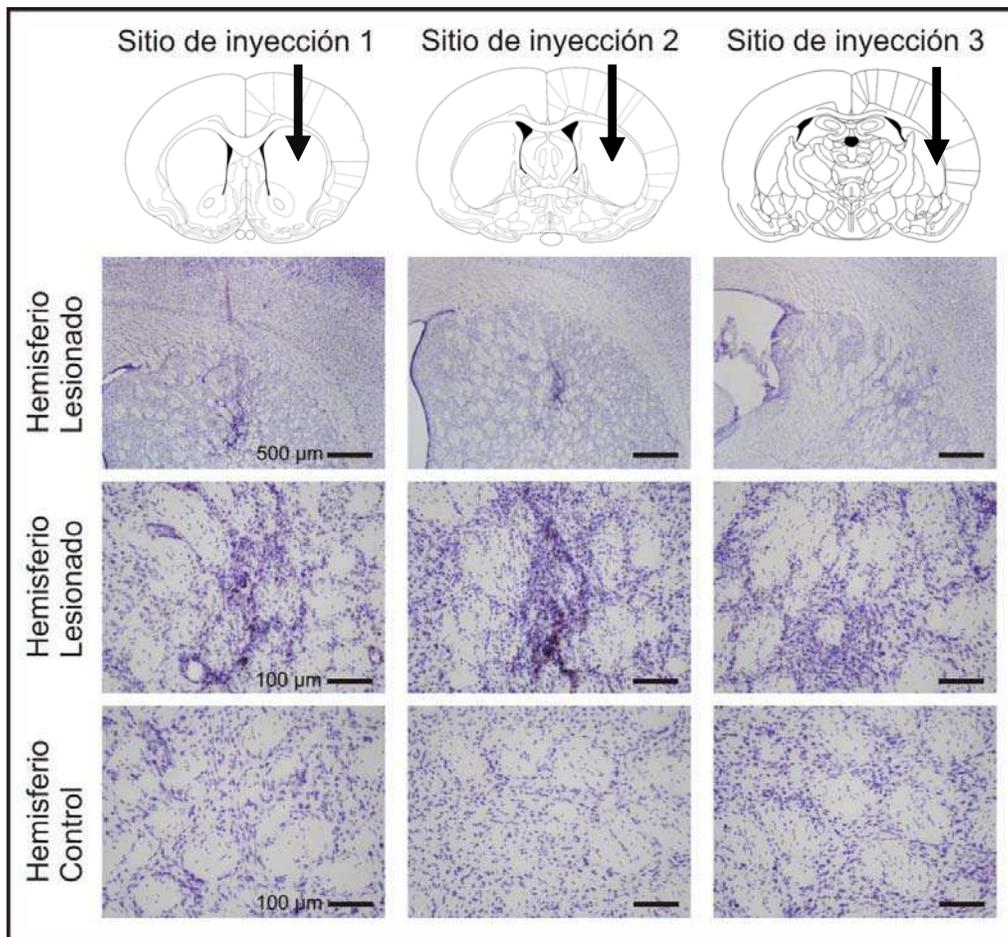


Figura 11: Determinación de la presencia de infiltrado inflamatorio. Tinción con violeta de cresilo de secciones coronales estriales a nivel de los tres sitios de inyección de una rata representativa. La segunda fila de imágenes muestra un campo a mayor aumento del infiltrado inflamatorio observado en la primera fila de imágenes.

Estudios comportamentales

Pruebas farmacológicas: prueba de anfetamina y prueba de apomorfina

En una primera instancia analizamos el efecto de la administración de 2,5 mg/kg de anfetamina y de 0,25 mg/kg de apomorfina, a la semana y a las 3 semanas posteriores a la cirugía, respectivamente (**Figura 12**).

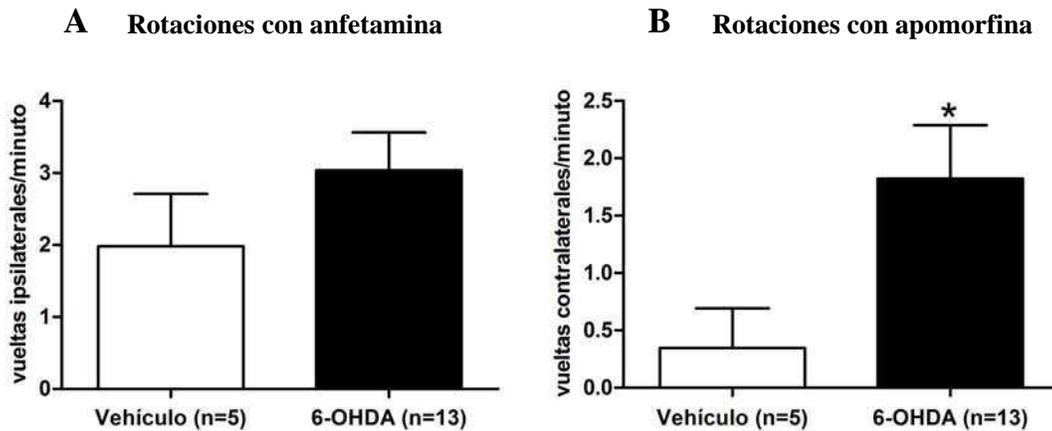


Figura 12: Pruebas comportamentales farmacológicas. Rotaciones (vueltas/minuto) inducidas por la administración de anfetamina (**A**) y por la administración de apomorfina (**B**) de los animales inyectados con 8µg/3µl de 6-OHDA por coordinada y con Vehículo. Media ± S.E.M. Prueba de Mann-Whitney para muestras independientes, *p<0,05.

La administración de apomorfina indujo un aumento de las vueltas contralaterales por minuto en los animales del grupo 6-OHDA respecto de los animales del grupo Vehículo (p=0,0137). Esta diferencia no se observó para el caso de la administración de anfetamina.

Pruebas no farmacológicas: prueba de pasos de ajuste y prueba del cilindro

La administración de 6-OHDA en los 3 sitios del estriado indujo deficiencias comportamentales en el uso de la PDC, tanto en la PPA (p=0,007) como en la PC

($p=0,007$), relacionadas específicamente con la administración de la neurotoxina, como pudo comprobarse al comparar con el comportamiento de los animales del grupo Vehículo (Figura 13 A, B).

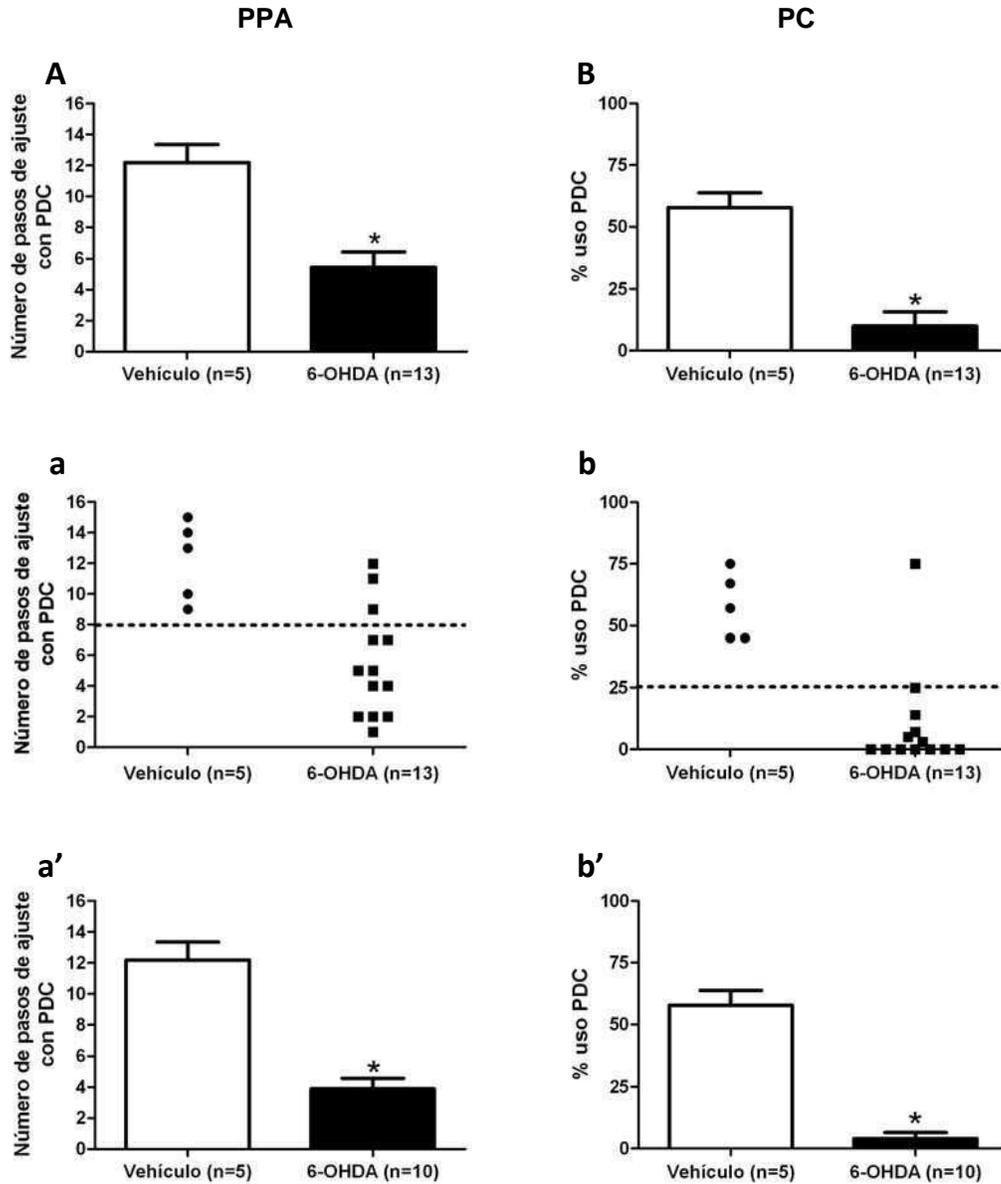


Figura 13: Pruebas comportamentales no farmacológicas de los grupos 6-OHDA y Vehículo. (A, B) (a, b) PPA y PC de todos los animales sometidos a la cirugía. (a y b) La línea de puntos indica el umbral de selección, utilizado para elegir los animales con deficiencias comportamentales. (a', b') PPA y PC de los animales seleccionados según los criterios establecidos. Media \pm S.E.M. Prueba de Mann-Whitney para muestras independientes, $*p<0,05$.

¿Cuáles fueron los parámetros para decidir que un animal presenta deficiencias comportamentales severas? Al analizar el número de pasos realizados con la PDC en la PPA se observó que los animales del grupo Vehículo realizaron un mínimo de 9 pasos de ajuste, mientras que la mayoría de los animales del grupo 6-OHDA realizaron hasta 8 pasos de ajuste como máximo (**Figura 13 a**). Del mismo modo, en la PC, la mayoría de los animales del grupo 6-OHDA utilizaron como máximo un 25% la PDC, mientras que en el grupo Vehículo no se evidenció preferencia en el uso de las patas delanteras (promedio 50%) (**Figura 13 b**).

En vista de estos resultados establecimos un criterio de selección de los animales que consistió en considerar a aquellos que realizaran hasta 8 pasos con la PDC en la PPA y, que utilizaran hasta un 25% la PDC en la PC, como animales con una lesión moderada inducida por la administración de 6-OHDA con deficiencias comportamentales evidentes.

Basándonos en este criterio de selección se mantuvieron las diferencias significativas entre los grupos Vehículo y 6-OHDA en el número de pasos de ajuste en la PPA ($p=0,001$) y en el porcentaje de uso de la PDC en la PC ($p=0,003$) (**Figura 13 a', b'**).

Determinación del grado de desnervación dopaminérgica

Imunohistoquímica para TH

A fin de determinar el grado de desnervación dopaminérgica inducido por la administración de 6-OHDA en el cuerpo estriado, realizamos una inmunohistoquímica para TH en secciones coronales del estriado y de la SN.

La administración de 6-OHDA en el estriado indujo una degeneración retrógrada de las neuronas TH-ir en la SN en todos los animales del grupo 6-OHDA. Esta disminución fue propia de la administración de la neurotoxina, como pudo comprobarse al comparar el porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN con el del grupo Vehículo ($p=0,002$) (**Figura 14 A**). Esta diferencia entre grupos se mantuvo para el caso de los animales seleccionados según el criterio establecido para las pruebas comportamentales ($p=0,003$) (**Figura 14 B**).

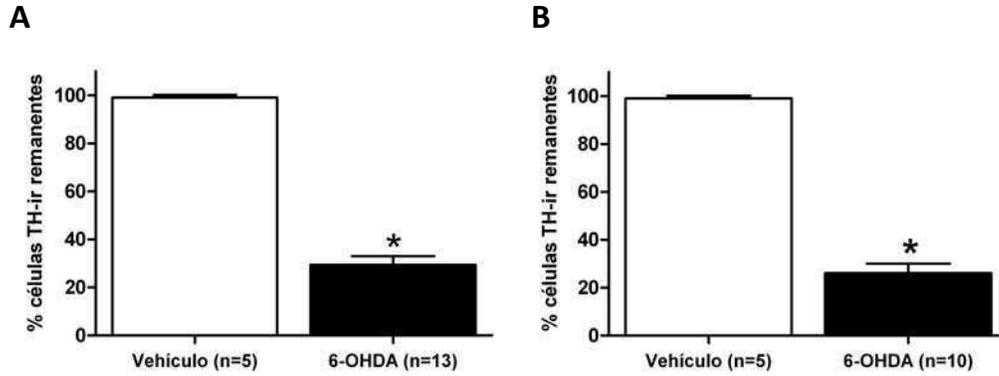


Figura 14: Determinación del grado de desnervación dopaminérgica en la SN. Porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN de los grupos Vehículo y 6-OHDA de **(A)** todos los animales lesionados con 6-OHDA y **(B)** los animales seleccionados según los criterios comportamentales. Media \pm S.E.M. Prueba de Mann-Whitney para muestras independientes, * $p < 0,05$.

Sin embargo, no se observó homogeneidad en cuanto al porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN entre los animales que recibieron 6-OHDA y que fueron seleccionados según el criterio establecido en las pruebas comportamentales. Se determinó un rango de células TH-ir remanentes en la SN del 16-52% inducido por la administración de $8\mu\text{g}/3\mu\text{l}$ de 6-OHDA por sitio de inyección (**Figura 15 A, B**).

A nivel del estriado, la inmunohistoquímica para TH reveló un patrón de desnervación similar en los animales desnervados seleccionados según los criterios comportamentales, con algunas diferencias. En todos los casos la desnervación afecta el estriado dorsolateral en los niveles rostrales y se extiende ventralmente en los niveles caudales. En los animales con lesiones más severas la desnervación está extendida ventralmente en los niveles más caudales (**Figura 16 A, B**).

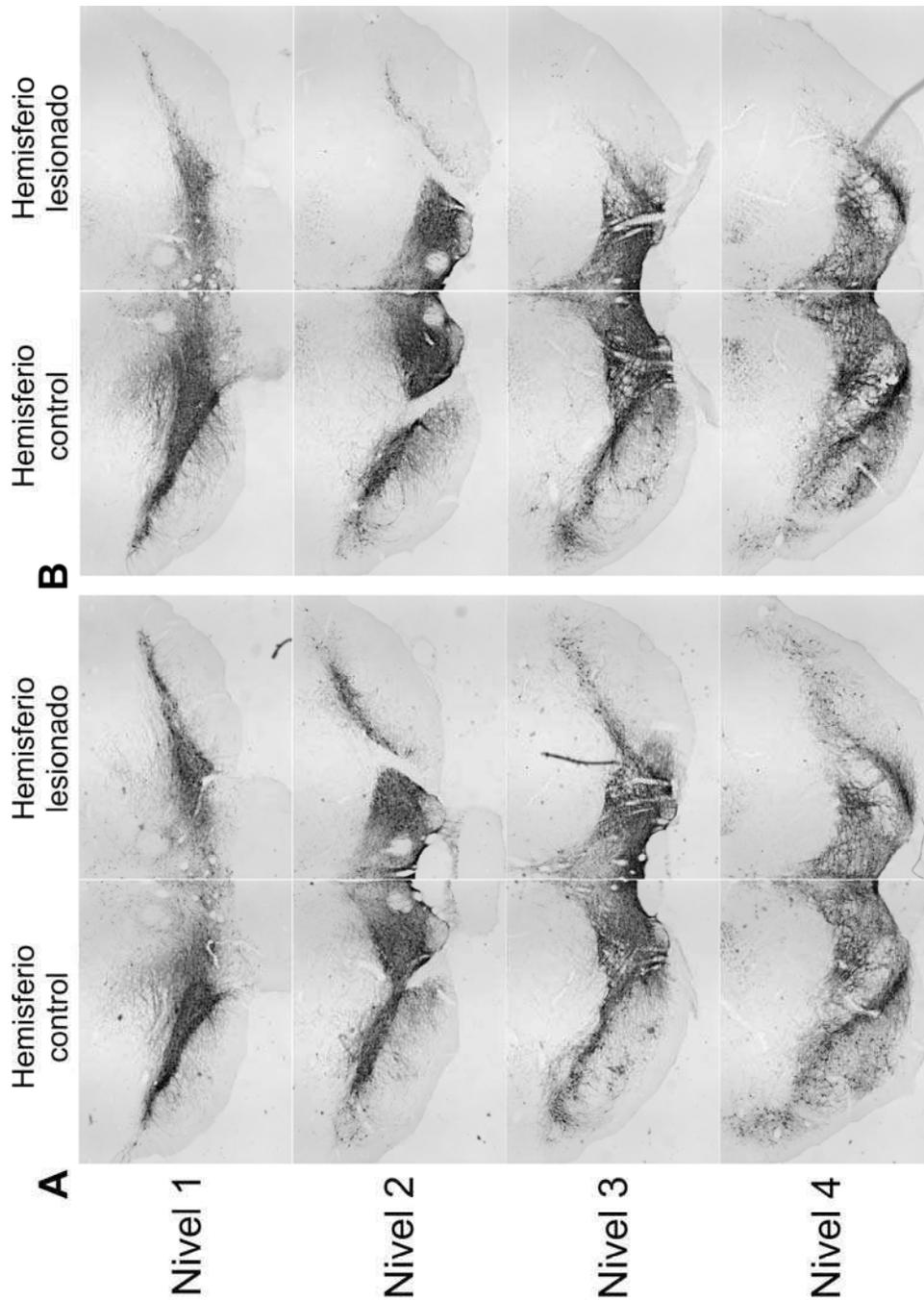


Figura 15: Inmunohistoquímica para TH a la altura de la SN. La imagen muestra las 4 secciones coronales de 40 μm de espesor de (A) un animal con 47% de células TH-ir remanentes en la SN, respecto del hemisferio control, representando aquellos animales que presentan una desnervación menos severa en los niveles más caudales y (B) un animal con 19% de células TH-ir remanentes representando aquellos animales que presentan una desnervación más severa en los niveles más caudales.



Figura 16: Inmunohistoquímica para TH a nivel del estriado. La imagen muestra las 7 secciones coronales de 40 μm de espesor de la serie de (A) un animal con 47% de células TH-ir remanentes en la SN, representando aquellos animales que presentan una desnervación menos severa en los niveles más caudales y (B) de un animal con 19% de células TH-ir remanentes en la SN, representando aquellos animales que presentan una desnervación más severa en los niveles más caudales.

Análisis de correlación entre las variables comportamentales e histológicas

Por último, para completar la caracterización del modelo animal desarrollado, analizamos la posibilidad de que exista una correlación entre:

- el porcentaje del área TH-ir en el estriado lesionado y el porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN. Ambas variables se correlacionaron significativamente (**Figura 17 A**).
- entre el número de pasos de ajuste con la PDC en la PPA y el porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN de los animales del grupo 6-OHDA. Ambas variables se correlacionaron significativamente (**Figura 17 B**).
- entre el número de pasos de ajuste con la PDC en la PPA y el porcentaje de área TH-ir en el estriado de los animales del grupo 6-OHDA. Ambas variables se correlacionaron significativamente (**Figura 17 C**).
- entre el porcentaje de uso de la PDC en la PC y el porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN de los animales del grupo 6-OHDA. Ambas variables no resultaron correlacionadas (**Figura 17 D**).
- entre el porcentaje de uso de la PDC en la PC y el porcentaje del área TH-ir en el estriado en los animales del grupo 6-OHDA. Ambas variables no resultaron correlacionadas (**Figura 17 E**).
- entre las rotaciones inducidas por anfetamina o apomorfina y el porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN o el porcentaje de área TH-ir en el estriado de los animales del grupo 6-OHDA. No se observó correlación entre ninguno de los pares de variables (no se muestran los gráficos).

Estos resultados se resumen en la **Tabla 7**:

Grupo 6-OHDA (n=13)	Porcentaje de área- TH ir en el estriado lesionado	Número de pasos de ajuste con PDC en PPA	Porcentaje de uso PDC en la PC	Rotaciones inducidas por anfetamina	Rotaciones inducidas por apomorfina
Porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN	r=0,7345 *p<0,05	r=0,7014 *p<0,05	r=0,2632 p>0,05	r=-0,2531 p>0,05	r=0,022 p>0,05
Porcentaje de área- TH ir en el estriado lesionado		r=0,6268 *p<0,05	r=0,5017 p>0,05	r=-0,2912 p>0,05	r=-0,057 p>0,05

Tabla 7: Resumen del análisis de correlación entre las distintas variables (comportamentales e histológicas) del grupo 6-OHDA.

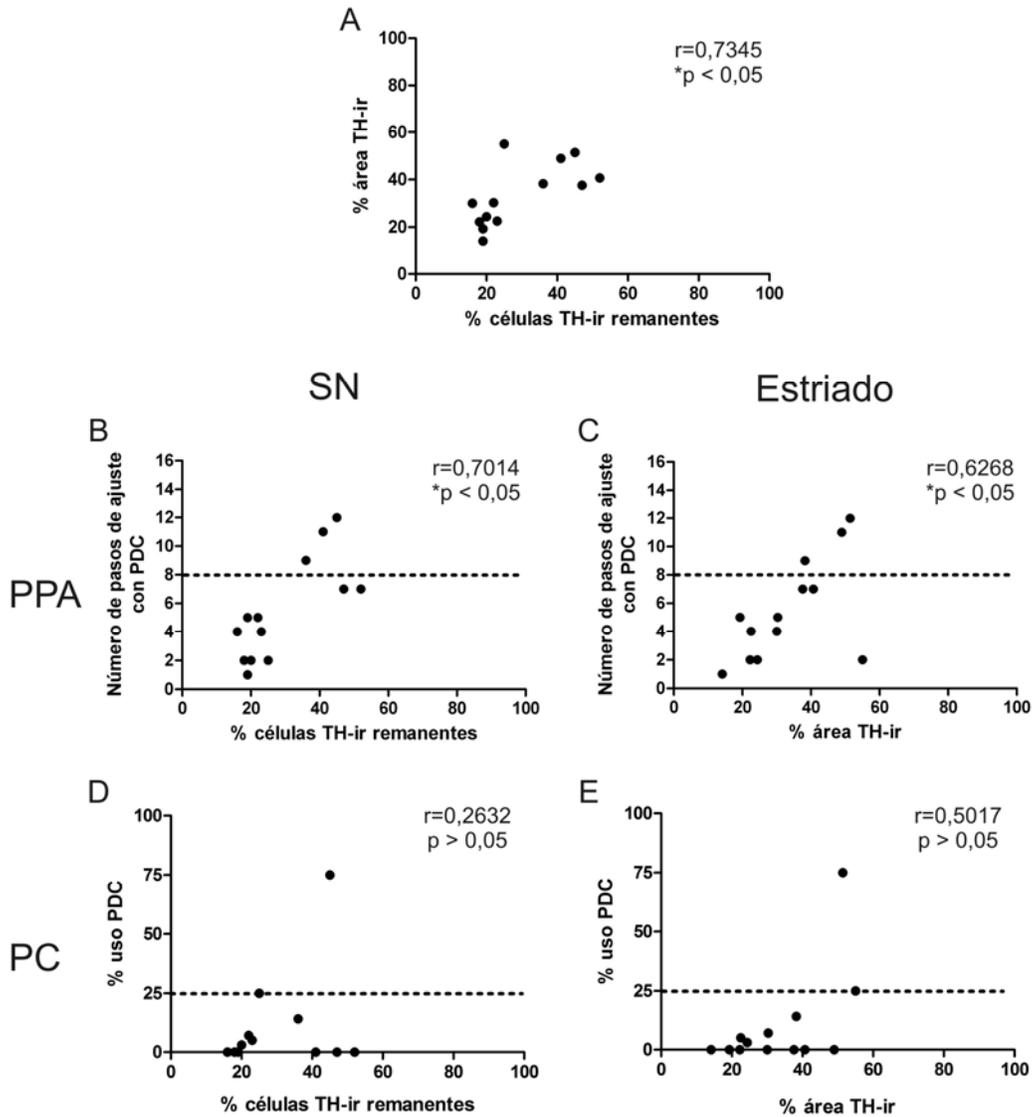


Figura 17: Análisis de correlación. Entre: (A) el porcentaje de área TH-ir en el estriado y el porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN. Promedio de 7 niveles coronales del estriado de cada animal. Prueba de correlación de Spearman, $r=0,7345$; $*p<0,05$ ($n=13$); (B) el número de pasos de ajuste con la PDC en la PPA y el porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN. Prueba de correlación de Spearman, $r=0,7014$; $*p<0,05$ ($n=13$); (C) el número de pasos de ajuste con la PDC en la PPA y el porcentaje de área TH-ir en el estriado. Promedio de 7 niveles coronales del estriado de cada animal. Prueba de correlación de Pearson, $r=0,6268$; $*p<0,05$ ($n=13$); (D) el porcentaje de uso de la PDC en la PC y el porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN. Prueba de correlación de Spearman, $r=0,2632$ ($n=13$); (E) entre el porcentaje de uso de la PDC en la PC y el porcentaje de área TH-ir en el estriado. Prueba de correlación de Spearman, $r=0,5017$ ($n=13$).

DISCUSIÓN

La administración de 8µg/3µl de 6-OHDA en 3 puntos del estriado de rata, según los parámetros establecidos previamente, indujo deficiencias comportamentales claramente cuantificables con el menor grado de daño inespecífico en los sitios de inyección.

El daño neuronal, determinado como porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN o como porcentaje de área TH-ir en el estriado, resultó ser variable entre los animales lesionados pero ambas variables resultaron estar correlacionadas de manera significativa. El rango de desnervación dopaminérgica alcanzado indica un daño moderado de la vía nigroestriatal. A pesar de esta variabilidad en el daño neuronal entre los animales de este grupo, el comportamiento en la PC reveló una aquinesia severa de la PDC en la mayoría de ellos; este hecho encontraría explicación en que para esta prueba sería más importante la región del estriado afectada por la 6-OHDA más que la extensión de la lesión. Por otro lado, el comportamiento en la PPA reveló una cierta variabilidad en el número de pasos realizados con la PDC entre los animales del grupo. Este comportamiento estaría relacionado no solo con la región estriatal afectada sino también con la extensión de la desnervación dopaminérgica. La relación entre la extensión de la desnervación dopaminérgica y la performance en la PPA, en ausencia de drogas, ha sido descripta por varios grupos (Winkler y col., 1996; Kirik y col., 1998; Chang y col., 1999).

De todo lo expuesto se desprende que:

La PPA, en este modelo, es una prueba confiable para relacionar fehacientemente el resultado de esta conducta “forzada” con el grado de desnervación dopaminérgica inducido por la administración de 6-OHDA, ya sea determinado como porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN o como porcentaje de área TH-ir en el estriado. Este último es el parámetro que mejor correlaciona y de hecho, el análisis de la correlación permite pensar en una relación lineal entre el número de pasos de ajuste con la PDC y el porcentaje de área TH-ir en el estriado lesionado. El análisis de regresión lineal arroja la ecuación de una recta (datos no presentados) que, en teoría, permitiría a partir del número de pasos predecir el porcentaje de área TH-ir en el estriado lesionado o

viceversa. Esto es de gran utilidad a la hora de seleccionar animales con diferente grado de desnervación dopaminérgica para nuestro modelo animal de la EP.

Por otro lado, para la PC se observa un nivel umbral en el porcentaje de uso de la PDC dentro del rango de desnervación dopaminérgica determinado como porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN o como porcentaje de área TH-ir en el estriado. A su vez, esta conducta espontánea establece una amplia diferencia respecto del grupo Vehículo, lo que facilitará analizar si existe de un beneficio terapéutico inducido por la administración de un fármaco, determinado como una mejoría del uso de la PDC, equivalente a un porcentaje de uso de la PDC mayor al 25%. Este hecho resulta de gran utilidad a la hora de establecer las dosis de levodopa y pramipexol, las cuales deberán ser equipotentes y producir un beneficio terapéutico comparable en nuestro modelo animal de la EP.

La respuesta de los animales lesionados frente a la administración de anfetamina y apomorfina resultó confusa y de difícil interpretación. Posiblemente, en los animales que presentaban las lesiones más severas se haya inducido el fenómeno de supersensibilidad desnervatoria y estos animales hayan contribuido a la diferencia observada en el número de vueltas contralaterales/minuto respecto del grupo Vehículo frente a la administración de apomorfina. La evaluación de la conducta rotatoria frente a la administración de anfetamina y de apomorfina tradicionalmente ha tenido su utilidad para seleccionar animales lesionados, en especial aquellos con una lesión severa (revisado por Schwarting y Huston, 1996a, 1996b). En este trabajo las utilizamos como parte de la caracterización del modelo animal desarrollado. Sin embargo, desde que numerosos trabajos demostraron que la administración de éstas drogas afecta el comportamiento de los animales frente al tratamiento ulterior con fármacos anti-parkinsonianos (*priming*) (Delfino y col., 2004) en nuestro laboratorio dejamos de utilizarlas como método de selección.

CAPÍTULO II

Caracterización del tratamiento farmacológico con levodopa y con pramipexol de animales con lesión moderada de la vía nigroestriatal

CONSIDERACIONES PRELIMINARES

En esta etapa del trabajo nos propusimos establecer y caracterizar un protocolo de administración de levodopa y de pramipexol, cuyas dosis elegidas produzcan una mejoría de las deficiencias comportamentales inducidas por la desnervación dopaminérgica (beneficio terapéutico) y además, que dicha respuesta terapéutica sea similar entre levodopa y pramipexol.

El protocolo de administración farmacológica involucra la administración oral y el uso de los comprimidos disponibles comercialmente de levodopa y de pramipexol. Esta forma de administración de los agonistas intenta simular algunas de las características del tratamiento de un paciente parkinsoniano. En trabajos previos de nuestro laboratorio y de otros grupos, la administración de levodopa se realizó disolviendo el comprimido comercial en el agua de bebida de los animales, siendo ésta la única fuente de líquido (Datla y col., 2001; Ferrario y col., 2004).

Como el fin último de esta tesis es establecer el efecto del tratamiento con levodopa y con pramipexol sobre la expresión de genes en el estriado, la duración del tratamiento es un factor importante a determinar. Si bien se discute si un tratamiento es agudo o crónico dependiendo de la duración del mismo, en muchos trabajos en los que se estudió el efecto del tratamiento prolongado con fármacos se estableció la duración del mismo en 3 semanas (Medhurst y col., 2001; Ferrario y col., 2003; Napolitano y col., 2006; Marin y col., 2007; Marin y col., 2008). La duración del tratamiento debe ser tal que garantice que los animales se adapten al mismo. Además, debe ser suficientemente largo para permitir monitorear el posible desarrollo de disquinesias, fenómeno que puede ocurrir en forma gradual. Por último, y no menos importante, la duración del tratamiento debe garantizar la posible modificación en la expresión de genes, los que son el eje de estudio de este trabajo.

Las dosis de los fármacos a utilizar deberán ser equivalentes, desde el punto de vista terapéutico, y ser tales que garanticen su acción a nivel del SNC. Para obtener estas dosis analizaremos el beneficio terapéutico de los fármacos sobre la aquinesia de la PDC inducida por la desnervación dopaminérgica de la vía nigroestriatal (Konradi y col., 2004). Este déficit conductual será evaluado con la PC, según la cual, los animales

lesionados utilizan hasta un 25% la PDC a la lesión, como se estableció para el modelo animal de la EP que desarrollamos. Para esto, en nuestro modelo animal, el beneficio terapéutico será establecido como una disminución de la aquinesia, determinada por un porcentaje de uso de la PDC mayor al 25% como consecuencia del tratamiento farmacológico. Como los fármacos se administrarán en el agua de bebida, esta conducta se evaluará durante el período de oscuridad del ciclo de luz/oscuridad de los animales, ya que es cuando los mismos ingieren la mayor cantidad de líquido por ser animales de actividad nocturna (Ferrario y col., 2004).

Una vez establecido el protocolo de administración, las dosis y el beneficio terapéutico alcanzado con levodopa y pramipexol procederemos a analizar si el tratamiento con dichos fármacos induce cambios en la expresión de genes.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires) de entre 200 y 220 gr de peso corporal al inicio de los experimentos. Los animales se mantuvieron en grupos de 3 o 4 individuos por jaula, con libre acceso a comida y agua, en un ambiente con temperatura controlada ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y un período de 12 horas de luz-oscuridad, de acuerdo con las regulaciones locales (SENASA, Argentina). Todos los procedimientos que involucraron el uso de animales se realizaron en conformidad con las normativas de la comisión institucional local y la Guía para el Cuidado y Uso de los animales de Laboratorio (Publicación N°80-23/96, *National Institute of Health*, NIH, USA).

Lesión intraestriatal con 6-OHDA

La cirugía se realizó bajo un estado de anestesia inducido por ketamina (60 mg/kg, Ketamina 50, Holliday Scott, Argentina) y xylazina (10 mg/kg, Kensol, König, Argentina). Para prolongar el efecto de la anestesia durante el tiempo que dura la cirugía 10 minutos después de la dosis inicial se reforzó con 0,2 ml de ketamina por animal. El animal se colocó en un marco estereotáxico (Stoelting Co., USA) y se procedió a inyectar 8 μg de 6-OHDA (base libre, 6-OHDA-HBr Sigma o MP Biomedicals, USA), disuelta en 3 μl de 0,02% de ácido ascórbico en solución salina (NaCl 0,9%), por medio de una aguja 30G x 1". Las inyecciones se realizaron utilizando una bomba de infusión continua (Stoelting Co., USA), a una velocidad de 0,56 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ a la altura del estriado (**Sitio 1:** AP:+1,0 ML:+3,0 DV:-5,0; **Sitio 2:** AP:-0,1 ML:+3,7 DV:-5,0; **Sitio 3:** AP:-1,2 ML:+4,5 DV:-5,0), en el hemisferio izquierdo. Al término de cada infusión la aguja permaneció en el lugar durante un periodo de tiempo igual a la mitad del tiempo de infusión para evitar el reflujo de líquido. Luego de retirar la aguja y de suturar el sitio de la incisión, los animales se colocaron en una cama térmica y se controlaron hasta recuperarse de la anestesia.

Determinación de la estabilidad de la solución de pramipexol por HPLC

La estabilidad de la solución de pramipexol en la botella se evaluó por la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para establecer la periodicidad de la preparación de la misma. Esta técnica se realiza de rutina en el ININFA por personal especializado. La pastilla de pramipexol se disolvió en el agua de bebida de los animales (agua de la red). La solución se filtró y se colocó en una botella color caramelo, manteniéndola a temperatura ambiente durante 4 días. La determinación por HPLC se realizó, por medición de la altura del pico en el cromatograma de 4 muestras, al primer y al cuarto día de preparada cada solución.

HPLC Solución de pramipexol	Día 1	Día 4
Promedio (n=4)	26886,25	28169,50
Desvío estándar	610,43	709,00
CV%	2,27	2,52
pH	6	6

Tabla 8: Determinación de la estabilidad de la solución de pramipexol.

Como puede observarse en la **Tabla 8**, no se encontraron variaciones en la altura del pico en el cromatograma entre las mediciones del día 1 y del día 4 de preparación de la solución de pramipexol. En vista de estos resultados, y de la estabilidad de la levodopa determinada en un trabajo previo por Ferrario y colaboradores (2004), establecimos renovar las soluciones 3 veces por semana (Datla y col., 2001; Ferrario y col., 2004).

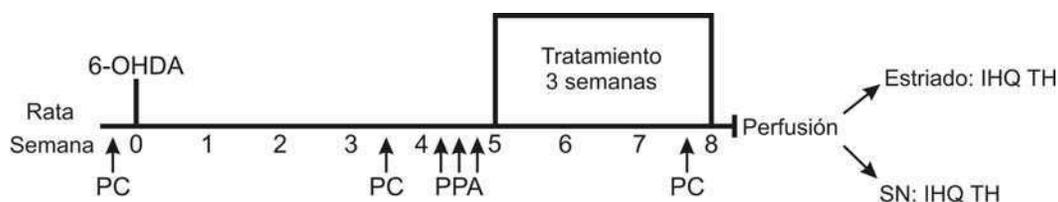
Generalidades del tratamiento farmacológico

Un mes después de la cirugía, los animales con lesión moderada intraestriatal se seleccionaron por la PC y la PPA, incluyéndose en el experimento aquellos animales que utilizaron la PDC en la PC hasta un 25% y que a la vez realizaron hasta un máximo de 8 pasos, con la PDC en dirección izquierda, en la PPA.

Los animales se asignaron al azar a los distintos tratamientos y se alojaron de 2 por jaula. Los animales fueron tratados con levodopa o pramipexol. Los fármacos bajo estudio son de uso clínico y se utilizaron los comprimidos comerciales: levodopa/carbidopa (250/25 mg, Lebocar, Pfizer-Pharmacia, Argentina) y pramipexol (1 mg, Sifrol, Boehringer-Ingelheim, Alemania). Los comprimidos se disolvieron en

agua de la red (agua de bebida de los animales), se filtraron las soluciones y se colocaron en botellas color caramelo protegidas de la luz. Cada semana se monitoreó el peso de los animales para ajustar las dosis según la variación del peso y del volumen de líquido ingerido por los animales en estudio durante los días de tratamiento. Es importante resaltar que ésta fue la única fuente de líquido durante todo el tratamiento (Datla y col., 2001; Ferrario y col., 2004).

La duración del tratamiento fue de 3 semanas. Dicho período representa un tiempo suficiente para lograr que los animales se adapten al mismo y al mismo tiempo es suficiente para monitorear el posible desarrollo de disquinesias por efecto de los fármacos (**Esquema 2**).



Esquema 2: Curso temporal general del experimento de caracterización del tratamiento farmacológico. 6-OHDA: 6-hidroxidopamina; PC: prueba del cilindro; PPA: prueba de pasos de ajuste; SN: *substantia nigra*; IHQ TH: inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa.

Prueba del cilindro bajo efecto de los fármacos

En la tercer y última semana de tratamiento, se evaluó el uso de la PDC en la PC bajo efecto de los fármacos (**Esquema 2**). Esta prueba se realizó como se describió previamente en la sección *Materiales y Métodos, Capítulo I*, en un cuarto acondicionado con luz roja como única fuente de luz. El criterio de elección de las dosis de los fármacos en estudio está relacionado con la necesidad de asegurar la disponibilidad de los mismos a nivel del SNC y para tal fin evaluamos el comportamiento de los animales a través de la PC, esperando ver una disminución de la aquinesia de la PDC bajo efecto del tratamiento (efecto terapéutico de la droga). El comportamiento de los animales se evaluó de noche (período de actividad de los mismos) ya que es cuando ingieren la mayor cantidad de líquido y, por lo tanto, es cuando están bajo el efecto de los fármacos. La evaluación de los animales se realizó en repetidas sesiones desde las 10 pm hasta las 6 am, ya que la frecuencia de bebida y el volumen de líquido varían entre animales y a lo largo de la noche. Durante la PC los animales fueron observados

minuciosamente para detectar la aparición de disquinesias (Cenci y col., 1998; Lee y col., 2000; Lundblad y col., 2002; Winkler y col., 2002; Larramendy y col., 2008).

Obtención del tejido e inmunohistoquímica para TH

Al cabo de las 3 semanas de tratamiento y luego de 24 horas de lavado de las drogas cada animal se perfundió y se extrajo el cerebro. En un micrótopo de congelación se realizaron cortes coronales a la altura del estriado y la SN de forma seriada. La inmunohistoquímica para la enzima TH se realizó a nivel de dichas estructuras. La detección inmunohistoquímica fue realizada siguiendo el protocolo descrito en la sección *Materiales y Métodos, Capítulo I*.

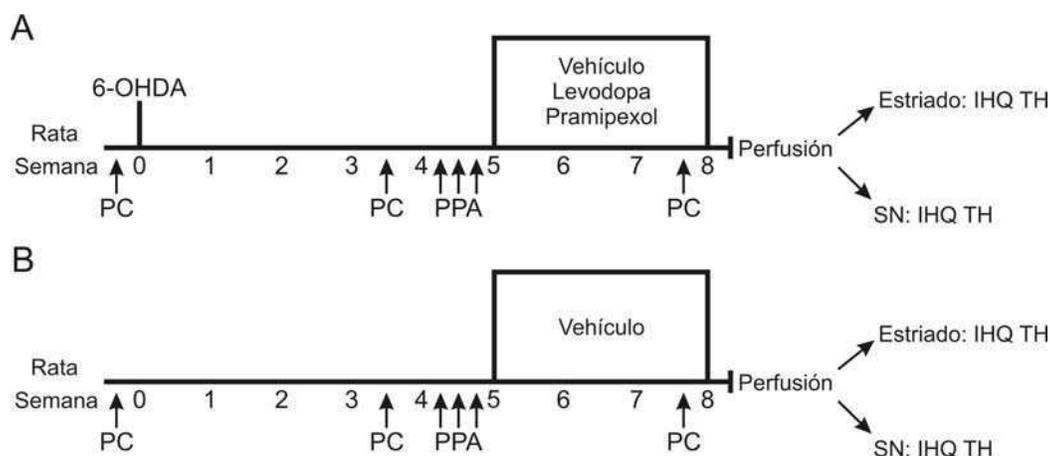
Bajo microscopio se procedió a contar el número de células TH-ir en 4 niveles de la SN de ambos hemisferios (4,80; 5,30; 5,80 y 6,04 mm posterior al bregma, según el atlas de Paxinos y Watson, 1986). Para determinar el grado de desnervación dopaminérgica de los animales, se sumaron los números de células de los 4 niveles de cada hemisferio y el valor obtenido en el hemisferio lesionado se relativizó al del hemisferio control, obteniéndose así un porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN por animal.

Puesta a punto de la dosis de pramipexol

Siguiendo el protocolo experimental arriba descrito, se analizó la respuesta en la PC de los animales bajo efecto del tratamiento con levodopa/carbidopa 170/17 mg/kg/día, dosis que fue utilizada en un trabajo anterior de nuestro grupo (Ferrario y col., 2004) y se determinó la dosis de pramipexol que indujo una respuesta comportamental comparable. Para ello, en un primer paso realizamos una curva dosis respuesta de pramipexol, en la cual comparamos el efecto de 3 dosis diferentes: i) 1,5 mg/kg/día, ii) 2,5 mg/kg/día y iii) 3,5 mg/kg/día de pramipexol sobre el uso de la PDC en la PC de noche.

Una vez seleccionada la dosis de pramipexol capaz de inducir un beneficio terapéutico en la mayoría de los animales tratados, comparamos el efecto terapéutico

alcanzado con la dosis de pramipexol seleccionada y la dosis de levodopa establecida previamente. Para tal fin, en un último grupo independiente de animales se analizó el porcentaje de uso de la PDC en la PC bajo efecto de los tratamientos en los siguientes grupos experimentales: (a) Lesionado Agua (LA, n=6), (b) Lesionado Levodopa 170 mg/kg/día (LL, n=6), (c) Lesionado Pramipexol 3,5 mg/kg/día (LP, n=6). Un grupo de animales normales recibió vehículo (agua), conformando el grupo (d) Normal Agua (NA, n=5) (**Esquema 3**). La elección de estos grupos experimentales tiene que ver con el diseño del experimento de microarreglos, los detalles del cual se verán más adelante (ver *Capítulo III*).



Esquema 3: Curso temporal del experimento de caracterización del tratamiento farmacológico. (A) Protocolo correspondiente a los animales de los grupos LA, LL y LP. (B) Protocolo correspondiente a los animales del grupo NA. 6-OHDA: 6-hidroxidopamina; PC: prueba del cilindro; PPA: prueba de pasos de ajuste; SN: *substantia nigra*; IHQ TH: inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa.

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism versión 5.00 para Windows. (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). En todos los casos un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Para el análisis de comparación entre los grupos NA, LA, LL y LP se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y, en caso de resultar en diferencias significativas, como prueba *post hoc* se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Estas pruebas se realizaron para comparar entre los grupos experimentales los

resultados correspondientes a las variables “porcentaje de uso de la PDC” en la PC bajo efecto de los tratamientos y “porcentaje de células TH-ir remanentes” en la SN.

RESULTADOS

Curva dosis respuesta de pramipexol: efecto de la dosis sobre la aquinesia de la PDC en la PC

Para determinar la dosis de pramipexol que en nuestro modelo experimental induzca un beneficio terapéutico, realizamos una curva dosis respuesta. Evaluamos el efecto de 3 dosis de pramipexol sobre el uso de la PDC en la PC. Los animales con lesión moderada intraestriatal presentaron una aquinesia de la PDC inducida por la inyección de 6-OHDA en el cuerpo estriado. Esta deficiencia en el uso de la PDC, evaluada mediante la PC fue establecida como un porcentaje de uso de la PDC menor al 25%. Esta deficiencia observada forma parte de uno de los criterios establecidos para seleccionar los animales con lesión moderada (ver *Resultados, Capítulo I*). Por lo tanto, el beneficio terapéutico inducido por el tratamiento farmacológico, en nuestro modelo, fue determinado como un porcentaje de uso de la PDC mayor al 25% en la PC.

De las 3 dosis evaluadas, observamos que a partir de la dosis de 2,5 mg/kg/día de pramipexol, un alto porcentaje de animales mejoró la aquinesia de la PDC, utilizando la misma por encima del 25% en la PC de noche (**Figura 18**).

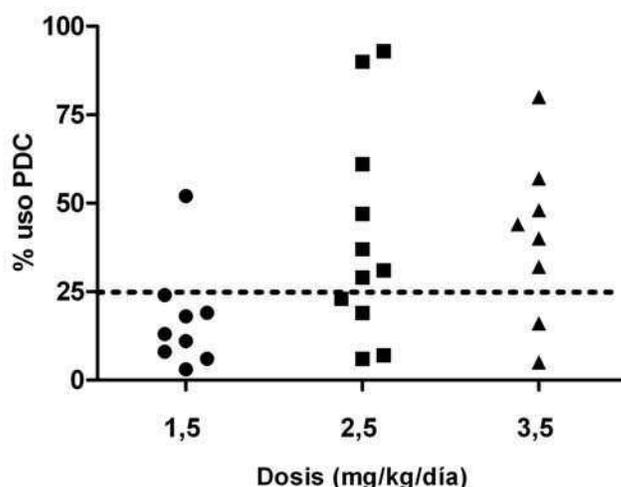


Figura 18: Curva dosis respuesta de pramipexol. Respuesta de los animales con lesión moderada en la PC bajo efecto del tratamiento con 3 dosis de pramipexol. Dosis (mg/kg/día): porcentaje de animales que presentaron un porcentaje de uso de la PDC mayor al 25%; 1,5: 11% (n = 9); 2,5: 63% (n = 11); 3,5: 75% (n = 8). La línea de puntos indica el umbral de selección de los animales lesionados.

Elegimos la dosis de 3,5 mg/kg/día para los experimentos siguientes. La elección de esta dosis se basa en asegurar la respuesta terapéutica de pramipexol debido a la variabilidad en la ingesta de la dosis que involucra el modo de administración de los fármacos utilizado. Por lo tanto, la dosis de 3,5 mg/kg/día es una dosis mayor a la mínima dosis (2,5 mg/kg/día) capaz de inducir una disminución de la aquinesia de la PDC. Los animales que mejoraron el uso de la PDC bajo el tratamiento con 3,5 mg/kg/día de pramipexol (n=6) presentaron un porcentaje promedio de uso de la PDC de 50 ± 7 (media \pm S.E.M.). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de uso de la PDC en la PC entre los grupos 2,5 y 3,5 mg/kg/día (**Figura 19**).

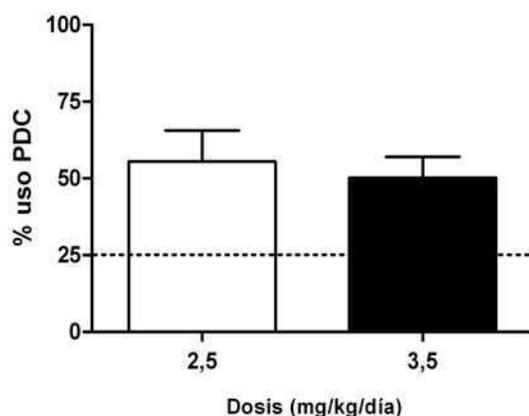


Figura 19: Porcentaje de uso de la PDC en la PC. Respuesta de los animales que mejoraron el uso de la PDC bajo el tratamiento con pramipexol 2,5 mg/kg/día (n=7) y con pramipexol 3,5 mg/kg/día (n=6). Media \pm S.E.M. Prueba de t para muestras independientes, $p > 0,05$. La línea de puntos indica el umbral de selección de los animales lesionados.

Evaluación del efecto de levodopa y pramipexol sobre el uso de la PDC en la PC

A continuación, para determinar si las dosis de levodopa y pramipexol elegidas resultaron equivalentes, comparamos el efecto sobre la aquinesia de la PDC en la PC del tratamiento con 3,5 mg/kg/día de pramipexol con el de 170 mg/kg/día de levodopa. Los grupos experimentales fueron Normal Agua (NA), Lesión Agua (LA), Lesión Levodopa (LL) y Lesión Pramipexol (LP). Estos grupos serán los grupos experimentales de interés determinados según el diseño del experimento de microarreglos. En el gráfico se muestran para los grupos LL y LP los datos de los animales seleccionados que mostraron una disminución de la aquinesia de la PDC bajo efectos de los tratamientos.

El tratamiento con levodopa y con pramipexol produjo una disminución de la aquinesia de la PDC en comparación con el grupo LA. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de uso de la PDC entre los grupos LL y LP. Como era de esperarse, no se observó una preferencia en el uso de la PDC en el grupo NA (uso de la PDC alrededor del 50%) (**Figura 20**).

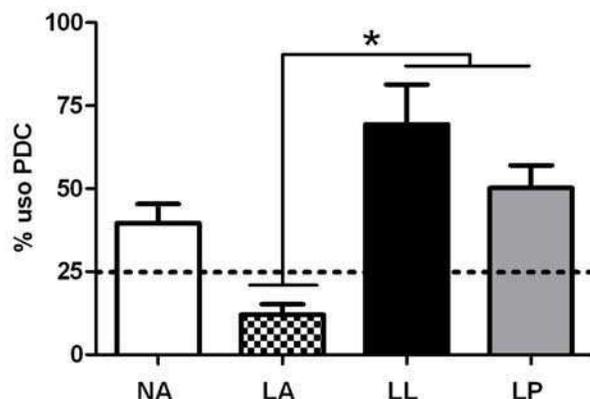


Figura 20: Prueba del cilindro bajo tratamiento de los 4 grupos experimentales. Media ± S.E.M. Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de comparaciones múltiples de Dunn; * $p < 0,05$ (NA, $n = 5$; LA, LL y LP, $n = 6$). La línea de puntos indica el umbral de selección de los animales lesionados.

Para determinar el grado de desnervación dopaminérgica alcanzado por la lesión entre los grupos experimentales lesionados analizamos el porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN. No hubo diferencias en el grado de desnervación de los animales entre los grupos lesionados (LA, LL y LP) (**Figura 21**).

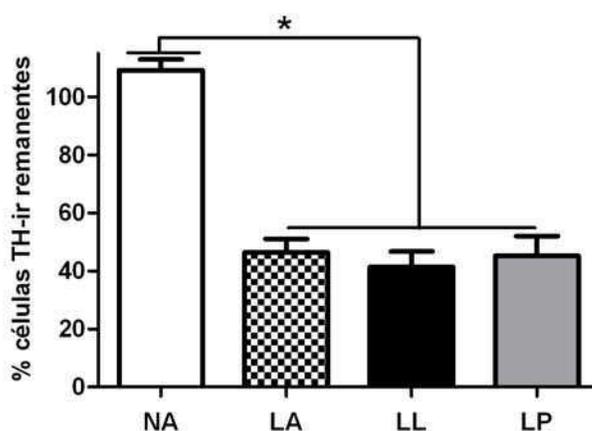


Figura 21: Porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN de los animales correspondientes a los cuatro grupos experimentales. Media ± S.E.M. Análisis de la varianza de un factor, seguido de prueba de comparaciones múltiples de Tukey, * $p < 0,05$ (NA, $n = 5$; LA, LL y LP, $n = 6$).

Evaluación del efecto de las dosis de los fármacos sobre el desarrollo de disquinesias

Durante la evaluación del uso de la PDC en la PC bajo efecto de los tratamientos con levodopa y con pramipexol se observó minuciosamente a los animales a fin de determinar la posible inducción de disquinesias por parte de los fármacos. En ningún caso se observó el desarrollo de disquinesias bajo efecto de la dosis de levodopa o de las dosis de pramipexol evaluadas.

DISCUSIÓN

Establecimos un protocolo de administración de levodopa y de pramipexol por vía oral. Las drogas se administraron disueltas en el agua de bebida de los animales. La dosis de pramipexol de 3,5 mg/kg/día fue seleccionada dado que indujo una respuesta terapéutica comparable a la de 170 mg/kg/día de levodopa, dosis que fue utilizada en trabajos previos del grupo (Ferrario y col., 2004). Por lo tanto, ambas dosis seleccionadas fueron capaces de inducir una disminución de la aquinesia de la PDC, determinada, en nuestro modelo, como un porcentaje de uso de la PDC mayor al 25% en la PC durante el período de oscuridad.

El beneficio terapéutico evaluado según la PC parecería ser una respuesta aguda inducida por ambos tratamientos, ya que la mejoría en el uso de la PDC no se mantiene, por ejemplo, a lo largo de una noche, sino que dicha respuesta se observa en un período de tiempo durante la misma y depende de la toma de líquido. Esta respuesta, en aquellos animales en los que se observa una disminución de la aquinesia, aumenta gradualmente, llega a un máximo y luego disminuye hasta desaparecer durante una noche de testeo (no se muestran los datos). La respuesta máxima obtenida posiblemente se deba a un pico de dosis, el cual depende de la cantidad de líquido ingerida por cada animal. El valor que se grafica es el promedio, entre los animales en los que el tratamiento resultó efectivo, del valor máximo obtenido en cada noche de testeo.

En base a datos bibliográficos, la duración del tratamiento fue fijado en 3 semanas. Con estas características el tratamiento es considerado un tratamiento crónico (Medhurst y col., 2001; Ferrario y col., 2003; Napolitano y col., 2006; Marin y col., 2007; Marin y col., 2008). Este tiempo fue suficiente para garantizar que los animales se adapten al tratamiento y para analizar el posible desarrollo de disquinesias. En nuestro modelo animal y con las dosis utilizadas no se observaron disquinesias en ningún animal. La ausencia de disquinesias podría deberse al grado de desnervación dopaminérgica (Paillé y col., 2004), a la dosis y al modo de administración de los fármacos en estudio (revisado por Sharma y col., 2010).

El período de lavado se estableció en 24 horas para garantizar que los efectos observados en la última etapa de este trabajo de tesis sobre la expresión de genes se

deban a efectos debidos al tratamiento prolongado y no debido a efectos agudos de los fármacos.

CAPÍTULO III

Expresión génica inducida por el tratamiento con levodopa y con pramipexol en el estriado desnervado de animales con lesión moderada de la vía nigroestriatal

CONSIDERACIONES PRELIMINARES

Levodopa y pramipexol son dos fármacos de uso frecuente en la terapéutica de la EP, cuya administración presenta ventajas y desventajas (**Tabla 9**):

	Levodopa	Pramipexol
Acción farmacológica	Metabolito de la síntesis de DA → estimula receptores para DA	Agonista de los receptores para DA de la familia D2, mayor afinidad por los RD ₃
Eficacia anti-parkinsoniana	No depende de la progresión de la enfermedad	Depende de la progresión de la enfermedad
Otros efectos	Neurotoxicidad? Neuroprotección?	Antidepresivo Neuroprotección?
Movimientos involuntarios anormales o disquinesias	Alta inducción	Nula o baja inducción
Otros efectos adversos	Náuseas, vómitos, anorexia	Somnolencia, trastorno en el control de los impulsos (por ejemplo: juego compulsivo)
	↓ Alucinaciones, ideación anormal, psicosis ↑ Episodios hipotensivos ortostáticos	

Tabla 9: Ventajas y desventajas del tratamiento con levodopa y con pramipexol (Perez-Lloret y Rascol, 2010).

Desde su introducción, levodopa continúa siendo la terapia farmacológica de elección en la clínica de la enfermedad, aunque en los últimos años se ha tendido a retrasar el inicio del tratamiento con la misma. En un primer momento dicho retraso se basaba en la hipótesis, sólo corroborada en estudios *in vitro* (Mytilineou y col., 1993; Basma y col., 1995), de que levodopa podría ser tóxica para las neuronas dopaminérgicas remanentes en la SN, debido a su metabolismo (y al de DA) altamente oxidativo (Cheng y col., 1996). Actualmente, el retraso en la introducción de levodopa se basa en evitar o retrasar la aparición de los efectos adversos. Debido a la relevancia de estos efectos adversos, constituidos en su mayoría por movimientos involuntarios anormales o disquinesias, se han publicado numerosos trabajos sobre los efectos funcionales y moleculares de levodopa en modelos animales de disquinesias (revisado por Santini y col., 2008; por Berthet y Bezard, 2009; por Pisani y Shen, 2009). Sin embargo, dichos efectos de levodopa subsisten más allá de la discontinuidad del tratamiento, ya que la severidad de las disquinesias no disminuye con la suspensión

temporal del mismo (Rascol, 2000b). Este hecho refleja efectos y adaptaciones de larga duración que involucran cambios en la expresión de genes (revisado por Canales y Graybiel, 2000b; por Damier, 2000; por Linazasoro, 2005).

Respecto de pramipexol, existen fuertes evidencias clínicas que lo relacionan con una menor inducción de disquinesias (PSG, 2000) pero su potencia terapéutica es menor que la de levodopa y, por lo tanto, en general se lo utiliza en etapas tempranas de la enfermedad (Holloway y col., 2004; revisado por Constantinescu, 2008). Además, a pramipexol se le han atribuido acciones neuroprotectoras, *in vitro* e *in vivo*, las cuales ejercería a través de diferentes mecanismos (anti-apoptóticos, antioxidantes, antitóxicos e inducción de factores neurotróficos), aunque los estudios al respecto en pacientes no son concluyentes (revisado por Constantinescu, 2008).

La regulación de genes en distintos aspectos relacionados con la EP ha sido estudiada utilizando la tecnología de microarreglos (en modelos animales, en tejidos post mórtem de pacientes, en animales y pacientes bajo el efecto del tratamiento con levodopa, entre otros). Además, también se ha estudiado la regulación a nivel proteico (proteoma: conjunto de proteínas expresadas en un momento dado bajo una determinada condición) y su relación con el desarrollo de disquinesias. Sin embargo, hasta la fecha no existen trabajos en los que se haya analizado el efecto del tratamiento con pramipexol sobre la regulación de genes *in vivo*.

En vista de la importancia de las terapias farmacológicas en la clínica de la EP, del amplio uso de levodopa y de pramipexol y de las grandes diferencias, clínicas y farmacológicas, que existen entre ambos fármacos, nos propusimos estudiar los efectos de dichos fármacos a nivel de la expresión de genes. Para estudiar dichos efectos y adaptaciones inducidos por los tratamientos utilizaremos la *tecnología de los microarreglos de ADN*, la que permite evaluar la expresión de miles de genes simultáneamente. En este trabajo utilizamos el recurso bioinformático DAVID para el análisis de ontología de genes y la visualización de las vías KEGG enriquecidas (ver más adelante en esta sección). Como fuese oportunamente mencionado en la introducción de esta tesis, los microarreglos de ADN no dejan de ser una herramienta de primera aproximación cuyo principal valor es el de permitir elaborar nuevas hipótesis y el de identificar elementos inesperados. De esta manera, esperamos que los genes que se expresan/modifican su expresión bajo efecto de los tratamientos a largo plazo, en el

estriado desnervado de aquellos animales en los cuales el tratamiento resulte efectivo, den indicios sobre su relación con i) el/los mecanismo/s por el cual los fármacos ejercen su acción farmacológica, ii) la respuesta motora anti-parkinsoniana, iii) los posibles mecanismos de neuroprotección/indemnidad celular y/o iv) los cambios moleculares que subyacen al desarrollo de disquinesias.

El uso de la expresión génica como herramienta de estudio de primera aproximación

Desde el descubrimiento de los mecanismos de transcripción y traducción, el análisis de la expresión de los genes, ya sea a nivel del ARNm o a nivel de proteínas, se convirtió en una metodología de estudio de utilización imperativa en todas las áreas biológicas.

El estudio de expresión de genes involucra una gran variedad de métodos, entre ellos los microarreglos de ADN para el análisis de expresión del ARNm. Esta técnica es una herramienta poderosa para estudiar la actividad de una enorme cantidad de genes simultáneamente, permitiendo obtener conclusiones sobre las funciones y la importancia de genes específicos y vías moleculares, en distintas condiciones fisiológicas y celulares (revisado por Walker y Hughes, 2008). Cabe resaltar que si bien el ARNm es, por supuesto, un intermediario en la síntesis de proteínas a partir de la información codificada en el ADN, en la mayoría de los casos es razonable asumir que los niveles de ARNm son representativos de los niveles proteicos.

Mientras que el genoma es común a todas las células de un organismo y es, en general, estático durante toda la vida del mismo, el transcriptoma (conjunto de todos los ARN que se expresan en un momento dado bajo una determinada condición) es altamente dinámico y cambia en respuesta a estímulos externos y en situaciones de enfermedad o patológicas. La terminología “perfil de expresión de ARNm” se utiliza para el análisis del transcriptoma mediante la cuantificación simultánea de los niveles de ARNm expresados a partir de un gran número de genes. El tamaño y la complejidad de esta información excede ampliamente aquella que se puede obtener usando técnicas tradicionales como el análisis por *Northern blot* o por RT-PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR, revisado por Walker y Hughes, 2008).

Los microarreglos han sido descritos como un arreglo (en inglés, *array*) ordenado de elementos microscópicos sobre una superficie plana (soporte sólido) que permite la unión específica de genes o productos de genes. Requiere que todos los elementos analíticos (gen o productos génicos) tengan una ubicación única en la superficie y que estén organizados en una configuración uniforme y equidistante. Esto permite una identificación precisa durante el análisis subsecuente (revisado por Chaudhuri, 2005). Se han desarrollado distintos tipos de microarreglos que varían según la naturaleza del material **sonda** anclado al soporte del mismo, el cual puede ser ADNc, ARNm, proteínas, pequeñas moléculas (oligonucleótidos), tejidos o cualquier otro material que permita el análisis cuantitativo de genes. Los *microarreglos de oligonucleótidos* consisten en conjuntos de sondas de oligonucleótidos, generalmente de 25 nucleótidos de longitud, que representan miles de genes y que son sintetizados directamente (*in situ*) sobre un soporte sólido por fotolitografía. Para cada gen, hay entre 11 y 20 pares de sondas de oligonucleótidos diferentes. Cada par de sondas pertenece a un conjunto de sondas de una molécula de ARN producida por un gen.

Un par de sondas consiste en una secuencia sentido y una secuencia antisentido. Múltiples sondas son utilizadas para cada gen para distinguir entre hibridación específica e inespecífica. El primer tipo de sonda de cada par se conoce como *perfect match* (PM) y son 25 bases tomadas de la secuencia génica. El segundo tipo de sonda se conoce como *mismatch* (MM) y es creada cambiando la base número 13 de la secuencia PM para reducir la tasa de unión específica del ARNm para ese gen. El objetivo de los MM es controlar la variación experimental y la unión inespecífica de ARNm de otras partes del genoma. Estas dos sondas, PM y MM, son un par de sondas (**Figura 22**).

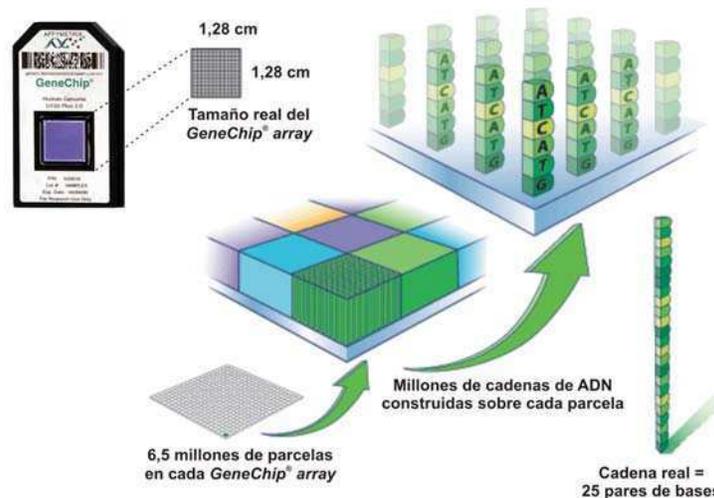


Figura 22: Tecnología de microarreglos. (A) Imagen de un chip (soporte sólido) de *Affymetrix*. (B) Esquema simplificado que representa la estructura de un chip de microarreglo.

Las muestras de ARN (el **blanco**) se preparan, se marcan (radioactivamente o mediante fluorescencia) y se hibridan con el *array*. Los *arrays* son escaneados y las imágenes son producidas y analizadas para obtener un valor de intensidad para cada sonda. El promedio de las diferencias PM-MM para todos los pares de sondas de un conjunto de sondas es usado como índice de expresión para el gen de interés (revisado por Suárez y col., 2009).

Los experimentos de microarreglos son en general complejos, generan una inmensa cantidad de datos y requieren un planeamiento cuidadoso. La calidad, integridad y pureza de la muestra de ARN blanco es de fundamental importancia para llevar a cabo el experimento con éxito. En la actualidad, mediante microcaptura por láser se logró aislar poblaciones de ARNm de regiones muy pequeñas, incluso de una sola célula, y por la alta capacidad de amplificación del ADNc que se ha logrado puede utilizarse la tecnología de microarreglos para compararlas (Mikulowska-Mennis y col., 2002; Kamme y col., 2003).

Esta tecnología es muy valiosa para identificar novedosos mecanismos en la regulación de la producción de proteínas y para refinar los conocimientos sobre vías moleculares conocidas en el contexto de la proteómica y del metaboloma (conjunto de metabolitos que se pueden encontrar en una muestra biológica en un momento dado bajo una dada condición). También favorece el descubrimiento de genes sensibles a drogas y de las subestructuras químicas asociadas a respuestas genéticas específicas. Las aplicaciones clínicas actuales incluyen el desarrollo de biomarcadores para la clasificación en subgrupos de enfermedad y el monitoreo de la progresión de la misma (revisado por Verducci y col., 2006). Las áreas de aplicación dentro de las ciencias humanas son variadas e incluyen endocrinología, microbiología, inmunología, oncología, toxicogenómica, desarrollo, genética y gerontología (revisado por Mello-Coelho y Hess, 2005).

Dentro de los objetivos del uso de microarreglos se incluyen los enumerados en la **Tabla 10**:

<i>Perfil de expresión de genes:</i> comparación del nivel de expresión de genes bajo diferentes condiciones, como salud y enfermedad, luego de distintas intervenciones terapéuticas y siguiendo la exposición a drogas y a radiación.
<i>Localización de la expresión de genes:</i> identificación de genes únicos relacionados con diferentes organelas subcelulares y tejidos.
<i>Función génica:</i> análisis del comportamiento de genes en relación a vías metabólicas específicas como señalización celular y apoptosis.
<i>Caracterización génica:</i> caracterización de genes en un organismo y comparación con un organismo de referencia.
<i>Polimorfismos de un único nucleótido:</i> detección de diferencias en nucleótidos únicos entre muestras genómicas obtenidas de organismos similares.

Tabla 10: Aplicaciones de la técnica de microarreglo (revisado por Chaudhuri, 2005).

Análisis e interpretación de los datos de un experimento de microarreglos

Luego de la hibridación de los *arrays*, los mismos se visualizan obteniendo una imagen digitalizada mediante un escáner óptico (**Figura 23**).

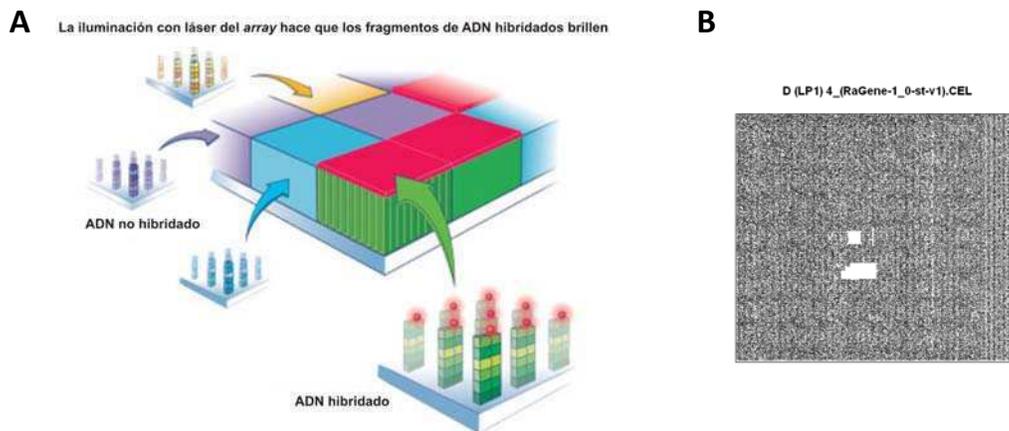
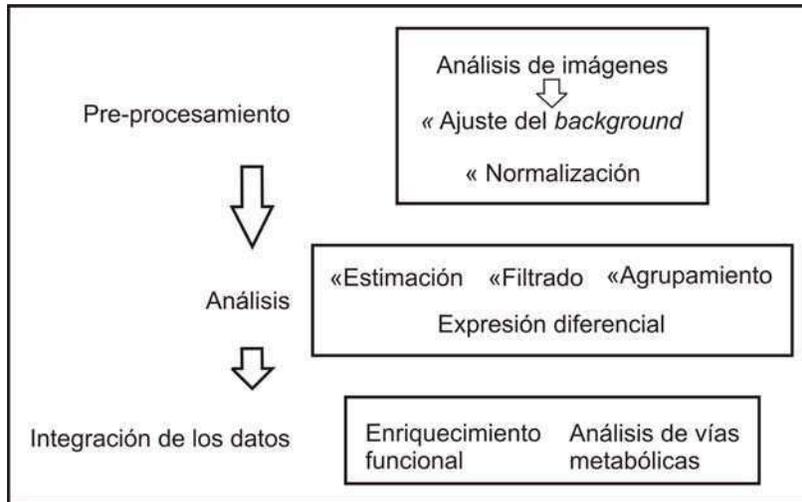


Figura 23: Tecnología de microarreglos. (A) Esquema que representa la hibridación de la muestra marcada sobre el chip. (B) Imagen obtenida de un microarreglo de rata luego de la hibridación y la digitalización de la imagen.

Estas imágenes deben ser sometidas a la corrección del fondo (en inglés, *background*) para ajustar las uniones inespecíficas, la fluorescencia de otros químicos, etc. En el siguiente paso de la etapa de pre-procesamiento, los nuevos datos corregidos son normalizados para ajustar las diferencias que no son de naturaleza biológica sino más bien de naturaleza técnica, y resumidos, de tal modo que los valores normalizados de las múltiples sondas para el mismo gen son combinados en un único valor representando el nivel consenso de expresión de cada gen.

Luego del pre-procesamiento, los pasos siguientes comprenden la determinación de cuales genes son expresados diferencialmente, y la anotación de aquellos con una descripción funcional asignada (**Esquema 4**).



Esquema 4: Metodología general del análisis e interpretación de los datos de un experimento de microarreglos.

Visualización de la expresión génica: gráficos Heatmaps

Las matrices de expresión, por su alta dimensionalidad y por la complejidad de los análisis, son un reto interesante para la visualización de información. En una matriz de expresión hay tres entidades principales involucradas: genes, condiciones y niveles de expresión. Además, es interesante visualizar patrones de comportamiento en la expresión de determinados grupos de genes. Una de las técnicas de visualización fundamentales para la representación de matrices de expresión y su estructura es el mapa de calor o *heatmap*.

Un *heatmap* es una representación 2D de la matriz, donde las filas representan genes y las columnas condiciones (o viceversa) (**Figura 24**). Cada nivel de expresión se representa como un cuadrado de color en la posición correspondiente a su gen y a su condición. El color depende del nivel de expresión, y suele seguir una escala bi o tri-color, típicamente de rojo (baja expresión) a negro (expresión media) y a verde (alta expresión). La interacción con el *heatmap* suele permitir cambiar las escalas de colores, reordenar en función de grupos, hacer zoom sobre la matriz, distorsionar ciertas áreas, buscar por nombres genes o condiciones, entre otras aplicaciones. La visualización de

patrones se obtiene reordenando los elementos de la matriz según, por ejemplo, los grupos encontrados por algún método de análisis (Wilkinson y Friendly, 2009).

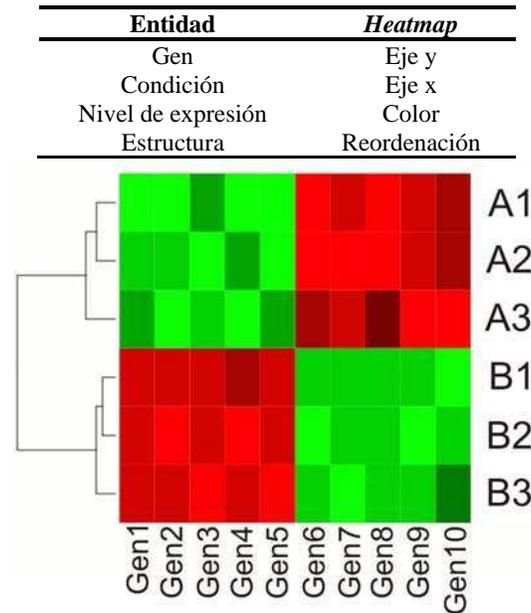


Figura 24: Esquema representativo de un heatmap y las entidades del mismo. En este caso cada fila representa una condición (A o B). A1-A3 serían réplicas biológicas de la condición A, mientras que B1-B3 serían réplicas biológicas de la condición B. Cada columna representa un gen (gen1-gen10). Cada casilla de color representa el nivel de expresión del gen, por ejemplo, el color verde indica un alto nivel de expresión y el color rojo un bajo nivel de expresión. El árbol de barras sobre la izquierda del heatmap da idea de cuan parecidas son dos o más muestras entre sí, según el comportamiento de los genes determinados como diferenciales. Así es que las muestras A1 y A2 son más parecidas entre sí que la A3, y a su vez, todas las muestras de la condición A son más parecidas entre sí que las muestras de la condición B, respecto de los niveles de expresión de los 10 genes en todas las muestras.

Caracterización funcional: Ontología de genes

La ontología de genes (GO, del inglés, *gene ontology*) es lo primero en lo que se piensa cuando se pretende extraer genes de una lista y darles sentido en un contexto biológico (Werner, 2008). Una ontología es una estructura formal de conocimiento. Consiste de universos (entidades, clases, conceptos o términos) y de la relación entre ellos. Es una base de datos curada por expertos que asigna los genes a varias categorías funcionales (Thomas y col., 2007). Es una gran herramienta para conocer qué genes de una lista pertenecen juntos a términos de una de las ramas GO, a saber: *función molecular*, *proceso biológico* y *componente celular*. Existen tres vocabularios GO

estructurados y controlados (ontologías), cada uno provee un tipo de información específica sobre un gen o una proteína: 1) su función molecular, 2) el proceso biológico en el que está involucrado y 3) el compartimento celular donde actúa (Lomax, 2005).

La anotación funcional de genes es una forma de capturar lo que se sabe sobre ese gen. Estas anotaciones proveen cada vez más información para los investigadores, pero si las diferentes especies se anotan en diferentes bases de datos, ¿cómo podemos captar y usar esa información de la mejor manera? Haciendo de las anotaciones un conjunto común y compartido de vocabularios. El proyecto GO provee una herramienta poderosa para capturar y analizar esta información de manera independiente de la especie. Este proyecto es el resultado de un trabajo de colaboración que trata la necesidad de descripciones consistentes de productos de genes hechas en diferentes bases de datos. Hay tres aspectos necesarios para concretar este trabajo los cuales incluyen el desarrollo y mantenimiento de las ontologías en sí mismas, la anotación de los productos génicos (lo cual implica hacer asociaciones entre las ontologías y los genes y productos de genes en las bases de datos que colaboran) y, por último, el desarrollo de herramientas que faciliten la creación, el mantenimiento y el uso de las ontologías (<http://www.geneontology.org>).

El proyecto GO provee una ontología de términos definidos que representa las propiedades del producto génico. Como mencionamos precedentemente, la ontología cubre tres dominios: i) la función molecular, ii) el proceso biológico y iii) el componente celular. La ontología está estructurada como un gráfico acíclico directo y cada término tiene relaciones definidas con uno o más términos en el mismo dominio y a veces en otros dominios. El vocabulario GO está diseñado para ser neutro, desde el punto de vista de las especies biológicas e incluye términos aplicables a procariontes y eucariotes, a organismos simples o multicelulares.

Función molecular: describe actividades, como *actividades catalíticas* o *de unión*, que ocurren a nivel molecular. Los términos GO función molecular representan actividades más que entidades (moléculas o complejos) que realizan acciones y no especifica dónde o cuándo o en qué contexto dicha acción se lleva a cabo. Las funciones moleculares generalmente corresponden a actividades que pueden ser realizadas por productos de genes individuales, pero algunas actividades son realizadas por complejos ensamblados de productos génicos. Ejemplos de términos de función molecular amplios son *actividad catalítica*, *actividad de transportador*, o *unión*; ejemplos de términos más específicos son *actividad de adenilato ciclasa* o *unión al receptor Toll*.

Proceso biológico: describe una serie de eventos lograda por uno o más conjuntos ordenados de funciones moleculares. Son operaciones o grupo de eventos moleculares con un principio y fin definidos, pertinente al funcionamiento de unidades vivas integradas (células, tejidos, órganos, y organismos). Ejemplos de términos de grandes procesos biológicos son *proceso fisiológico celular* o *transducción de señales*. Ejemplos de términos más específicos son *proceso metabólico pirimidina* o *transporte alfa-glucósido*. Puede ser difícil distinguir entre un proceso biológico y una función molecular pero la regla general es que un proceso debe tener más de un paso diferente.

Un proceso biológico no es equivalente a una vía; hasta el presente GO no trata de representar la dinámica o la dependencia que requiere describir completamente una vía.

Componente celular: describe un componente de la célula o el ambiente extracelular pero con la condición de que es parte de algún objeto mayor. Esto puede ser una estructura anatómica, como por ejemplo, *el retículo endoplásmico rugoso* o *el núcleo*, o un grupo de productos génicos, como por ejemplo, *ribosoma*, *proteosomas* o un *dímero de proteínas*.

Hay dos maneras de continuar el análisis biológico más allá de la clasificación GO: yendo al nivel molecular, que incluye el análisis de redes regulatorias y promotoras, o empleando el vasto conocimiento acumulado en la literatura para llevar a cabo el análisis de vías. Las vías se enfocan en interacciones funcionales y fisiológicas entre genes, más que en utilizar la información GO de los genes individuales de cada vía. Por lo tanto, es interesante mapear la lista de los genes diferenciales sobre vías pre-compiladas para dilucidar cadenas de eventos completas a partir de los resultados de un experimento de microarreglos. No todos los mapas son igualmente adecuados para un análisis de microarreglos. Las vías metabólicas son controladas en gran medida por eventos basados a nivel de proteínas, no observables en los microarreglos ya que sólo se monitorean niveles estables de ARNm. Las cascadas de señalización basadas en quinasas tampoco involucran necesariamente cambios en los niveles de ARNm. El mejor caso para el análisis de vías basadas en resultados de microarreglos son aquellas que están directamente acopladas a la transcripción *de novo* (vías de señalización transcripcional). La mayoría de las herramientas para análisis de vías recaen sobre bases de datos pre-compiladas de estudios a gran escala de la literatura, lo que requiere la actualización constante debido al continuo crecimiento de la misma. Los esfuerzos de actualización de estas bases exceden los recursos de los grupos académicos involucrados, es por esto que la base de datos KEGG es la más comprometida con esta tarea convirtiéndose en la base más confiable y ampliamente utilizada por los investigadores (Werner, 2008).

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

Un gran reto en la era post-genómica es la representación computacional completa de la célula, el organismo, el ecosistema, y la biosfera, lo cual permitirá la predicción computacional de procesos celulares de mayor nivel de complejidad y comportamiento de organismos basándose en la información genómica y molecular. Siguiendo este objetivo se ha estado desarrollando un recurso bioinformático llamado KEGG como parte de un proyecto de investigación de los laboratorios Kanehisa en el Centro de Bioinformática y del Centro Genoma Humano de la Universidad de Kyoto (<http://www.genome.jp/kegg/>).

La base de datos KEGG PATHWAY es una colección de diagramas y gráficos dibujados manualmente, llamados *mapas de vías KEGG*, representando vías moleculares para metabolismo, procesamiento de la información genética, procesamiento de la información ambiental, otros procesos celulares, enfermedades humanas y desarrollo de drogas. Cada vía está identificada por 5 números precedidos de alguna de las siglas *map*, *ko*, *ec*, *rn*, y un código de tres o cuatro letras según el organismo. El mapa de vía se dibuja y se actualiza con la anotación que se muestra en la **Figura 25**. El mapa de vía sin colorear es la versión original, el cual es dibujado manualmente utilizando un programa llamado KegSketch. Los mapas con color son generados computacionalmente.

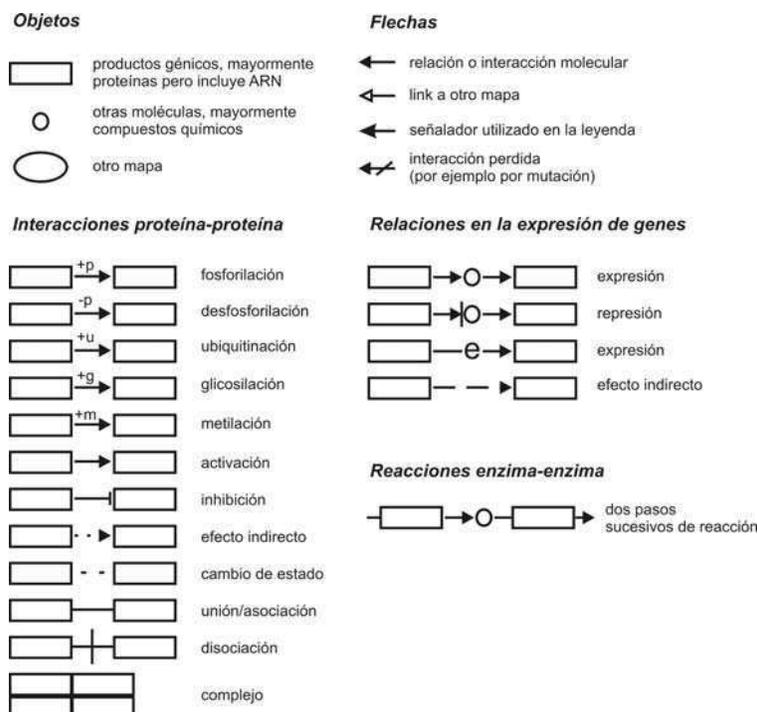


Figura 25: Mapas KEGG. Representaciones gráficas y leyendas de los elementos que forman parte de los mapas de las vías KEGG.

DAVID Bioinformatics (the database for annotation, visualization and integrated discovery)

El análisis de datos de una gran lista de genes es una tarea muy importante y necesaria para completar los experimentos de las tecnologías de alta transferencia y con esto poder comprender el significado biológico de las listas de genes resultantes. El análisis de tal volumen y complejidad de datos es una tarea desafiante, lo que requiere el apoyo de paquetes de programas especiales.

DAVID es un recurso bioinformático para mejorar el análisis de datos en la anotación funcional, particularmente en estudios de proteómica y de microarreglos (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). Este programa es capaz de extraer el significado o las características biológicas asociadas a largas listas de genes. DAVID, introducido en 2003, así como las numerosas herramientas similares disponibles, (GoMiner, Gostat, Onto-express, GoToolBox, FatiGO, GFINDER, GOBar y GSEA) trata varios aspectos del desafío del análisis funcional de extensas listas de genes. Aunque cada herramienta tiene distintas debilidades y fortalezas, todas adoptan una estrategia común para mapear sistemáticamente un gran número de genes de interés de una lista sobre la anotación biológica asociada a dichos genes (por ejemplo, los términos GO), y luego resaltar estadísticamente las anotaciones biológicas sobre-representadas (enriquecidas) de miles de términos asociados y contenidos. El análisis de enriquecimiento es una estrategia prometedora que incrementa la posibilidad de los investigadores de identificar los procesos biológicos más pertinentes a los fenómenos bajo estudio. El análisis de dichas listas de genes es de hecho, un procedimiento exploratorio, computacional, más que una solución puramente estadística (Huang da y col., 2009).

Validación de los resultados de los experimentos de microarreglos

La tecnología de microarreglos representa el punto de partida para la identificación de genes expresados diferencialmente bajo determinadas condiciones experimentales. Sin embargo, es necesario y conveniente confirmar la expresión

diferencial de aquellos transcritos que resultan de mayor interés mediante otras aproximaciones experimentales. Por lo tanto, el análisis masivo de la expresión génica habitualmente se complementa *a posteriori* con técnicas cuantitativas o semi-cuantitativas, tanto a nivel del ARNm (tales como qRT-PCR, hibridación *in situ*, o *Northern blot*) o bien de las proteínas codificadas por dichos ARNm (*Western blot* o inmunohistoquímica). La necesidad de validar mediante técnicas alternativas los resultados obtenidos de experimentos de microarreglos se debe a que la variación biológica entre individuos y las diferentes poblaciones génicas de interés pueden causar variación en los resultados de *arrays*. Esto puede dificultar la interpretación de los resultados, especialmente en aquellos casos en los que es complicado identificar las causas de la variación como las debidas a razones técnicas, a la variación biológica natural o a un resultado real. Por lo tanto, la reproducibilidad de un *array* a otro debe demostrarse respecto de la variación técnica y biológica, mientras que la veracidad de los resultados debe ser confirmada comparándolos con los resultados obtenidos por metodologías como *Northern blot* o qRT-PCR. Los pasos críticos en los cuales se introduce variación técnica son la hidridización (por ejemplo, debido a la pureza del ARN), la eficiencia de la amplificación del ADNc y el marcado, el lavado y la lectura. Por eso deben utilizarse controles positivos y negativos para controlar la calidad de la muestra y la performance técnica del *array*. Por último debe tenerse especial atención debe tenerse en la selección de los genes o del software utilizado para la normalización de los datos crudos así como en el método estadístico utilizado para evaluar dichos datos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

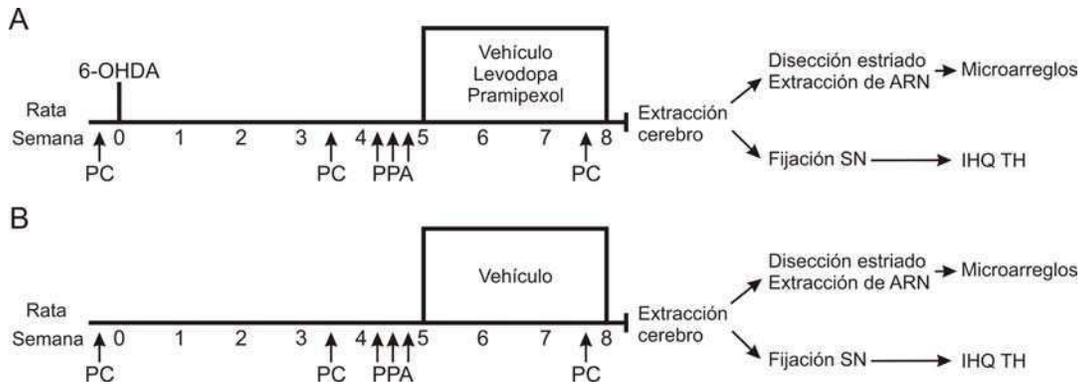
Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires) de entre 200 y 220 gr de peso corporal al inicio de los experimentos. Los animales se mantuvieron en grupos de 3 o 4 individuos por jaula, con libre acceso a comida y agua, en un ambiente con temperatura controlada ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y un período de 12 horas de luz-oscuridad, de acuerdo con las regulaciones locales (SENASA, Argentina). Todos los procedimientos que involucraron el uso de animales se realizaron en conformidad con las normativas de la comisión institucional local y la Guía para el Cuidado y Uso de los animales de Laboratorio (Publicación N°80-23/96, *National Institute of Health*, NIH, USA).

Lesión intraestriatal con 6-OHDA

La cirugía se realizó bajo un estado de anestesia inducido por ketamina (60 mg/kg, Ketamina 50, Holliday Scott, Argentina) y xylazina (10 mg/kg, Kensol, König, Argentina). Para prolongar el efecto de la anestesia durante el tiempo que insume la cirugía 10 minutos después de la dosis inicial se reforzó con 0,2 ml de ketamina por animal. El animal se colocó en un marco estereotáxico (Stoelting Co., USA) y se procedió a inyectar 8 μg de 6-OHDA (base libre, 6-OHDA-HBr Sigma o MP Biomedicals, USA), disuelta en 3 μl de 0,02% de ácido ascórbico en solución salina (NaCl 0,9%), por medio de una aguja 30G x 1". Las inyecciones se realizaron utilizando una bomba de infusión continua (Stoelting Co., USA), a una velocidad de 0,56 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ a la altura del estriado (**Sitio 1:** AP: 1,0 ML:+3,0 DV:-5,0; **Sitio 2:** AP:-0,1 ML: 3,7 DV:-5,0; **Sitio 3:** AP:-1,2 ML:+4,5 DV:-5,0), en el hemisferio izquierdo. Al término de cada infusión la aguja permaneció en el lugar durante un periodo de tiempo igual a la mitad del tiempo de infusión de la toxina para evitar el reflujo de líquido. Se suturó el sitio de la incisión. Los animales se colocaron en una cama térmica y se controlaron hasta recuperarse de la anestesia.

Protocolo experimental

Se utilizaron 3 grupos independientes de animales (réplicas biológicas o bloques) con lesión intraestriatal moderada. Se incluyeron en el experimento aquellos animales que utilizaron la PDC en la PC hasta un 25% y que a la vez realizaron hasta un máximo de 8 pasos, con la PDC en dirección izquierda, en la PPA. Los animales se alojaron de a 2 por jaula y fueron asignados al azar a cada grupo experimental. Los animales lesionados fueron sometidos al tratamiento por 3 semanas con levodopa/carbidopa 170/17 mg/kg/día (LL), pramipexol 3,5 mg/kg/día (LP) o vehículo (agua, LA). Las drogas se prepararon y se administraron como se detalló en la sección *Materiales y Métodos, Capítulo II*. Además, un cuarto grupo de animales normales fue tratado con vehículo como control (NA). Se realizó la PC bajo efecto del tratamiento durante la tercera semana del mismo. Los animales se decapitaron al cabo de las 3 semanas de tratamiento, luego de un período de lavado de los fármacos de 24 horas en promedio. Se disecó el estriado lesionado para extraer el ARN total. El mesencéfalo ventral, conteniendo la SN, se colocó en PFA para realizar la inmunohistoquímica para TH y determinar el grado de desnervación dopaminérgica de los animales (**Esquema 5**).



Esquema 5: Curso temporal del experimento. (A) Protocolo correspondiente a los animales lesionados con 6-OHDA. (B) Protocolo correspondiente a los animales normales. Estos protocolos se repitieron para cada réplica biológica. 6-OHDA: 6-hidroxidopamina; PC: prueba del cilindro; PPA: prueba de pasos de ajuste; ARN: ácido ribonucleico; SN: *substantia nigra*; IHQ TH: inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa.

Elección y preparación de las muestras del experimento de microarreglos

Se utilizaron tres réplicas biológicas o bloques. Los grupos experimentales fueron: Normal Agua (NA), Lesión Agua (LA), Lesión levodopa (LL) y Lesión Pramipexol (LP). Luego del tratamiento se seleccionaron al azar 4 animales de los grupos NA y LA de cada bloque. De los animales bajo tratamiento con levodopa y pramipexol se seleccionaron al azar 4 animales por bloque de entre aquellos en los que se observó una disminución de la aquinesia de la PDC en la PC (equivalente a un porcentaje de uso de la PDC mayor al 25%) bajo efecto de los fármacos. Se extrajo el estriado izquierdo y se realizaron *pools* de 4 para cada grupo de cada bloque (Napolitano y col., 2002), de los cuales se extrajo el ARN total y, luego del protocolo de preparación de la muestra, se hibridizó en un chip o microarreglo de ADN (**Figura 26**).

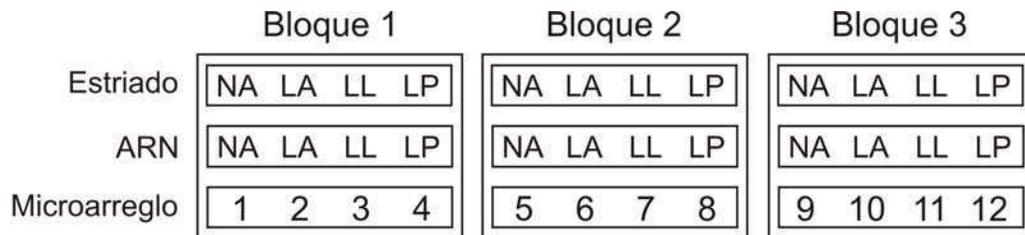


Figura 26: Diseño del experimento de microarreglos. NA: normal/agua; LA: lesión/agua; LL: lesión/levodopa; LP: lesión/pramipexol, ARN: ácido ribonucleico.

Obtención del tejido

Al cabo de las 3 semanas de tratamiento, y luego de un período de lavado de las drogas de 24 horas, los animales se sacrificaron por decapitación. Se extrajo el cerebro en fresco y se lo cortó coronalmente con bisturí a la altura del hipotálamo. El estriado lesionado o izquierdo se disecó a 4°C en menos de 3 minutos y se lo congeló inmediatamente a -80°C para, posteriormente, extraer el ARN total. El mesencéfalo ventral se colocó en PFA 4% durante 8 horas para el proceso de fijación por inmersión, cumplidas las cuales se crioprotegió en solución de sacarosa 30% en PB 0,1M por 48 horas. El tejido se cortó en un micrótopo de congelación en secciones coronales de 40 µm de espesor, las cuales se recolectaron en forma seriada en 5 tubos. Para corroborar el grado de deservación dopaminérgica de cada animal por inmunohistoquímica para TH se seleccionó un tubo al azar, de entre los 5 tubos.

Inmunohistoquímica para TH

La detección inmunohistoquímica fue realizada siguiendo el protocolo descrito en la sección *Materiales y Métodos, Capítulo I*, con algunas modificaciones debido a que el mesencéfalo ventral, conteniendo la SN, se disecó en fresco. La inhibición de la peroxidasa endógena se realizó con H₂O₂ 0,5% y la inhibición de las reacciones inespecíficas se realizó con suero normal de cabra 2%.

Bajo microscopio se procedió a contar el número de células TH-ir en 4 niveles de la SN de ambos hemisferios (4,80; 5,30; 5,80 y 6,04 mm posterior al bregma, según el atlas de Paxinos y Watson, 1986). Para determinar el grado de desnervación dopaminérgica de los animales, se sumaron los números de células de los cuatro niveles de cada hemisferio y se relativizó al hemisferio control, obteniéndose así un porcentaje de células TH-ir remanentes en el hemisferio lesionado por animal.

Extracción de ARN total

Los estriados lesionados o izquierdos (en el caso de los animales normales) disecados de las 3 tandas de animales se procesaron para el aislamiento y purificación del ARN total utilizando un kit para tejido lipídico (*Qiagen RNeasy Lipid Tissue Mini kit*, Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todos los reactivos mencionados fueron provistos en el kit. Durante todo el procedimiento se trabajó en condiciones libre de RNAsas. Cada *pool* de 4 estriados izquierdos (por grupo y por bloque) se homogenizó en 1 ml de QIAZOL en un homogenizador manual de 1,5 ml (Kontes, USA) y posterior paso por jeringa y aguja 23G. El homogenato se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 200 µl de cloroformo y se agitó por 15 segundos, incubándose por otros 2-3 minutos a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 12000 g por 15 minutos a 4°C. La fase acuosa superior, que contiene al ARN, se colectó en un tubo y se agregó un volumen de etanol 70%, otorgándole a la muestra las condiciones apropiadas para la unión a la membrana de la columna del kit. Salvo que se indique lo contrario en los pasos que siguen luego de cada centrifugación se descartó el eluído. La muestra se transfirió a una columna RNeasy y se centrifugó por 15 segundos a 8000 g. Para eliminar los contaminantes, se agregaron 700 µl de buffer RW1 y se centrifugó 15 segundos a 8000 g. Se agregaron 500 µl de

buffer RPE a la columna y se centrifugó por 15 segundos a 8000 g. Este paso se repitió y la muestra se centrifugó por 2 minutos a 8000 g. La columna se colocó en un nuevo tubo y el ARN de alta calidad fue eluido con agua libre de RNAsas por centrifugación a 8000 g por 1 minuto, obteniéndose un volumen final de 40 µl por muestra. Las muestras se conservaron a -70°C hasta su utilización.

Cuantificación y determinación de la calidad y pureza del ARN total

La concentración del ARN total en las muestras se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm (A260 nm) en un espectrofotómetro (Amersham). La pureza de las muestras (presencia de contaminantes que absorben en el espectro UV) se determinó midiendo la relación entre la absorbancia a 260 y a 280 nm (A260/280) y entre 260 y 230 (A260/230). Una relación de A260/280~2,0 es generalmente aceptada como indicativa de ARN “puro”. Una relación considerablemente menor puede indicar la presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes con una absorbancia alrededor de 280 nm. Los contaminantes orgánicos, como los fenoles y otros compuestos aromáticos, el TRIzol y algunos reactivos utilizados en la extracción de ARN absorben luz a 230 nm. Las muestras con una relación 260/230 menor a 1,8 tienen una presencia importante de contaminantes orgánicos que podrían interferir con otros procedimientos, como RT-PCR, disminuyendo su eficiencia. La integridad de la muestra se determinó por medio de electroforesis en gel de agarosa 1,2% y visualización de las bandas de ARN ribosomal 28S y 18S con bromuro de etidio en un transiluminador UV (Fotodyne, USA) (Figura 27).

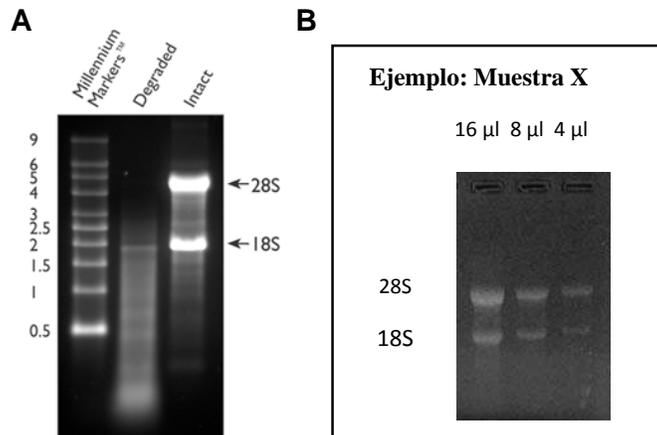


Figura 27: Determinación de la calidad y pureza del ARN total. (A) Las bandas de ARN ribosomal 18S y 28S son claramente visibles cuando la muestra de ARN está intacta. Una muestra cuyo ARN está degradado se visualiza como un chorreado de bajo peso molecular, como se puede observar en la calle central de la imagen. *Tomada de Applied Biosystems Website.* (B) Fotografía que ilustra una corrida de distintos volúmenes de una muestra de prueba de ARN extraída en nuestro laboratorio.

Las muestras de ARN cumplieron los siguientes requisitos para poder ser procesadas mediante la técnica de microarreglos: Concentración $\geq 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$; A260/280: 1,8-2,2; A260/230: 1-2 (**Tabla 11**).

Muestra	A230nm	A260nm	A280nm	A320nm	A260/230nm	A260/280nm	Cc ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
NA1	0,178	0,285	0,137	0,009	1,60	2,08	2,28
LA1	0,078	0,165	0,076	0,000	2,11	2,17	1,32
LL1	0,164	0,254	0,119	0,002	1,5	2,13	2,03
LP1	0,166	0,246	0,113	0,000	1,48	2,18	1,97
NA2	0,147	0,310	0,143	0,002	2,11	2,17	2,48
LA2	0,194	0,252	0,117	0,001	1,30	2,15	2,02
LL2	0,133	0,288	0,134	0,002	2,17	2,15	2,30
LP2	0,180	0,294	0,137	0,002	1,63	2,15	2,35
NA3	0,194	0,379	0,173	-0,004	1,95	2,19	3,03
LA3	0,179	0,355	0,165	0,003	1,98	2,15	2,84
LL3	0,250	0,427	0,224	0,051	1,71	1,91	3,42
LP3	0,183	0,384	0,180	0,004	2,10	2,13	3,07

Tabla 11: Datos correspondientes a las muestras destinadas al experimento de microarreglos. Dilución 1/20 en *buffer* Tris HCl 10 mM, pH 7,0. Paso óptico de la cubeta: 1 mm. Volumen final de muestra obtenido: 40 μl en agua libre de RNAsas. Cc: concentración.

Procesamiento de las muestras por la técnica de microarreglos

Los pasos de transcripción inversa, marcado e hibridación de las muestras para los microarreglos se llevaron a cabo por personal especializado en el Instituto de Investigaciones Fisiológicas y Ecológicas vinculadas a la Agricultura (IFEVA), en la Facultad de Agronomía de la UBA. El IFEVA cuenta con la plataforma Affymetrix.

El *GeneChip® Rat Gene 1.0 ST Array* es el último producto de la familia de *arrays* de expresión de Affymetrix que abarca el transcriptoma completo de rata. Cada uno de los 27342 genes está representado en el *array* por 26 sondas, aproximadamente, dispersas a lo largo de la longitud total del gen, garantizando un cuadro completo y

preciso de la expresión del mismo. Las moléculas de ADN sentido, son generadas a partir de 100 ng de ARN total. El *array* tiene un contenido de genes con la anotación más actualizada. El análisis de nivel de expresión de genes de múltiples sondas sobre diferentes exones es resumido en un valor de expresión representando todos los transcriptos del mismo gen. El diseño del *array* está basado en anotaciones de secuencias y genes obtenidas a partir de distintas bases de datos y agrupa sondas en un set de sondas a nivel de genes (**Tabla 12**).

Especificaciones	Rat Gene 1.0 ST Array
Número de <i>arrays</i>	1
Tamaño	5 µm
Longitud de las sondas de oligonucleótidos	25-mer
Número total de sondas distintas	722254
Cadena interrogada	Sentido
Número de sondas por gen (resolución)	26 (mediana)
Número estimado de genes	27342
Set de sondas a nivel de genes según <i>Ensembl</i>	26008
Set de sondas a nivel de genes con transcripto de longitud completa supuesta (<i>GenBank</i> y <i>RefSeq</i>)	9916
<i>Genome assembly</i>	Noviembre 2004 (UCSC rn4; Baylor HGSC build 3.4)
Transcriptos <i>RefSeq NM</i> curados y provisionarios, no predichos	Abril 3, 2007 (10084)
Transcriptos supuestos <i>GenBank</i> de longitud completa	Enero 25, 2007
Controles positivos (genes de expresión constitutiva)	399 set de sondas a nivel de exones putativos de genes supuestos
Controles negativos	1153 set de sondas a nivel de intrones supuestos de genes supuestos
Controles de hibridación	bioB, bioC, bioD, cre
Sondas del <i>background</i>	Set anti-genómico
Controles poly-A	dap, lys, phe, Thr
Cantidad de material	100 ng

Tabla 12: Características de los GeneChip® Rat Gene 1.0 ST Array.

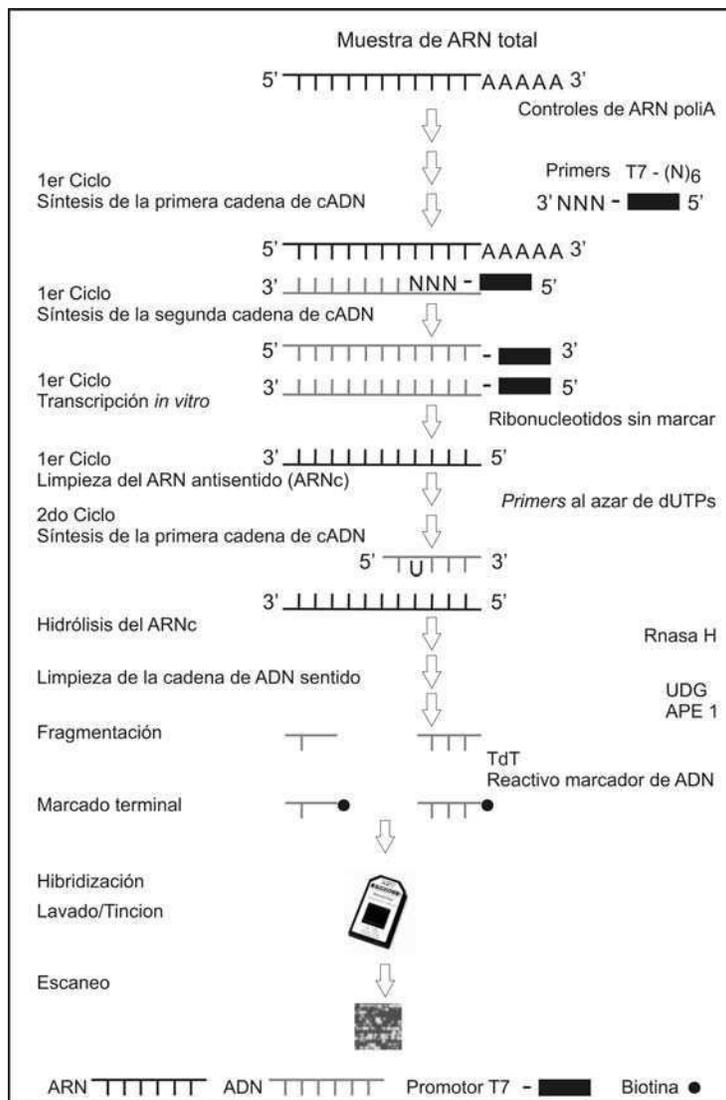


Figura 28: Descripción esquemática del protocolo de la técnica de microarreglos. Brevemente, a partir de 100 ng de ARN total se sintetizó el ADN doble cadena con hexámeros al azar marcados con una secuencia promotora de T7. La doble cadena de ADNc fue luego utilizada como molde y amplificada por la polimerasa de ARN T7 produciendo varias copias de ARNc *antisentido*. En el segundo ciclo de síntesis de ADNc, los hexámeros al azar fueron usados como cebadores de la transcripción inversa del ARNc del primer ciclo para producir ADN simple cadena en la orientación *sentido*. Para fragmentar en forma reproducible el ADN simple cadena y aumentar la robustez del ensayo se utilizó una técnica novedosa donde el dUTP es incorporado en el ADN durante la reacción de transcripción inversa de la primera cadena del segundo ciclo. Este ADN simple cadena fue luego tratado con una combinación de UDG (del inglés, *uracil DNA glycosylase*) y APE 1 (del inglés, *apurinic/aprimidinic endonuclease 1*) que específicamente reconocen los residuos dUTP no-naturales y rompen la cadena de ADN. El ADN fue marcado con TdT (del inglés, *terminal deoxynucleotidyl transferase*) con el *Affymetrix® proprietary ADN Labeling Reagent* que está covalentemente unido a biotina. Tomado y adaptado de *GeneChip® Whole Transcript Sense Target Labeling Assay Manual de Affymetrix®*.

Validación de los resultados del experimento de microarreglos por qRT-PCR

Para validar los resultados del experimento de microarreglos, seleccionamos un cierto número de genes diferenciales y realizamos el análisis de expresión por la técnica de qRT-PCR. Utilizamos el sistema de PCR en tiempo real 7500 y el Software 7500 v.2.0.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La técnica se realizó en un único paso usando el kit *Power SYBR® Green RNA-to-Ct™ 1-step*, siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El volumen final de cada reacción fue de 12,5 µl. La mezcla incluyó 6,25 µl de la mezcla RT-PCR (2x), 0,1 µl de la mezcla de la enzima RT (125x), y un volumen variable de los *primers* (*forward* y *reverse*) (Tecnolab S.A) y de agua ultrapura libre de nucleasas. La retrotranscripción se realizó a 48°C durante 30 minutos. Luego de la activación de la enzima 10 minutos a 95°C, se realizó la amplificación del amplicón en 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y de 1 minuto a 60°C. Se utilizaron 2,5 µl de la muestra de ARN. Por último, debido a la utilización del sistema de detección SYBR Green, se realizó la curva de disociación (en inglés, *melt curve*) al final de la etapa de amplificación para confirmar la especificidad del producto de PCR. (**Figura 29**).

Cada muestra se analizó por triplicado (réplicas técnicas). Por cada par de *primers* y cada concentración de los mismos realizamos un control sin muestra (NTC; del inglés, *non template control*), también por triplicado, para descartar la posible formación de dímeros de *primers*.

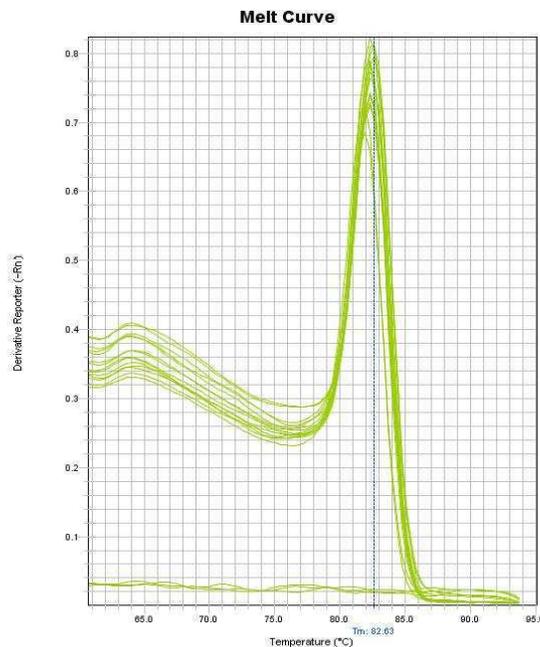


Figura 29: Curva de disociación. En esta imagen se muestra un ejemplo de la curva de disociación correspondiente a uno de los pares de *primers* diseñados para amplificar un fragmento de uno de los genes seleccionados. La amplificación del mismo amplicón en cada muestra y sus triplicados se observa como un único pico con un único Tm (temperatura de *melting*). Las curvas sin amplificación que se observan en la parte inferior del gráfico corresponden a los NTCs, corridos en paralelo, por triplicados.

El método de cuantificación que utilizamos fue el del $\Delta\Delta CT$ (Livak y Schmittgen, 2001). Este es un método de cuantificación del nivel de expresión del gen de interés relativo al nivel de expresión de un gen endógeno y relativo al nivel de expresión del gen de interés en una muestra designada como “calibradora”. Para tal fin, antes de cada experimento y luego de descartar la posible contaminación con ADN (control sin RT; debido al método de extracción de ARN), realizamos las curvas de rango dinámico para cada par de *primers* (**Figura 30**) para determinar la eficiencia de amplificación.

Las muestras de ARN fueron luego testeadas en el rango de concentración donde la pendiente de la curva estándar del gen de interés y del gen endógeno fue aproximadamente 3,3 (aceptamos el rango 3,1 a 3,5), que representa una eficiencia del $100 \pm 10\%$ (**Figura 31**).

En todos los casos el punto correspondiente a la muestra pura se eliminó de la curva estándar ya que en la curva de rango dinámico se observó saturación de la reacción.

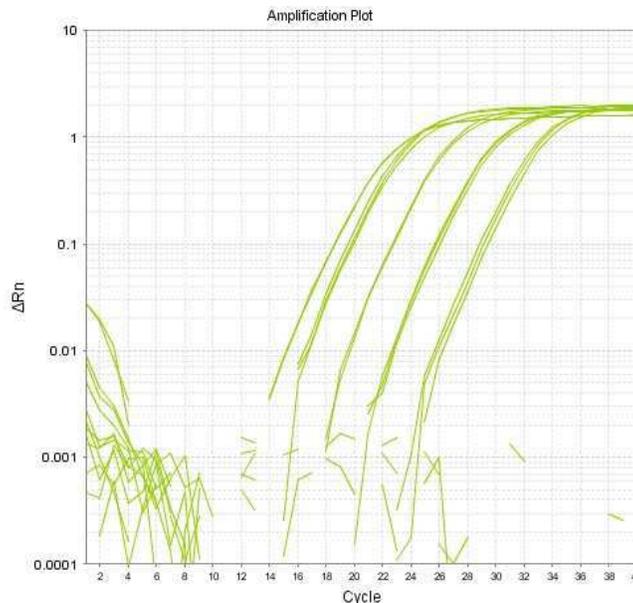


Figura 30: Curva de rango dinámico. Cada conjunto de curvas corresponden a la muestra pura y a diluciones al décimo de dicha muestra.

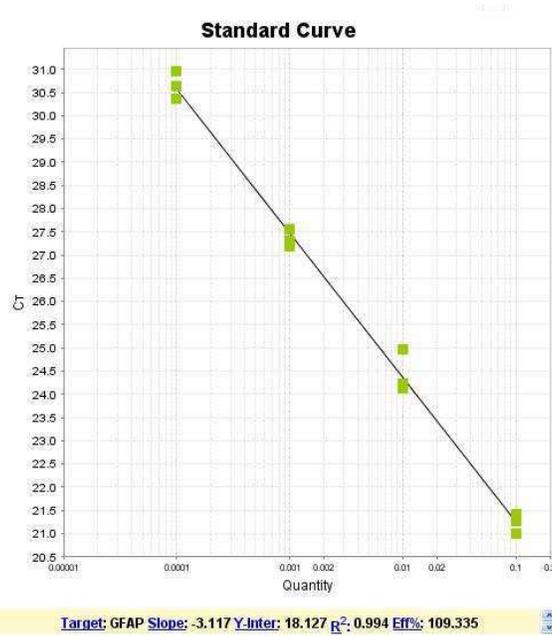


Figura 31: Curva estándar. Se grafican los CTs (del inglés, *cicle threshold*) correspondientes a cada dilución y se obtiene una recta, de la cual el programa calcula la pendiente y la eficiencia.

Las secuencias de los *primers* utilizados en esta etapa se pueden observar en la **Tabla 13**. A excepción de los *primers* utilizados para amplificar GFAP, el resto fue diseñado utilizando el programa Primer Express® versión 3.0.

Símbolo del gen	Cc (nM)	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
Nr4a2	100	TGC CTT CTC CTG CAT TGC T	GTT CCT TGA GCC CGT GTC TCT
Psm14	150	GGC TGA TTC ATC GCT GTG TCT	GCA GCG CCT CAC AAT CAA
GFAP	R 600 F 450	CAG AAG CTC CAA GAT GAA ACC AA	TCT CCT CCT CCA GCG ACT CAA C
Ndufa12	150	TGC CAC CCT CGA CAC CTT	CCC GGA AGT GCT AGG AAC AG
Olr1375	100	CTG CAC ACC GCC ATG TAC TT	GAG GAG AAG CAG ACA TCC ACA AA
Hprt	100	ACC CTC AGT CCC AGC GTC GT	CGA GCA AGT CTT TCA GTC CTG TCC A
GAPDH	400	CGG ATT TGG CCG TAT TGG	CAA TGT CCA CTT TGT CAC AAG AGA A

Tabla 13: Secuencias de los primers utilizados en los experimentos de validación. R: reverse primer, F: forward primer.

Los genes de interés evaluados por qRT-PCR fueron: **Nr4a2** (o **Nurr1**, *nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2*), **Psm14** (*proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14*), **GFAP** (*glial fibrillary acidic protein*) (Marie-Claire y col., 2004), **Ndufa12** (*NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 12*) y **Olr1375** (*olfactory receptor 1375*). Los genes endógenos utilizados fueron **HPRT** (hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa) y **GAPDH** (gliceraldehído-3-fosfato

deshidrogenasa) para determinar los niveles relativos de expresión de los genes diferenciales seleccionados. El aumento del cambio en la expresión se determinó con respecto al valor promedio de los valores de la muestra designada como “calibradora”, arbitrariamente definido como 1. La designación de una muestra como calibradora depende del gen analizado.

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism versión 5.00 para Windows. (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). En todos los casos un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Para el análisis de comparación entre los grupos NA, LA, LL y LP de la variable porcentaje de uso de la PDC en la PC bajo efecto de los tratamientos se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y, en caso de resultar en diferencias significativas, como prueba *post hoc* se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Para la variable porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN se utilizó el Análisis de la varianza de un factor (ANOVA), seguido de prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Cuando se comparó el porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN de todos los animales que mejoraron la aquinesia de la PDC en la PC de los grupos LL y LP se utilizó la prueba de t para muestras independientes, $*p < 0,01$.

El análisis de las imágenes, la normalización y el análisis estadístico de los datos se realizó en colaboración con el Dr. Elmer Fernández de la Universidad Católica de Córdoba. Brevemente, los valores de expresión a nivel de genes fueron obtenidos mediante la aplicación del algoritmo RMA (del inglés, *Robust Media Average*) (Irizarry y col., 2003). Para la determinación de los genes expresados diferencialmente entre las distintas condiciones experimentales se utilizó el estadístico "t" moderado (Smyth, 2004). Todos los algoritmos se corrieron en la plataforma R (www.r-project.org) con librerías de software de Bioconductor (www.bioconductor.org). Establecimos un valor límite del valor de $p < 0,05$ y un nivel de cambio o *fold change* $\geq 0,3$. El análisis de ontología de genes se realizó con la plataforma DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>).

RESULTADOS

RESULTADOS COMPORTAMENTALES

Efecto del tratamiento con levodopa y con pramipexol sobre el uso de la PDC en la PC

Analizamos el efecto de los fármacos sobre la aquinesia de la PDC en la PC durante la tercera semana de tratamiento. Del total de animales que fueron tratados con levodopa y pramipexol, el 73% y el 54% respectivamente, disminuyó la aquinesia de la PDC en la PC. De entre estos animales, seleccionamos al azar 12 por grupo y analizamos el porcentaje de uso de la PDC en la PC. Como esperábamos, levodopa y pramipexol produjeron una mejoría en el uso de la PDC, en comparación con el grupo LA; incluso se obtuvieron porcentajes promedios de uso de la PDC similares a los del grupo NA (**Figura 32 A**). Este patrón de comportamiento se observó en las tres réplicas biológicas (**Figura 32 B, C, D**).

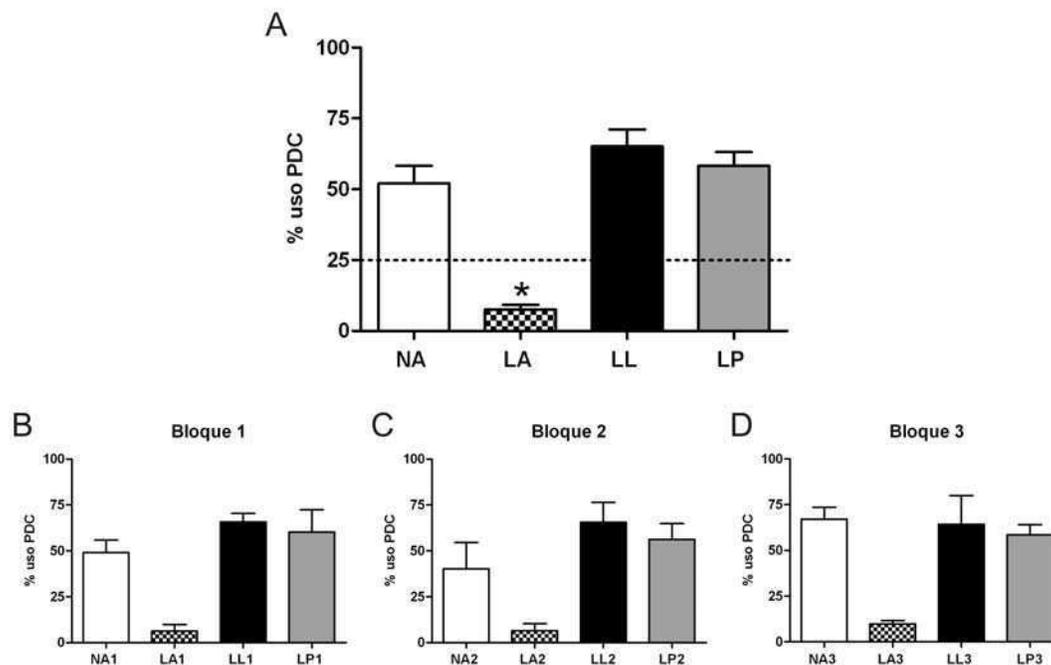


Figura 32: Prueba del cilindro bajo tratamiento. (A) Porcentaje de uso de la PDC en la PC bajo tratamiento de los animales seleccionados para el experimento de microarreglos de los grupos experimentales NA, LA, LL y LP. Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de comparaciones múltiples de Dunn; * $p < 0,05$ ($n = 12$ por grupo). (B, C, D) Porcentaje de uso de la PDC en la PC bajo tratamiento de los animales seleccionados para el experimento de microarreglos de cada bloque o réplica biológica ($n = 4$ por grupo experimental, por bloque). Media \pm S.E.M.

Al analizar el porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN, respecto del grupo NA, los 12 animales de los grupos LA, LL y LP, seleccionados para el experimento de microarreglos, presentaron una lesión moderada de la vía nigroestriatal como consecuencia de la administración de 6-OHDA en el estriado. Sin embargo, se obtuvieron diferencias significativas en el porcentaje de células TH-ir remanentes entre los grupos LL y LP (**Figura 33**).

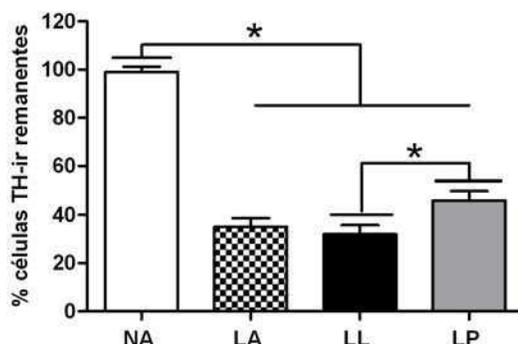


Figura 33: Porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN de los animales seleccionados para el experimento de microarreglos. Análisis de la varianza de un factor, seguido de prueba de comparaciones múltiples de Tukey, * $p < 0,05$ ($n = 12$ por grupo). Media \pm S.E.M.

La diferencia en el porcentaje de células TH-ir remanentes se observó en una muestra seleccionada para el experimento de microarreglos de los grupos LL y LP. Analizamos esta variable para todos los animales de los grupos LL y LP que mejoraron la aquinesia de la PDC en la PC, seleccionados o no para el experimento de microarreglos (**Figura 34**). Los resultados del análisis muestran que esta diferencia se mantuvo entre el total de los animales de los grupos LL y LP que mejoraron el uso de la PDC en la PC, seleccionados o no para el experimento de microarreglos.

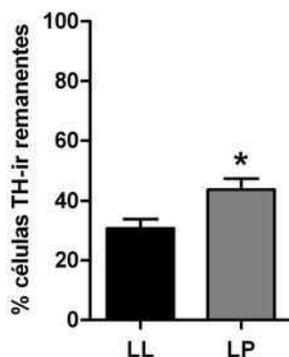


Figura 34: Porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN. En este gráfico se representan todos los animales que mejoraron la aquinesia de la PDC en la PC de los grupos LL y LP. Prueba de t para muestras independientes, * $p < 0,01$ (LL: $n = 16$, LP: $n = 15$). Media \pm S.E.M.

La diferencia hallada en el número de células TH-ir remanentes en la SN entre los grupos LL y LP promueve el planteo de varias hipótesis. Esta diferencia podría deberse a: i) un sesgo introducido en la asignación de los animales lesionados a los grupos experimentales (a pesar de que fueron asignados al azar), debido a la variabilidad en el grado de desnervación dopaminérgica, propio del modelo animal (efecto pre-tratamiento) o ii) a un efecto de las drogas sobre la supervivencia celular (efecto post-tratamiento). Ninguna de estas hipótesis puede ponerse a prueba con este diseño experimental, sin embargo disponemos de herramientas o evidencias que favorecen la discusión al respecto.

Si la razón de esta diferencia se debe a un sesgo introducido en la asignación al azar de los animales lesionados a los grupos experimentales entonces deberían observarse diferencias en el comportamiento de los animales antes del comienzo de los tratamientos. En particular, en nuestro modelo animal, el número de pasos en la PPA se correlaciona con el porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN (sección *Resultados, Capítulo I, Figura 17*). Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas en el número de pasos de ajuste con la PDC en la PPA entre los grupos LL y LP de los animales *seleccionados* para el experimento de microarreglos ($p=1,000$) (**Figura 35 A**), ni en el número de pasos de ajuste con la PDC en la PPA entre los grupos LL y LP de *todos* los animales lesionados asignados a dichos grupos experimentales ($p= 0,905$) que mejoraron el uso de la PDC bajo efecto de los fármacos (**Figura 35 B**).

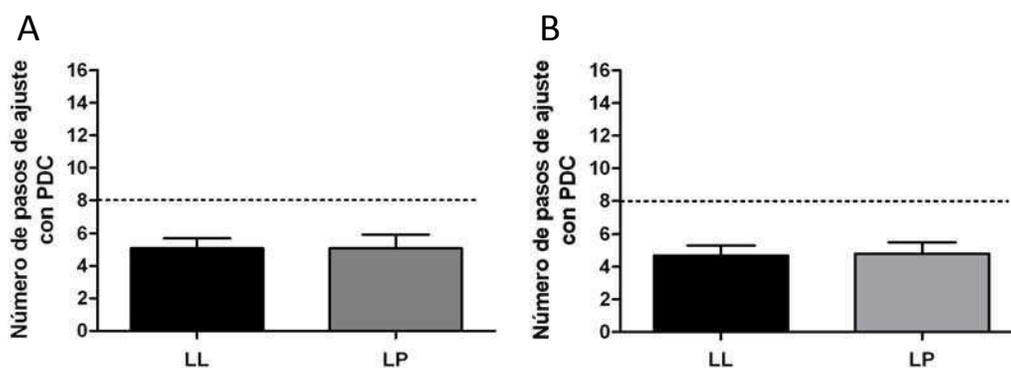


Figura 35: Prueba de pasos de ajuste antes del inicio de los tratamientos farmacológicos de (A) los animales seleccionados para el experimento de microarreglos (n=12 por grupo), (B) de todos los animales que mejoraron la aquinesia de la PDC bajo efecto de los tratamientos. Prueba de t para muestras independientes, $p>0,05$ (LL: n=16 y LP: n=15). Media \pm S.E.M.

Por lo tanto, podemos descartar que la diferencia en el porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN entre los animales desnervados tratados con levodopa o con pramipexol se deba a un sesgo introducido en la asignación al azar de los animales lesionados a los tratamientos.

De la observación de los datos crudos notamos una tendencia en los animales tratados con pramipexol: aquellos animales con mayor porcentaje de células TH-ir remanentes tenían un mayor porcentaje de uso de la PDC en la PC de noche. Por lo tanto analizamos la relación entre el porcentaje de células TH-ir remanentes y la respuesta en la PC bajo efecto de los fármacos. Graficamos ambas variables y realizamos un análisis de correlación (**Figura 36**). La respuesta en la PC frente al tratamiento con pramipexol se correlacionó de manera significativa con el porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN (**Figura 36 B**).

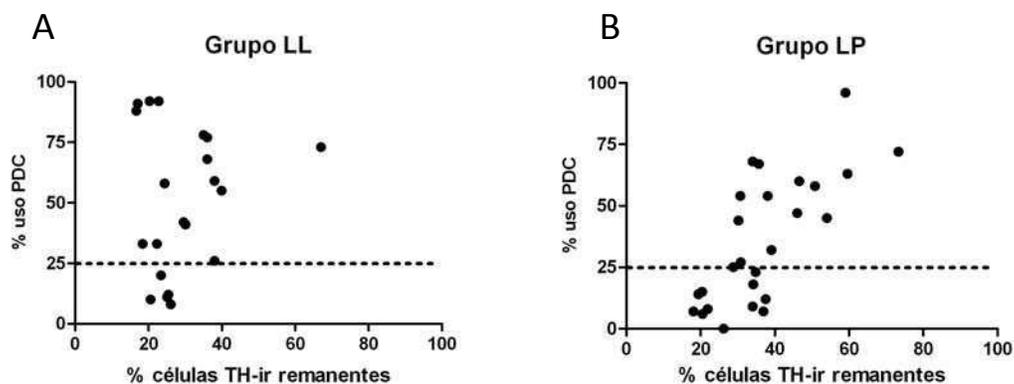


Figura 36: Análisis de correlación entre las variables porcentaje de uso de la PDC en la PC bajo tratamiento y porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN de todos los animales que formaron parte de los grupos experimentales en los tres bloques o réplicas biológicas. **(A)** Grupo LL: Prueba de correlación de Pearson $r=0,1257$ ($n=21$, $R^2=0,01580$; $p=0,5872$). **(B)** Grupo LP: Prueba de correlación de Pearson $r=0,7321$ ($n=26$, $R^2=0,5359$; $*p<0,0001$).

Otra forma de visualizar la relación que observamos entre el porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN y la respuesta en el cilindro de los animales bajo tratamiento con pramipexol es comparando el porcentaje de células TH-ir remanentes de los animales que usaron la PDC más de un 25% (animales que mejoraron la aquinesia inducida por la lesión bajo efecto del tratamiento) con el porcentaje de células TH-ir remanentes de los animales que usaron la PDC hasta un 25% (animales que no mejoraron la aquinesia inducida por la lesión bajo efecto del tratamiento). El resultado de este análisis puede observarse en la **Figura 37**.

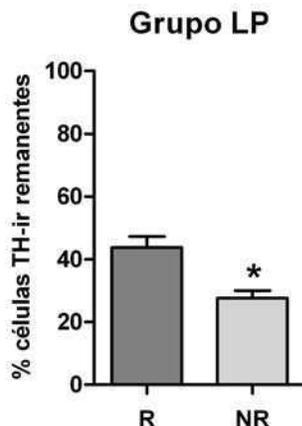


Figura 37: Porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN. En este gráfico se representan los animales bajo tratamiento con pramipexol (LP) que mejoraron la aquinesia de la PDC (R) y de los que no mejoraron la aquinesia de la PDC (NR) en la PC. Prueba de t para muestras independientes, * $p < 0,01$ (LPR $n=15$, LPNR $n=11$). Media \pm S.E.M.

Claramente existe una relación entre el porcentaje de células TH-ir remanentes en la SN y la respuesta terapéutica, determinada como habilidad de uso de la PDC en la PC, inducida por el tratamiento con pramipexol.

La segunda hipótesis, que trata sobre un posible efecto de las drogas sobre la supervivencia celular (efecto post- tratamiento), podría discutirse a partir del análisis de la expresión de genes inducida por levodopa y con pramipexol.

RESULTADOS A NIVEL DE EXPRESIÓN GÉNICA

Expresión génica inducida por los agonistas dopaminérgicos en el estriado desnervado

Las comparaciones más relevantes arrojaron un gran número de genes anotados que se expresan diferencialmente en el estriado desnervado (**Tabla 14**).

Comparación	$p < 0,05$	$p < 0,01$
LL-LA	1182	216
LP-LA	773	102
LL-LP	2299	583

Tabla 14: Número de genes anotados expresados diferencialmente en el estriado desnervado, para dos valores de p y sin restricción del nivel de cambio (*fold change*) de la expresión génica.

Los niveles de cambio en la expresión de los genes diferenciales de todas las comparaciones resultaron ser bajos; aparentemente no hubo genes cuya expresión se modificó en gran medida a causa de los tratamientos. Por lo tanto, pensamos que quizá, los tratamientos modificaron la expresión de grupos de genes relacionados funcionalmente, en vez de modificar la expresión de genes particulares o individuales.

A fin de obtener la mejor información a partir de este gran número de genes diferenciales, analizamos las vías KEGG enriquecidas según el nivel de cambio establecido. Finalmente, fijamos los parámetros en un **valor de $p < 0,05$ y un nivel de cambio $\geq 0,3$** . Esto generó el siguiente número de genes anotados diferenciales para cada comparación:

$p < 0,05$ y nivel de cambio $\geq 0,3$	
Comparación	Nº de genes anotados
LL-LA	240
LP-LA	189
LL-LP	549

Tabla 15: Genes diferenciales entre comparaciones para un valor de $p < 0,05$ y un nivel de cambio $\geq 0,3$.

El tratamiento por 3 semanas con levodopa o con pramipexol modificó la expresión de un gran número de genes en el estriado desnervado de animales con lesión moderada nigroestriatal.

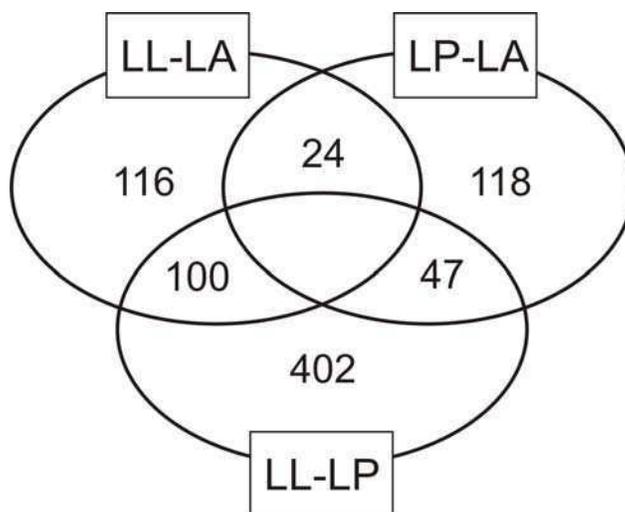


Figura 38: Número de genes diferenciales. En el gráfico se muestra el número de genes exclusivos de una dada comparación y el número de genes en común entre comparaciones (intersecciones). Entre estos genes diferenciales de cada comparación: hay un cierto número de genes que son exclusivos de una dada comparación, hay 24 genes que aparecen a la vez en las comparaciones LL-LA y LP-LA, hay un cierto número de genes que aparecen tanto en la comparación LL-LP y LL-LA (100) o LP-LA (47).

Como puede observarse en la **tabla 15** y en la **figura 38**, al comparar con el tratamiento con vehículo, el tratamiento con levodopa modificó el nivel de los ARNm de 240 genes mientras que el tratamiento con pramipexol modificó el nivel de los ARNm de 189 genes. Sin embargo, el mayor número de genes diferenciales se observó al comparar el tratamiento de los dos fármacos en estudio. **Estos 549 genes de la comparación LL-LP denotan grandes diferencias en cuanto a los efectos del tratamiento con levodopa o con pramipexol sobre la expresión de genes.**

Si bien, la mayor parte de los genes con expresión diferencial son específicos de cada comparación, existe cierto grado de solapamiento entre ellas, como puede apreciarse en la **Figura 38**. Además, en cada comparación un porcentaje dado de genes presenta *up-regulation* de los niveles de sus ARNm, mientras que el resto de los genes presenta *down-regulation* de los niveles de sus ARNm, como se puede apreciar en la **Figura 39**.

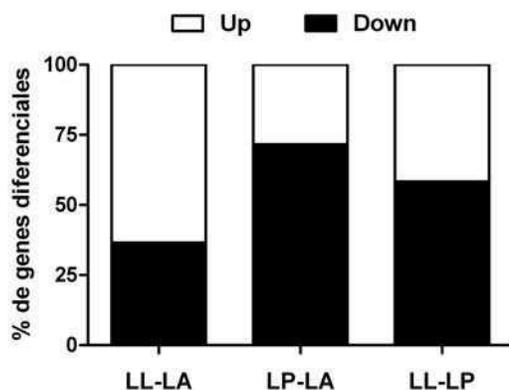


Figura 39: Porcentaje de genes diferenciales. El gráfico representa el porcentaje de genes diferenciales para las comparaciones LL-LA, LP-LA y LL-LP. Las barras blancas representan *up-regulation* (valores positivos del nivel de cambio o *fold change*) y las barras negras *down-regulation* de los niveles de los ARNm (valores negativos del nivel de cambio o *fold change*).

Dado el gran número de genes diferenciales que se obtuvieron para las comparaciones más relevantes, a continuación realizamos un análisis descriptivo que comprendió la visualización de los resultados de dichas comparaciones por medio de gráficos *heatmap*, la determinación del porcentaje de genes que presenta *up-regulation* de los niveles de sus ARNm y del porcentaje de genes que presenta *down-regulation* de los niveles de sus ARNm y las vías enriquecidas KEGG. Además, los genes diferenciales que pertenecen a cada vía KEGG enriquecida fueron señalados sobre los mapas KEGG correspondientes para facilitar la visualización y comprensión de estos resultados. Por último, como cada gen en sí mismo es un resultado y un gran aporte de

este trabajo, en los *Apéndices I, II y III* se encuentran las listas completas de los genes diferenciales para cada comparación. En el *Apéndice IV* se encuentran los resultados y la lista de genes diferenciales para la comparación LA-NA.

Comparación grupos Lesionado Levodopa (LL)- Lesionado Agua (LA)

Efecto del tratamiento con levodopa sobre la expresión de genes

El tratamiento por 3 semanas con 170/17 mg/kg/día de levodopa/carbidopa en el agua de bebida modificó la expresión de 240 genes en el estriado lesionado de los animales 6-OHDA (LL) con respecto a los animales 6-OHDA que recibieron solo agua (LA). Estos genes permitieron diferenciar ambas condiciones, como puede observarse en la **Figura 40**.

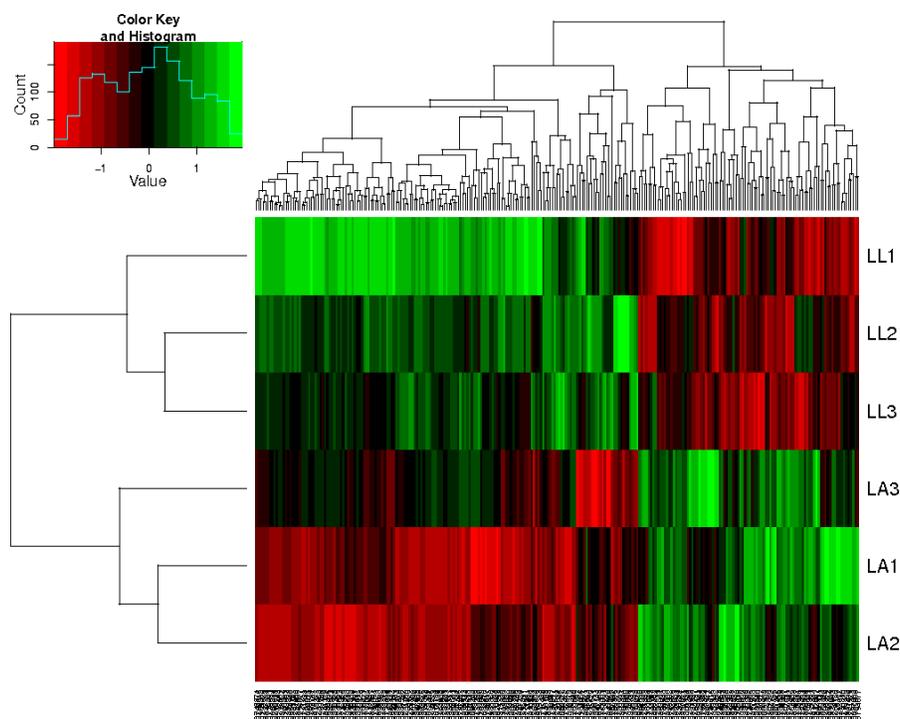


Figura 40: Heatmap resultante de la comparación LL-LA. El color de la casilla indica el nivel de expresión absoluto: el color rojo indica bajo nivel de expresión y el color verde indica alto nivel de expresión. Cada columna representa un gen y cada fila un microarreglo, es decir, una réplica biológica para cada condición de la comparación.

De los 240 genes cuya expresión se vio modificada en esta comparación, el 62% presentó elevados niveles de sus mensajeros, mientras el 38% presentó bajos niveles de

sus mensajeros en la condición LL¹(la lista completa de genes se detalla en el *Apéndice I*). Algunos de los genes de esta larga lista formaron parte de las vías KEGG enriquecidas, las cuales fueron reveladas mediante el análisis de ontologías utilizando el recurso bioinformático DAVID (**Tabla 16**). Por lo tanto, el análisis de ontologías reveló las siguientes vías enriquecidas KEGG:

Vía KEGG	Término	Nº de genes
mo03010	Ribosoma	13
mo00190	Fosforilación oxidativa	6
mo05012	Enfermedad de Parkinson	7
mo04740	Transducción olfatoria	21

Tabla 16: Vías KEGG enriquecidas en la comparación LL-LA.

En la condición LL se observó *up-regulation* de los niveles de los mensajeros de todos los genes de las vías KEGG Ribosoma (**Figura 41**), Fosforilación oxidativa (**Figura 42**) y Enfermedad de Parkinson (**Figura 43**), en relación con el tratamiento con agua (LA) de los animales con lesión moderada nigroestriatal. Excepto uno de ellos, el resto de los genes de la vía Enfermedad de Parkinson son los mismos que los enriquecidos en la vía Fosforilación oxidativa. Los genes involucrados en la vía Transducción olfatoria son genes de receptores olfatorios; se observó tanto *up-regulation* como *down-regulation* de los niveles de los mensajeros de estos genes en la condición LL. En las figuras se muestran los mapas de las vías KEGG, en los que se señalan los genes con expresión diferencial. Estos mapas son una manera de visualizar fácilmente estos resultados.

¹ Los términos *up-regulation* o *down-regulation* se refieren a los niveles relativos de cada ARNm de una condición respecto a la otra, en cada comparación. No podría en principio hablarse de un mecanismo, por ejemplo, para la comparación LL-LP, decir que levodopa *indujo un aumento* del ARNm de cierto gen sería equivalente a decir que pramipexol *indujo una disminución* del ARNm de dicho gen. Lo que sí es cierto es que el nivel del mensajero es diferente y que es mayor en la condición LL para este ejemplo.

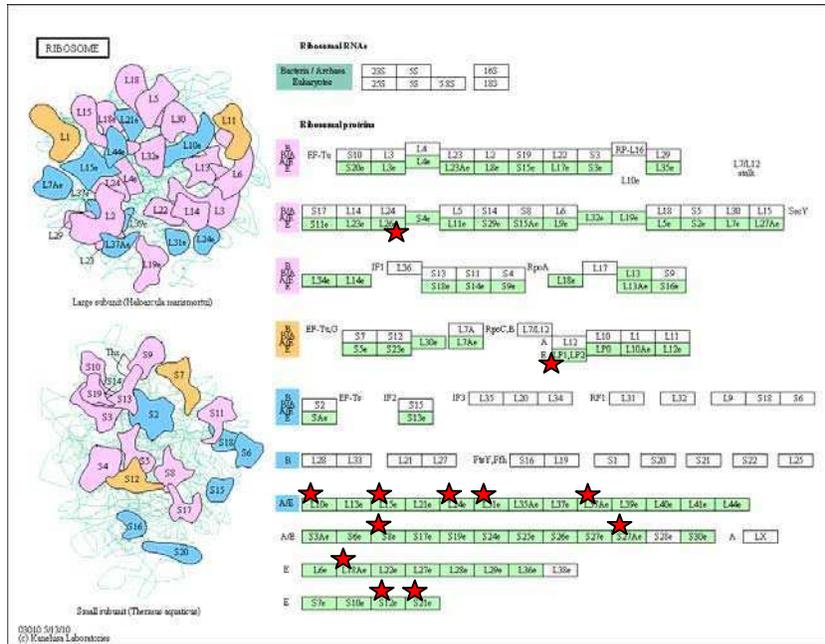


Figura 41: Mapa de la vía KEGG Ribosoma. Las estrellas rojas indican los genes diferenciales en la comparación LL-LA.

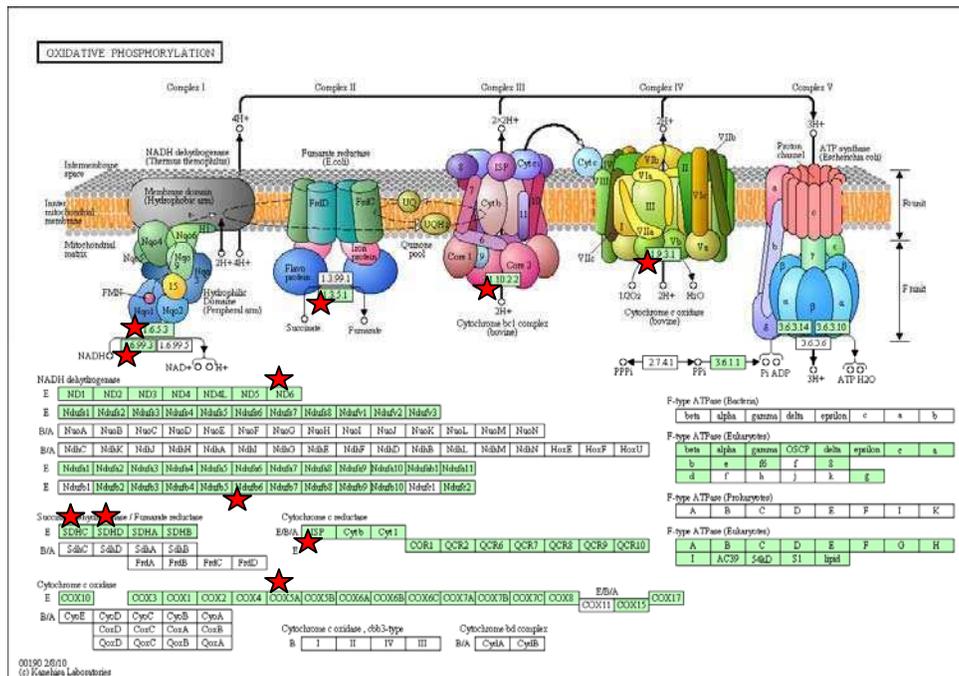


Figura 42: Mapa de la vía KEGG Fosforilación oxidativa. Las estrellas rojas indican los genes diferenciales en la comparación LL-LA.

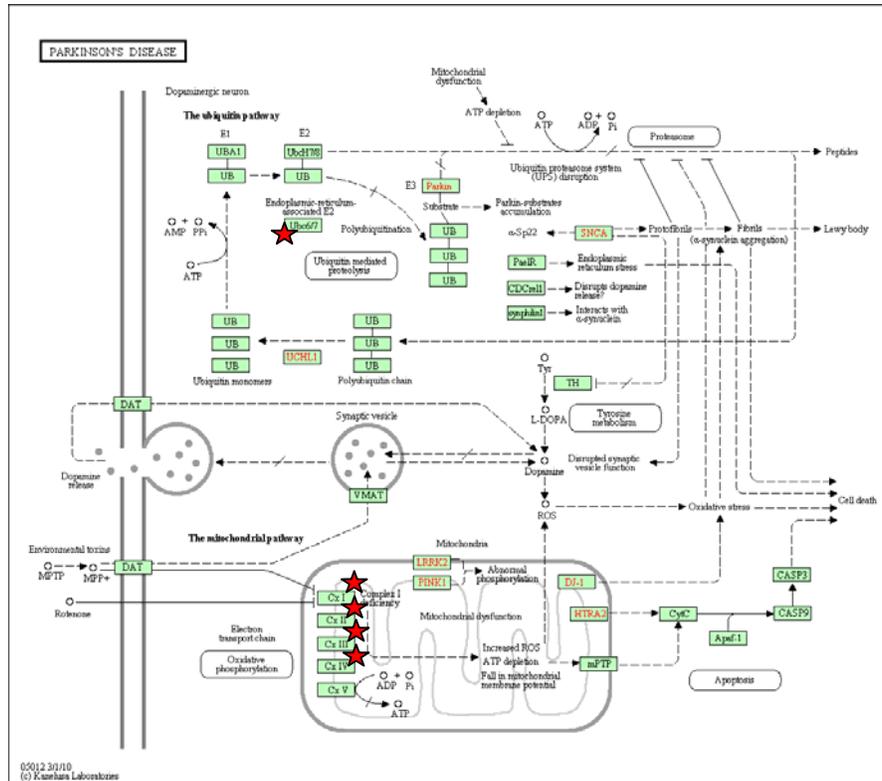


Figura 43: Mapa de la vía KEGG Enfermedad de Parkinson. Las estrellas rojas indican los genes diferenciales en la comparación LL-LA.

Comparación grupos Lesionado Pramipexol (LP)- Lesionado Agua (LA)

Efecto del tratamiento con pramipexol sobre la expresión de genes

El tratamiento por 3 semanas con 3,5 mg/kg/día de pramipexol en el agua de bebida modificó la expresión de 189 genes en el estriado lesionado de los animales 6-OHDA con respecto a los animales que recibieron solo agua (LA). Estos genes permitieron diferenciar ambas condiciones, como puede observarse en la **Figura 44**.

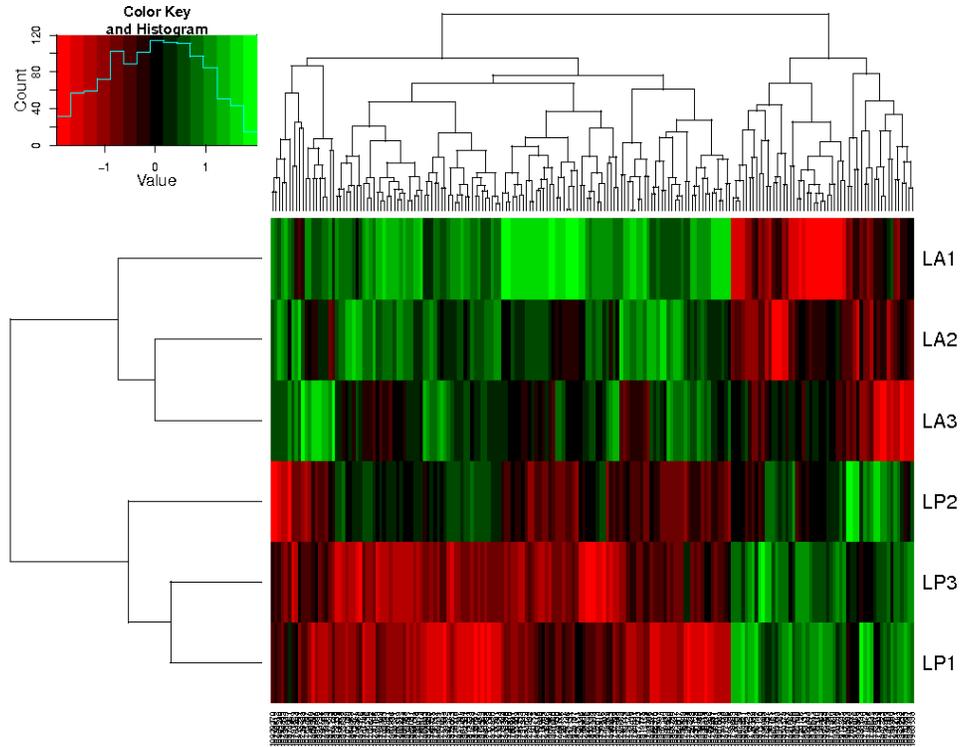


Figura 44: *Heatmap* resultante de la comparación LP-LA. El color de la casilla indica el nivel de expresión absoluto: el color rojo indica bajo nivel de expresión y el color verde indica alto nivel de expresión. Cada columna representa un gen y cada fila un microarreglo, es decir, una réplica biológica para cada condición de la comparación.

Del total de genes diferenciales, de 29% presentó niveles elevados de sus ARNm, mientras que el 71% de los genes presentó bajos niveles de sus ARNm en la condición LP respecto de la condición LA en el estriado desnervado de los animales lesionados (la lista completa de genes se detalla en el *Apéndice II*). El análisis de ontología solo reveló una vía KEGG enriquecida:

Vía KEGG	Término	Nº de genes
rno04740	Transducción olfatoria	17

Tabla 17: Vía KEGG enriquecida en la comparación LP-LA.

Comparación grupos Lesionado Levodopa (LL) – Lesionado Pramipexol (LP)

Los resultados más numerosos se obtuvieron de la comparación del efecto de los tratamientos farmacológicos (LL vs LP). De los 549 genes con expresión diferencial, el 57% de los genes presentó niveles elevados de sus ARNm en la condición LL, mientras que el 43% presentó niveles elevados de sus ARNm en la condición LP (**Figura 45**).

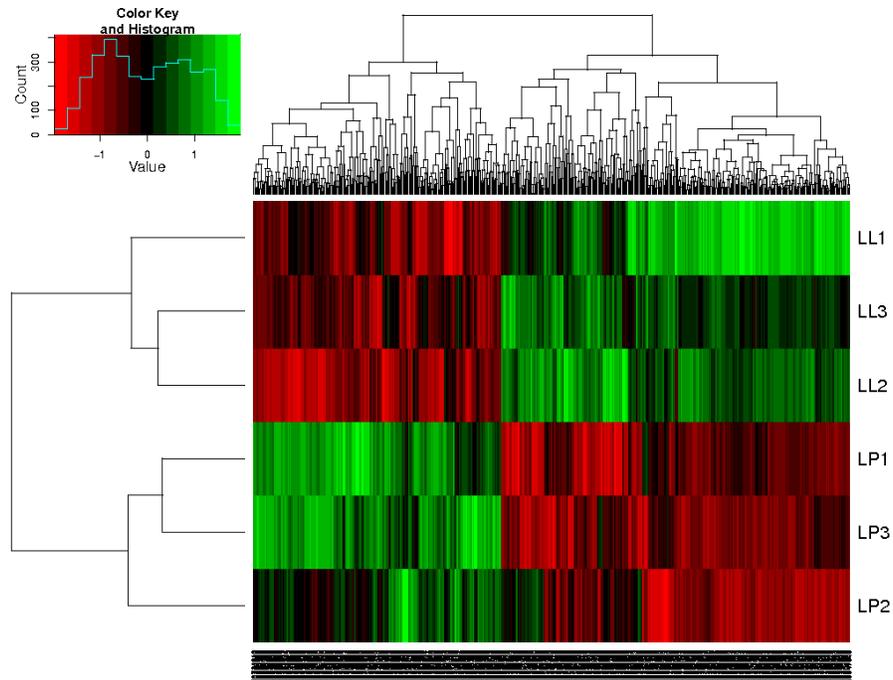


Figura 45: *Heatmap* resultante de la comparación LL-LP. El color de la casilla indica el nivel de expresión absoluto: el color rojo indica bajo nivel de expresión y el color verde indica alto nivel de expresión. Cada columna representa un gen y cada fila un chip, es decir, una réplica biológica para cada condición de la comparación.

El análisis de ontología reveló las siguientes vías enriquecidas KEGG:

Vía KEGG	Término	Nº de genes
rno00190	Fosforilación oxidativa	12
rno05012	Enfermedad de Parkinson	12
rno05016	Enfermedad de Huntington	14
rno03010	Ribosoma	15
rno03050	Proteosoma	5

Tabla 18: Vías KEGG enriquecidas en la comparación LL-LP.

Al analizar en detalle que genes formaban parte de estas vías KEGG observamos que entre las vías Fosforilación oxidativa, Enfermedad de Parkinson y Enfermedad de Huntington se compartían la mayoría de los genes involucrados, en particular los genes de la vía denominada Fosforilación oxidativa. Los genes que forman parte de estas vías se detallan en la **Tabla 19**, observándose *up-regulation* de los mensajeros frente al tratamiento con levodopa.

<i>Símbolo del gen</i>	<i>Nombre del gen</i>	<i>Nivel de cambio</i>	<i>rno00190: Fosforilación oxidativa</i>	<i>rno05012: Enfermedad de Parkinson</i>	<i>rno05016: Enfermedad de Huntington</i>
Ndufa6	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 6 (B14)</i>	0,334	√	√	√
Ndufb6	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 6</i>	0,741	√	√	√
Ndufc2	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 2</i>	0,315	√	√	√
Cox7a2l	<i>cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 like</i>	0,328	√	√	√
Cox6a1	<i>cytochrome c oxidase, subunit VIa, polypeptide 1</i>	0,499	√	√	√
Cox5a	<i>cytochrome c oxidase, subunit Va</i>	0,391	√	√	√
	<i>similar to ubiquinol-cytochrome c reductase subunit; ubiquinol-cytochrome c reductase, 6.4kDa subunit</i>	0,349	√	√	√
Sdhc	<i>succinate dehydrogenase complex, subunit C, integral membrane protein</i>	0,499	√	√	√
Uqcrcs1	<i>ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1</i>	0,371	√	√	√
Uqcrcq	<i>ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit VII</i>	0,370	√	√	√
Atp6v1f	<i>ATPase, H transporting, lysosomal VI subunit F</i>	0,446	√	-	-
Ndufa11	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 11</i>	0,320	√	-	-
	<i>solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 4</i>	0,316		√	√
Htra2	<i>HtrA serine peptidase 2</i>		-	√	-
Gpx1	<i>glutathione peroxidase 1</i>	0,310	-	-	√
Sod1	<i>superoxide dismutase 1, soluble</i>	0,472	-	-	√
Dnai2	<i>dynein, axonemal, intermediate chain 2</i>	0,309	-	-	√
RGD1559925	<i>similar to solute carrier organic anion transporter family, member 6c1</i>	0,337	-	-	√
# de genes			12	12	14

Tabla 19: Genes diferenciales de las vías KEGG enriquecidas en la comparación LL-LP. Comparación de los genes diferenciales entre las condiciones LL y LP de las vías enriquecidas KEGG: Fosforilación oxidativa, Enfermedad de Parkinson y Enfermedad de Huntington.

A continuación, se observan los mapas de las vías KEGG enriquecidas resultantes de la comparación LL-LP (**Figuras 46, 47, 48 y 49**). Como se puede observar, en las comparaciones LL-LA y LL-LP resultaron enriquecidas las mismas vías KEGG. Sin embargo, algunos de los genes diferenciales de estas vías aparecieron en ambas comparaciones y otros son exclusivos de cada comparación.

Bajo el tratamiento con levodopa se observó *up-regulation* de los mensajeros de todos los genes de la vía KEGG Ribosoma respecto del tratamiento con pramipexol.

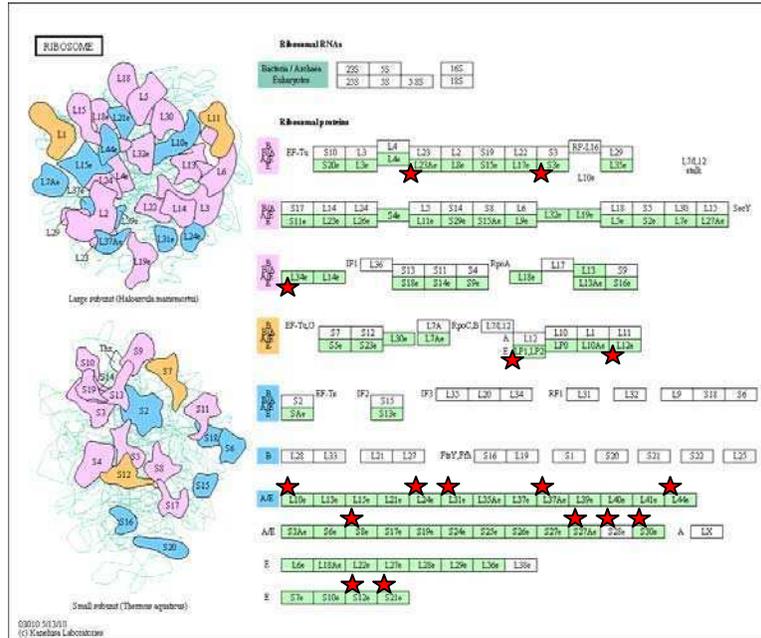


Figura 48: Mapa de la vía KEGG Ribosoma. Las estrellas rojas indican los genes diferenciales en la comparación LL-LP.

De la misma manera, bajo el tratamiento por 3 semanas con levodopa se observó *up-regulation* de los mensajeros de todos los genes agrupados en la vía KEGG Proteosoma respecto del tratamiento con pramipexol (**Figura 49**).

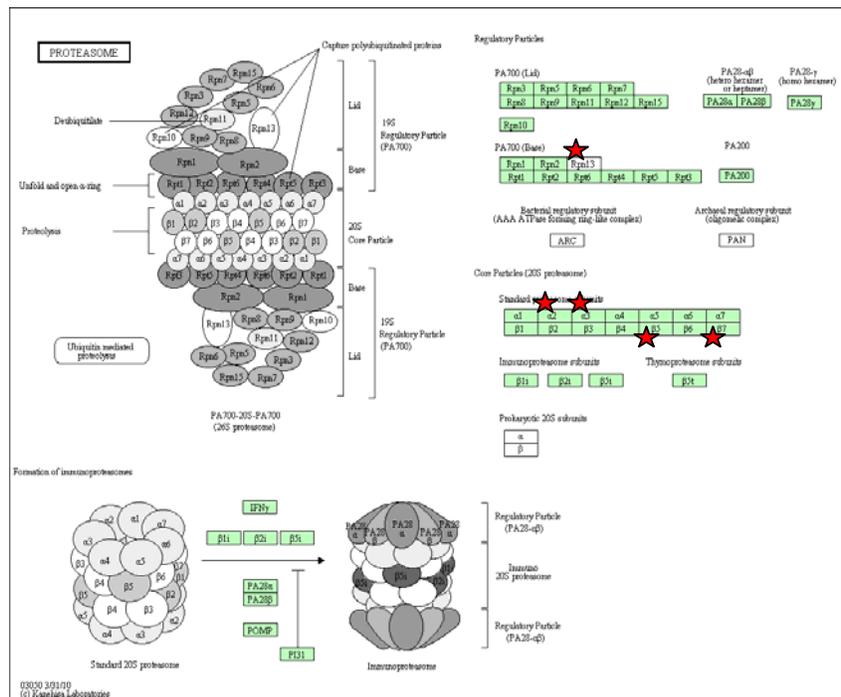


Figura 49: Mapa de la vía KEGG Proteosoma. Las estrellas rojas indican los genes diferenciales en la comparación LL-LP.

Validación de los resultados del experimento de microarreglos por qRT-PCR

La calidad de los resultados obtenidos de un experimento de microarreglos puede variar enormemente según la plataforma y el protocolo utilizado, entre otros factores. Es por esto que es necesaria la validación de los resultados, analizando los niveles de expresión de cierto número de genes por medio de otra técnica (Northern Blot, qRT-PCR o hibridación *in situ*) y comparar estos resultados con los obtenidos por el experimento de microarreglos.

Realizamos la selección de algunos genes y analizamos su nivel de expresión por qRT-PCR en alícuotas de las muestras utilizadas para el experimento de microarreglos. Los genes seleccionados fueron Nurr1, Psm14, Ndufa12, Olr 1375 y GFAP. En la **Tabla 20** se detallan, para cada gen, los datos correspondientes a la/las comparación/es en las que se modificaron los niveles del ARNm y, si corresponde, la vía KEGG en la cual participa.

	LL-LA	LP-LA	LL-LP	LA-NA	KEGG
Psm14	↑	-	↑	-	Proteosoma
Ndufa12	↑	-	↑	-	Fosforilación oxidativa
Olr1375	-	↓	-	-	Transducción olfatoria
Nurr1	-	↑	↓	-	-
GFAP	-	-	-	↑	-

Tabla 20: Genes seleccionados para la validación por qRT-PCR. Las flechas indican ↑: *up-regulation* o ↓: *down-regulation* de los niveles del ARNm en cada comparación. *Up-regulation* (valor positivo de log2 o nivel de cambio) se refiere a niveles elevados del ARNm del gen en la condición que se presenta primero en la comparación. *Down-regulation* (valor negativo de log2 o nivel de cambio) se refiere a niveles elevados del ARNm en la condición que se presenta en segundo lugar en la comparación. Por ejemplo, se observó *up-regulation* de los niveles del mensajero de GFAP en la comparación LA-NA, indicando que los niveles del ARNm fueron mayores en la condición LA.

De los 5 genes seleccionados, corroboramos el cambio del nivel de expresión de Nurr1, en las comparaciones LA-LP y LL-LP, y de GFAP en la comparación NA-LA. La dirección del cambio de los niveles de expresión de estos genes coincide con el resultado obtenido en el experimento de microarreglos. Sin embargo, la intensidad de

estos cambios no necesariamente tiene que coincidir debido a que son dos técnicas diferentes con distinta sensibilidad. Los resultados se muestran en la **Figura 50**.

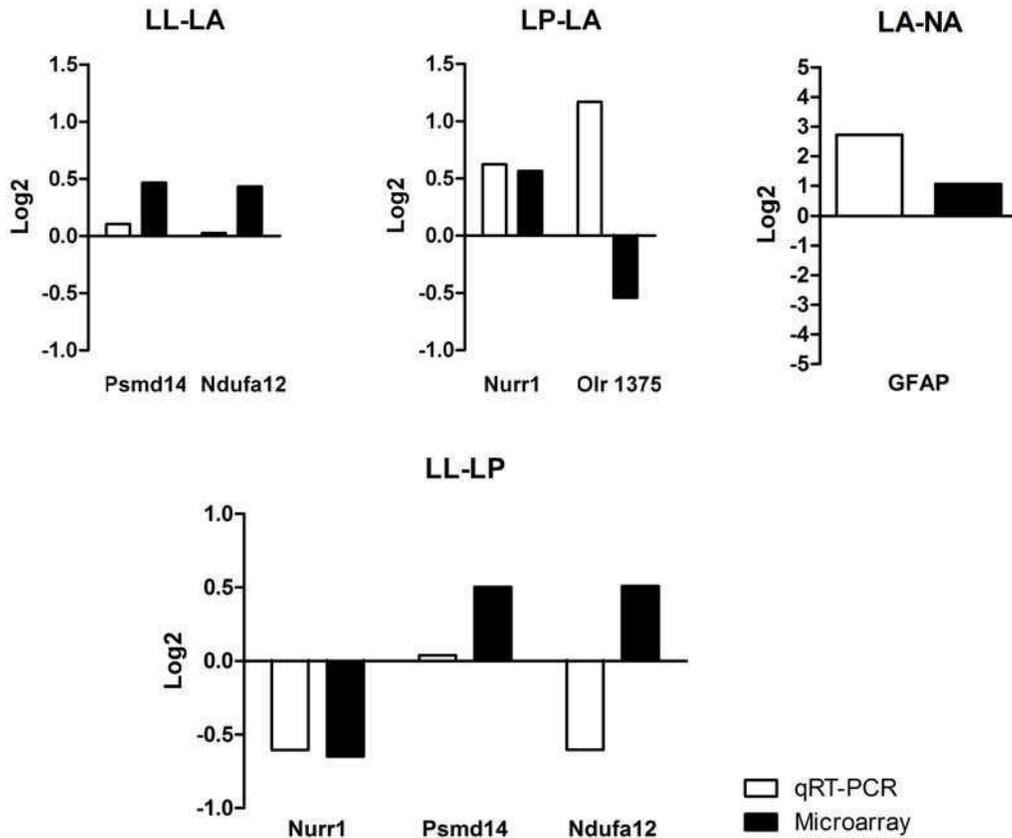


Figura 50: Validación de los resultados del experimento de microarreglos por qRT-PCR.

En el gráfico se muestra, para cada comparación, el nivel de cambio (expresado en la escala log2) y la dirección del mismo, en la expresión de los genes Nurr1, Psm14, Ndufa12, Olr 1375 y GFAP en el experimento de microarreglos (barras negras) y en el experimento de qRT-PCR (barras blancas). *Un valor positivo de log2 indica niveles elevados del ARNm del gen en la condición que se presenta primero en el título de cada gráfico, es decir, un valor positivo de log2 para GFAP en la comparación LA-NA indica que los niveles de expresión de GFAP son mayores en la condición LA.*

El aumento del ARNm de GFAP debido a un daño en el SNC es un resultado comúnmente observado en distintos modelos de lesiones cerebrales y para nosotros implica una validación del método experimental y del análisis de datos. Por su parte, existen evidencias *in vitro* del aumento de los niveles del mensajero de Nurr1 bajo efecto del tratamiento con pramipexol, pero al día de la fecha desconocemos trabajos que hayan analizado los efectos *in vivo* del tratamiento con un agonista D2 sobre los niveles de Nurr1. La importancia de este hallazgo se discute en siguiente sección.

DISCUSIÓN

Tratamiento con levodopa y con pramipexol: análisis masivo de la expresión de genes

El tratamiento por 3 semanas con levodopa modificó la expresión de un gran número de genes en el estriado desnervado de los animales con lesión moderada nigroestriatal. Asimismo, el tratamiento con pramipexol también modificó la expresión de un gran número de genes en el estriado desnervado de los animales con lesión moderada nigroestriatal. Según nuestro conocimiento, este es el primer trabajo en el que se estudió in vivo el efecto del tratamiento prolongado con pramipexol sobre la expresión de genes. Respecto de los animales lesionados que recibieron vehículo, los genes cuya expresión se modificó como consecuencia de los tratamientos farmacológicos resultaron ser distintos, compartiéndose cambios en la expresión de solo 24 genes entre las comparaciones LL-LA y LP-LA. Sin embargo, el número de genes cuya expresión se modificó en la comparación LL-LP fue mucho mayor que el número de genes diferenciales entre cada fármaco y el vehículo. Esto sugiere la existencia de importantes diferencias en los efectos del tratamiento con levodopa y con pramipexol sobre la expresión de genes.

Es evidente, en base a nuestros resultados, que levodopa y pramipexol, además de las ya conocidas diferencias farmacológicas, clínicas y en el perfil de inducción de efectos adversos, presentan además diferencias en sus efectos a nivel de la expresión de genes. Si bien con la metodología y el diseño experimental utilizados es difícil relacionar directamente cada gen, o grupos de genes, con expresión diferencial con alguna de estas características, no se puede descartar que en algún nivel de interacción de estos genes con otros elementos celulares se encuentren esas respuestas.

Vías KEGG enriquecidas

Todas las comparaciones arrojaron un gran número de genes con expresión diferencial. El análisis individual de muchos genes que forman parte de esas listas da indicios sobre su conexión con distintos aspectos de la enfermedad de Parkinson. Con

estos resultados pueden plantearse múltiples hipótesis novedosas. Sin embargo, a los fines de facilitar la comprensión de los alcances de este trabajo, discutiremos los resultados del análisis de las vías KEGG enriquecidas. El análisis de las vías KEGG enriquecidas es una herramienta bioinformática diseñada para extraer rápidamente información biológica de largas listas de genes diferenciales. Además, en la discusión de estas vías, relacionaremos los genes de las mismas con algunos otros genes diferenciales que destacamos a partir del análisis individual.

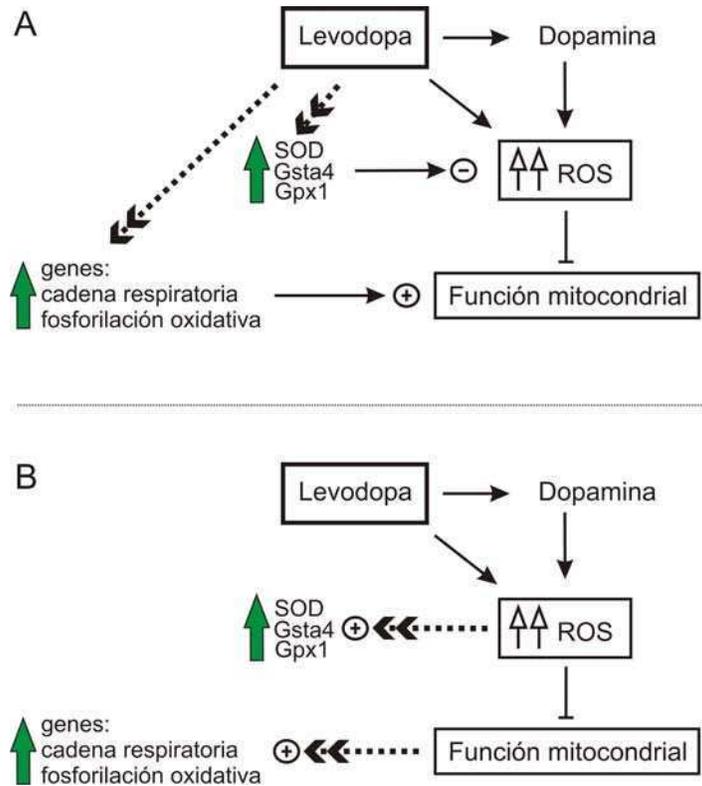
¿Cuál sería el significado biológico y la implicancia de los efectos de los tratamientos respecto de los genes de las vías KEGG enriquecidas?

En todas las comparaciones analizadas la vía KEGG Transducción olfatoria resultó enriquecida. Los genes que forman parte de esta vía son en general correspondientes a los llamados receptores olfatorios. Estos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G y la familia de los receptores olfatorios es la más grande del genoma. Si bien en un principio intentamos relacionar los receptores olfatorios con el signo temprano de hiposmia observado en los pacientes parkinsonianos, no existe bibliografía al respecto que sustente cualquier hipótesis posible. Por lo tanto, desconocemos el significado de este resultado inesperado o novedoso. Sin embargo, creemos que es relevante dejar asentado este hallazgo.

En el caso del tratamiento con pramipexol no se vio enriquecida ninguna otra vía KEGG de interés, si bien se encontraron 189 genes diferenciales respecto del tratamiento con vehículo y 549 genes diferenciales respecto del tratamiento con levodopa, en el estriado desnervado de los animales lesionados. Esto sugiere la necesidad de un análisis exhaustivo de cada gen para extraer la información biológica pertinente.

Bajo el tratamiento con levodopa se observó *up-regulation* de los niveles de los mensajeros de genes relacionados con la fosforilación oxidativa y la cadena respiratoria mitocondrial. Además, en este trabajo bajo el tratamiento con levodopa de animales lesionados con 6-OHDA se determinó un aumento de los niveles de mensajeros de la **superóxido dismutasa 1 (SOD)**, respecto del tratamiento con agua o pramipexol, y de **glutación peroxidasa 1(Gpx1)** y **glutación S-transferasa alpha 4 (Gsta4)**, respecto del tratamiento con pramipexol. Con la metodología utilizada podemos hipotetizar que este efecto podría deberse a dos eventos muy diferentes. En primer lugar, el aumento de los

niveles de estos mensajeros podría deberse a un efecto directo del tratamiento con levodopa sobre la expresión génica (**Esquema 6 A**). Este efecto podría interpretarse como un mecanismo protector indirecto. O bien, podría deberse a un efecto indirecto, compensatorio de las células frente al metabolismo oxidativo de la levodopa y la DA, el cual bajo este tratamiento se encuentra aumentado (Cohen, 1990; Cohen, 2000) (**Esquema 6 B**).



Esquema 6: Levodopa y el efecto sobre los genes de enzimas antioxidantes y los de la vía KEGG Fosforilación oxidativa. (A) Efecto directo de levodopa sobre la expresión de los genes. **(B)** Efecto indirecto del tratamiento con levodopa.

Los oxidantes, incluyendo el peróxido de hidrógeno y los radicales superóxido son productos de la fosforilación oxidativa, siendo la mitocondria el principal sitio de producción de ROS (del inglés, *reactive oxygen species*) dentro de la célula. Esto es así en una situación normal en la cual los niveles basales de ROS son limitados por una gama de antioxidantes. Levodopa y DA son sustancias que presentan un metabolismo altamente oxidativo; la autooxidación de DA y de levodopa origina peróxido de hidrógeno, radicales libres altamente reactivos y quinonas (Cheng y col., 1996). Además, se ha establecido que un cierto grado de estrés oxidativo favorece los mecanismos de autofagia, en particular la autofagia de mitocondrias dañadas (mitofagia) (revisado por Deas y col., 2011). Por otra parte, se piensa que el

metabolismo oxidativo favorecería la neurodegeneración por interrupción de la función mitocondrial (Gluck y Zeevalk, 2004; revisado por Moreira y col., 2010). Por todo lo expuesto, el posible efecto neurotóxico de la levodopa fue siempre un tema de debate en la comunidad científica (revisado por Murer y col., 1999b, por Olanow y col., 2004; por Fahn, 2006). Varios estudios *in vitro* han demostrado que levodopa y DA pueden ser tóxicas para una gran variedad de células neuronales y que las neuronas dopaminérgicas son especialmente sensibles (Mena y col., 1992; Mytilineou y col., 1993; Basma y col., 1995). Sin embargo, no existen estudios *in vivo* que hayan demostrado en forma convincente la toxicidad de levodopa, sino que abundan los trabajos que demuestran la ausencia de toxicidad de la misma (Perry y col., 1984; Fahn y col., 2004; Oli y col., 2010). En línea con estos resultados, nuestro grupo publicó un par de trabajos en los cuales las evidencias apuntan hacia el segundo punto. Se trataron animales desnervados parcial y totalmente de terminales dopaminérgicas en el estriado durante 6 meses con levodopa/carbidopa, con dosis análogas a las que reciben los pacientes. Los resultados de este experimento mostraron que levodopa no tiene ningún efecto tóxico sobre las neuronas remanentes (Dziewczapolski y col., 1997b), sino por el contrario promueve el aumento de 3 marcadores dopaminérgicos (TH, DAT y VMAT) en el estriado parcialmente desnervado (Murer y col., 1998; Datla y col., 2001). En un trabajo más reciente del grupo, mediante el estudio de la expresión diferencial de genes expresados en el estriado de una nueva población de ratas tratadas con levodopa durante 6 meses, se obtuvo una interesante cantidad de transcritos, entre ellos algunas enzimas metabólicas como SOD, glutatión peroxidasa 4 (GPX4) y glutatión S-transferasa subunidad 7 pi (GST-7) (Ferrario y col., 2004). En línea con nuestros resultados, bajo el tratamiento con levodopa se observó una *up-regulation* del mensajero del gen **Coq10a** [*coenzyme Q10 homolog A (S. cerevisiae)*]. Esta tendría una acción complementaria sobre los mecanismos oxidativos mitocondriales.

El sistema proteosoma-ubiquitina (UPS; del inglés, *ubiquitin-proteasome system*) es la vía principal que media la degradación de proteínas solubles intracelulares indeseables (mutantes, mal plegadas, desnaturalizadas, mal localizadas o dañadas) en el citoplasma, el núcleo y el retículo endoplasmático de las células eucariotas. Las proteínas que están excesivamente mal plegadas o agregadas resisten la degradación y pueden inhibir la función proteosomal por bloqueo de la cámara interna del proteosoma (revisado por Olanow y McNaught, 2006). El rol del UPS en el proceso

neurodegenerativo en varias enfermedades ha sido siempre un tema de debate (Upadhyaya y Hegde, 2007; Paul, 2008; Matsuda y Tanaka, 2010). La función proteosomal está disminuida en la SN de los pacientes parkinsonianos (McNaught y Jenner, 2001; Duke y col., 2006). Además, la presencia de los cuerpos de Lewy es una característica de la EP y es sinónimo de agregación proteica, hecho que pone de manifiesto la importancia del UPS en esta enfermedad. Li y colaboradores demostraron la presencia de subunidades del proteosoma en los cuerpos de Lewy, y la co-localización con α -sinucleína, UCH-L1, y parkina (Li y col., 1997; Gai y col., 2000; Shimura y col., 2001). En el presente trabajo, bajo el tratamiento con levodopa se observó *up-regulation* de los niveles de varios ARNm de genes relacionados con la función proteosomal, mientras que bajo el tratamiento con pramipexol se determinó *up-regulation* de algunos genes relacionados con la ubiquitinación de proteínas (ver *Apéndice III*). Estos resultados podrían interpretarse como mecanismos diferentes por medio de los cuales levodopa y pramipexol podrían favorecer la función del UPS y, por lo tanto, la depuración de proteínas acumuladas en el citoplasma celular. Por todo lo expuesto, queda abierta la siguiente pregunta: *¿El aumento de los mensajeros de los genes relacionados con la ubiquitinación de proteínas por parte de pramipexol y el aumento de los mensajeros de los genes relacionados con el proteosoma por parte de levodopa podrían reflejar mecanismos diferentes de neuroprotección o de procesos tendientes a mantener la indemnidad celular?*

En línea con estos resultados, el tratamiento con levodopa indujo *up-regulation* del nivel del mensajero del gen **GABARAP** (del inglés, *GABA(A) receptor-associated protein*). La proteína GABARAP es necesaria para la formación del fagosoma durante el proceso de autofagia (revisado por Deas y col., 2011). Por el otro lado, bajo el tratamiento con pramipexol se observó *up-regulation* del mensajero del gen **sequestosoma 1** (también conocida como **p62**). La proteína p62 es inducida por estrés oxidativo y posee un efecto protector en células humanas y de ratón (Ishii y col., 1996; Liu y col., 2007). Esta proteína ha sido localizada en los agregosomas de varias enfermedades neurodegenerativas (Zatloukal y col., 2002). Si bien el rol de p62 en las enfermedades neurodegenerativas no ha sido esclarecido, numerosos estudios proponen un rol de esta proteína en la formación de los cuerpos de inclusión y el tráfico de proteínas para la degradación de las mismas. La ausencia de p62 conduce a la pérdida de los agregosomas y a la muerte neuronal (Nakaso y col., 2004; Ramesh Babu y col.,

2008). Esta proteína es un componente común de las inclusiones ubiquitina positivas encontradas en varias enfermedades neurodegenerativas, como en los cuerpos de Lewy de la EP (Kuusisto y col., 2001; Zatloukal y col., 2002). La misma interactúa con LC3, un marcador del autofosoma, para facilitar la degradación de agregados de proteínas ubiquitinadas por autofagia (Pankiv y col., 2007). Du y colaboradores propusieron que p62 juega un papel fundamental en la regulación de la neurodegeneración (Du y col., 2009) debido a su capacidad para activar señales de supervivencia (Moscat y col., 2007), como así también debido a su capacidad de conducir los sustratos de poli-ubiquitina para la degradación proteosomal (Seibenhener y col., 2004; Geetha y col., 2008), y de secuestrar proteínas ubiquitinadas, mal plegadas y tóxicas, para ser eliminadas por autofagia (Nakaso y col., 2004; Wooten y col., 2006; Komatsu y col., 2007).

Validación de los resultados de los microarreglos: GFAP y NURR1

El análisis por qRT-PCR de los niveles relativos de expresión de los genes **Psm14**, **Ndufa12** y **Olr1375** no coincidió con el resultado obtenido por la técnica de microarreglos de ADN. Si bien esta inconsistencia es común observarla en los trabajos publicados que utilizan ambas técnicas (Hong y col., 2004; Miller y col., 2004), en nuestro caso podemos argumentar que el bajo número de genes analizados por ambas técnicas, la variabilidad existente entre las réplicas biológicas, el bajo número de réplicas biológicas (suficiente para la técnica de microarreglos pero no para la de qRT-PCR) y la sensibilidad inherente a cada técnica son factores que pueden haber contribuido a esta diferencia. Por otro lado, el nivel de cambio establecido en este trabajo es relativamente bajo y esto aumenta la probabilidad de obtener falsos positivos. Es por esto que consideramos necesario continuar con la validación de otros genes, luego de un análisis exhaustivo de su relevancia con las nuevas preguntas planteadas. Sin embargo, el análisis de validación por qRT-PCR confirmó el aumento de los niveles del mensajero del gen de GFAP en el estriado lesionado respecto del estriado intacto, y del mensajero de Nurr1 bajo el tratamiento con pramipexol, respecto del tratamiento con vehículo y con levodopa.

La comparación LA-NA resultó ser para nosotros una comparación control o de referencia de nuestro método experimental y del análisis de datos. Las vías KEGG enriquecidas tuvieron una total coherencia con los datos de la bibliografía respecto de los efectos de la desnervación dopaminérgica en el cuerpo estriado. En este trabajo validamos el aumento de la expresión de **GFAP** en el estriado como consecuencia de la desnervación dopaminérgica por medio de dos técnicas moleculares distintas. Varios estudios utilizando diferentes modelos animales de la EP han sugerido que una de las respuestas notables a la lesión de la proyección dopaminérgica nigroestriatal es la astrogliosis reactiva (Kay y Blum, 2000; Mao y col., 2001; Aponso y col., 2008). La astrogliosis reactiva es la respuesta universal a cualquier daño cerebral. Se caracteriza por una hipertrofia celular, *up-regulation* del marcador de astrocitos GFAP y proliferación celular. La *up-regulation* de la expresión de GFAP es una de las principales características de la reacción astrocítica comúnmente observada luego de una lesión del SNC (Gomes y col., 1999). En el sitio de inyección, los astrocitos son destruidos y nuevos astrocitos invaden el área que lo rodea (Strömberg y col., 1986). El aumento en la expresión de GFAP en el estriado de animales lesionados con 6-OHDA fue descrito en varios trabajos publicados en distintos modelos animales con lesión unilateral (Rataboul y col., 1989; Rodrigues y col., 2001; Wachter y col., 2010). En línea con este resultado, la administración de 6-OHDA indujo *up-regulation* de los niveles del mensajero de **vimentina**. Las proteínas de filamentos intermedios (FI) constituyen una gran familia de proteínas del citoesqueleto reguladas por el desarrollo y en función del tipo de tejido y son abundantes en la mayoría de los tipos celulares de vertebrados. Los precursores de astrocitos del SNC generalmente expresan vimentina como el principal FI. La maduración de los astrocitos es seguida por un cambio en la expresión entre vimentina y GFAP, con éste último reconocido como un marcador de astrocitos maduros.

Nurr1 (también llamado Nr4a2) es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares, la cual incluye una variedad de factores de transcripción. Nurr1 es expresado principalmente dentro del SNC, durante el desarrollo y en el cerebro adulto. Su expresión es máxima en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y en las células del bulbo olfatorio (revisado por Jankovic y col., 2005). Algunos trabajos indican que Nurr1 contribuye al mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas maduras. Además, se observó una dramática *up-regulation* de Nurr1 luego de distintos tipos de estrés del

SNC, por lo que se piensa que dicho factor podría tener un rol en la protección neuronal (revisado por Perlmann y Wallén-Mackenzie, 2004). Por otro lado, los receptores dopaminérgicos D2 tendrían influencia en la expresión de Nurr1. Se ha demostrado que pramipexol tiene la capacidad de aumentar la expresión del mensajero y de la proteína Nurr1 en una línea celular humana (Pan y col., 2005). En este trabajo demostramos que bajo el tratamiento con pramipexol los niveles del mensajero de Nurr1 resultaron elevados en el estriado lesionado de animales con lesión unilateral moderada en comparación con el tratamiento con levodopa y vehículo. Ojeda y colaboradores describieron por primera vez la localización del mensajero de Nurr1 en el estriado (Ojeda y col., 2003). Además, Nurr1 es expresado en cultivos de microglía de ratón (Fan y col., 2009). En nuestro paradigma experimental desconocemos la localización y el tipo celular responsable de la expresión de Nurr1, sin embargo es importante considerar que la muestra de tejido utilizada para el experimento de microarreglos es una mezcla de neuronas, células de la glía, células de la serie hemática, terminales glutamatérgicas y dopaminérgicas, entre otras. Por último, cabe resaltar que existen varios trabajos que describen la presencia de células TH-ir en el cuerpo estriado y que las mismas serían células dopaminérgicas (revisado por Huot y Parent, 2007).

Otros genes de interés con expresión diferencial

Como mencionamos anteriormente, el análisis de los genes diferenciales en forma individual permitió la identificación de algunos que podrían tener relevancia con distintos aspectos de la EP, como la etiología y la terapéutica. Algunos casos fueron discutidos en esta sección. Sin embargo, queremos destacar la expresión diferencial de otros genes y discutir su relación con aspectos de interés en relación a la EP.

En el presente trabajo, bajo el tratamiento con pramipexol se observó una *down-regulation* del mensajero de FGF20, respecto del tratamiento con vehículo. La familia FGF (del inglés, *fibroblast growth factor*) contiene 22 proteínas que regulan una gran variedad de procesos fisiológicos durante el desarrollo y en el organismo adulto. Siete integrantes de esta familia han sido asociados con enfermedades humanas, entre ellos, el **FGF20** con la EP (Krejci y col., 2009). Entre los factores de riesgo últimamente postulados, se piensa que una *up-regulation* de FGF20 podría ser una causa de EP. En el

cerebro, FGF20 es expresado preferencialmente en la SN. Este factor posee acciones neurotróficas y aumentaría la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas (Ohmachi y col., 2000; Murase y McKay, 2006). Sin embargo, como se demostró en la línea celular dopaminérgica de neuroblastoma SH-SY5Y, FGF20 puede inducir la *up-regulation* de α -sinucleína (Spillantini y col., 1997; Wang y col., 2008). Estas acciones antagónicas podrían ser relevantes en la EP, ya que durante las tempranas etapas del desarrollo FGF20 regularía positivamente la proliferación, diferenciación y resistencia al estrés de las neuronas dopaminérgicas. No obstante, en ancianos, niveles crónicamente elevados de FGF20 podría contribuir al deterioro de las neuronas dopaminérgicas al promover la *up-regulation* de α -sinucleína (Wang y col., 2008).

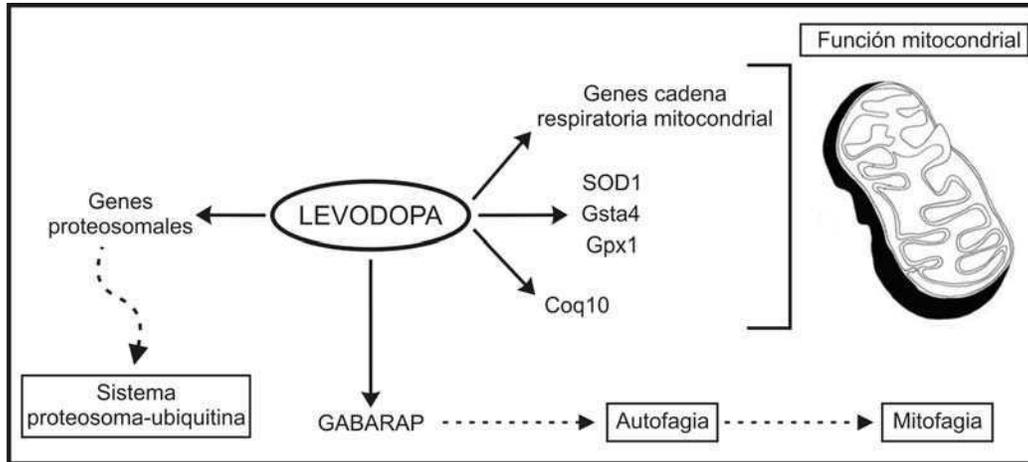
Por otro lado, bajo el tratamiento con levodopa se observó una *up-regulation* de los niveles del mensajero de **Htra2** (*HtrA serine peptidase 2*). Este gen ha sido relacionado con la etiología de la EP. HtrA2 es una serin-proteasa, sustrato de PINK1, que se localiza en la mitocondria y que es liberada al citosol luego de un estímulo apoptótico. Se piensa que HtrA2 induce apoptosis uniéndose a la proteína inhibidora de la apoptosis Xiap (del inglés, *baculoviral IAP repeat-containing 4*) (Schapira, 2006; revisado por Schapira, 2008).

Por último, queremos destacar la expresión diferencial de los genes **Ppp1r3a** (*protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3a*), **Ppp1r2** (*protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2*) al comparar los tratamientos farmacológicos entres sí. Estas son subunidades de PP-1, proteína que ha sido relacionada con los mecanismos moleculares que subyacen al desarrollo de disquinesias (Santini y col., 2008).

¿Levodopa y pramipexol: mecanismos diferentes que favorecen la indemnidad o “salud” celular?

El principal valor de la herramienta de análisis masivo de genes es la de proveer de nuevos elementos que permiten elaborar hipótesis novedosas. En base a esto y a todo lo discutido en las secciones anteriores, proponemos que los efectos del tratamiento con levodopa y con pramipexol son tales que modifican la expresión de genes relacionados con procesos tendientes a favorecer la indemnidad celular o “salud celular”.

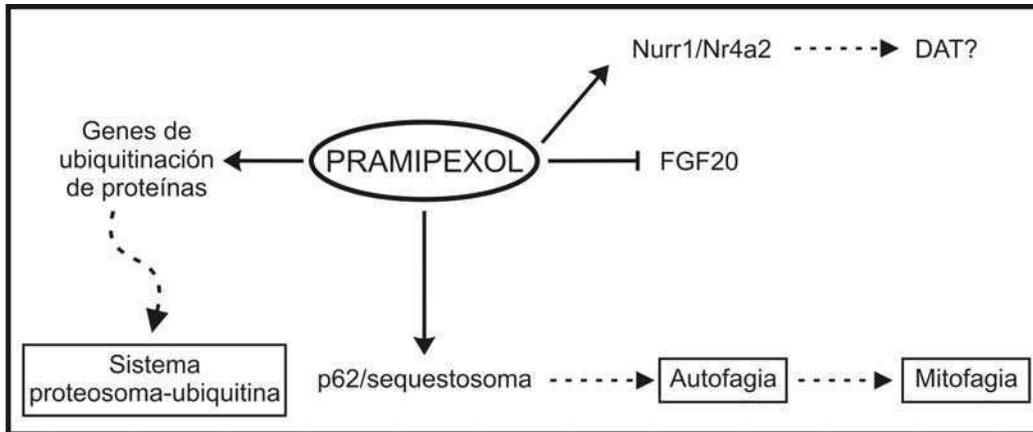
Levodopa modificó la expresión de genes relacionados con la función mitocondrial, con el sistema de proteosoma-ubiquitina y con el mecanismo de autofagia, dentro del cual se incluye el de mitofagia (**Esquema 7**). Todos estos procesos están relacionados con la detoxificación celular.



Esquema 7: Efectos múltiples del tratamiento con **levodopa** sobre diversos mecanismos que favorecerían la indemnidad o “salud celular”.

ELLDOPA es un estudio clínico controlado que fue diseñado para analizar si la progresión natural de la EP puede ser modificada mediante el tratamiento con levodopa (revisado por Fahn y PSG, 2005). Los resultados indicaron que los signos progresaron en menor medida que en el grupo placebo, y de manera dosis dependiente. Estos novedosos resultados sugieren que levodopa tendría efectos neuroprotectores (Fahn, 2006; Chan y col., 2007). Teniendo en cuenta estos hallazgos y nuestros resultados, proponemos que la terapia a largo plazo con levodopa podría modificar el curso natural de la EP debido a los cambios en la expresión de genes relacionados con procesos tendientes a favorecer la detoxificación celular y, por lo tanto, la indemnidad o “salud celular” de las poblaciones neuronales pertinentes.

El tratamiento con pramipexol, por su parte, modificó la expresión de otros genes relacionados con el sistema de proteosoma-ubiquitina, con el mecanismo de autofagia y mitofagia y de genes de factores como Nurr1 o FGF20 (**Esquema 8**).



Esquema 8: Efectos múltiples del tratamiento con **pramipexol** sobre diversos mecanismos que favorecerían la indemnidad o “salud celular”.

Como mencionamos en varias oportunidades a pramipexol se le han atribuido efectos neuroprotectores, sobre lo cual abunda la bibliografía de estudios pre-clínicos. El estudio clínico CALM-PD fue diseñado para estudiar el posible efecto neuroprotector del tratamiento con pramipexol en humanos, cuantificando la velocidad de la disminución del marcador del recaptador de DA (DAT) como medida de la densidad de innervación dopaminérgica pre-sináptica (lo que refleja la degeneración en la SN a medida que la enfermedad progresa). Si bien en un primer momento los resultados de este estudio argumentaban a favor de un efecto neuroprotector de pramipexol, el trabajo condujo a un debate sobre la elección de este marcador para los estudios de neuroimágenes (revisado por Constantinescu y col., 2008 y por Stoessl, 2011). Se sabe que el DAT está sujeto a una regulación farmacológica directa por parte de pramipexol (Guttman y col., 2001). Por otro lado, Nurr1 puede regular la expresión de genes dopaminérgicos, entre ellos el de DAT en neuronas dopaminérgicas en desarrollo (Jankovic y col., 2005). Por todo lo expuesto y en vista de nuestros hallazgos, postulamos que pramipexol podría modificar los niveles del DAT mediante la acción de Nurr1, sin implicar necesariamente un efecto sobre la innervación y/o supervivencia celular, en los pacientes parkinsonianos.

Relación entre la respuesta terapéutica bajo efecto de los tratamientos y el grado de desnervación dopaminérgica

Un resultado inesperado de este trabajo fue encontrar que existe una relación entre el porcentaje de células TH-ir remanentes en la sustancia negra y la respuesta terapéutica, determinada como habilidad de uso de la PDC en la PC, inducida por el tratamiento con pramipexol. En la clínica de la EP existe una cuestión de gran relevancia que tiene que ver con la disminución de la eficacia anti-parkinsoniana del tratamiento con agonistas dopaminérgicos D2 a medida que progresa la neurodegeneración dopaminérgica. Este hecho hace que finalmente, sea necesario adicionar levodopa al tratamiento, y, por lo tanto, aumente la probabilidad de desarrollar disquinesias. Se sabe que las respuestas mediadas por los agonistas dopaminérgicos D2 son facilitadas por la estimulación concomitante de los RD1, ya sea por acción de la DA endógena o por la administración de agonistas D1 (Robertson y Robertson, 1986; Dziewczapolski y col., 1997a). Nuestros resultados sugieren que sería necesario un mayor número de células TH-ir remanentes (y, por lo tanto, de mayor cantidad de dopamina endógena y mayor estimulación D₁) para observar el efecto terapéutico de pramipexol.

CONCLUSIONES FINALES

CONCLUSIONES FINALES

En este trabajo desarrollamos y caracterizamos un modelo animal de la enfermedad de Parkinson con pérdida moderada de neuronas TH-ir en la SN. El mismo incluyó la administración unilateral del neurotóxico 6-OHDA en el estriado de ratas. La administración de 6-OHDA indujo deficiencias severas en el uso de la PDC, evaluadas mediante dos pruebas comportamentales, la prueba del cilindro y la prueba de pasos de ajuste. Por último, establecimos un criterio de selección de los animales el cual consistió en considerar a aquellos que realizaran hasta 8 pasos con la PDC en la prueba de pasos de ajuste y, que utilizaran hasta un 25% la PDC en la prueba del cilindro, como animales con una lesión moderada inducida por la administración de 6-OHDA con deficiencias comportamentales evidentes.

En una segunda etapa caracterizamos el protocolo de administración de los dos fármacos en estudios, levodopa y pramipexol. Estos fueron administrados disueltos en el agua de bebida durante tres semanas. Las dosis elegidas fueron equipotentes en disminuir la aquinesia de la PDC en la prueba del cilindro (equivalente a un porcentaje de uso de la PDC mayor al 25%). Esta conducta fue evaluada durante el período de oscuridad del ciclo de luz/oscuridad.

Por último, para estudiar el efecto del tratamiento prolongado con levodopa y con pramipexol sobre la expresión de genes en el estriado de ratas con lesión moderada intraestriatal, utilizamos la técnica de microarreglos de ADN. Esta técnica permite evaluar la expresión de miles de genes simultáneamente. En este trabajo demostramos por primera vez el efecto *in vivo* del tratamiento prolongado con pramipexol sobre la expresión de genes. Además, corroboramos algunos hallazgos previamente descritos para el tratamiento prolongado con levodopa. Por último, pudimos analizar la relación de algunos de los genes cuya expresión se vio modificada con estos tratamientos con distintos aspectos de la enfermedad de Parkinson. *Es importante resaltar que dichos genes son sólo algunos ejemplos del valor de la tecnología de microarreglos para elaborar nuevas preguntas e hipótesis.*

APÉNDICES



El apéndice fue retirado a pedido del autor

Appendix has been withdrawn at author's request

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

A

- Abramova** NA, Cassarino DS, Khan SM, Painter TW, Bennett JP Jr. *Inhibition by R(+) or S(-) pramipexole of caspase activation and cell death induced by methylpyridinium ion or beta amyloid peptide in SH-SY5Y neuroblastoma*. J Neurosci Res. **2002** Feb 15;67(4):494-500.
- Aizman** O, Brismar H, Uhlén P, Zettergren E, Levey AI, Forsberg H, Greengard P, Aperia A. *Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons*. Nat Neurosci. **2000** Mar;3(3):226-30.
- Albin** RL, Young AB, Penney JB. *The functional anatomy of basal ganglia disorders*. Trends Neurosci. **1989**;12:366-375.
- Alexander** GE, **Crutcher** MD. *Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing*. Trends Neurosci. **1990** Jul;13(7):266-71.
- Alexander** GE, Crutcher MD, DeLong MR. *Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions*. Prog Brain Res. **1990**;85:119-46.
- Alexi** T, **Hefti** F. *Trophic actions of transforming growth factor alpha on mesencephalic dopaminergic neurons developing in culture*. Neuroscience. **1993** Aug;55(4):903-18.
- Altar** CA, Boylan CB, Fritsche M, Jones BE, Jackson C, Wiegand SJ, Lindsay RM, Hyman C. *Efficacy of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 on neurochemical and behavioral deficits associated with partial nigrostriatal dopamine lesions*. J Neurochem. **1994** Sep;63(3):1021-32.
- Andersson** M, Hilbertson A, Cenci MA. *Striatal fosB expression is causally linked with l-DOPA-induced abnormal involuntary movements and the associated upregulation of striatal prodynorphin mRNA in a rat model of Parkinson's disease*. Neurobiol Dis. **1999**;6:461-74.
- Anglade** P, Mouatt-Prigent A, Agid Y, Hirsch E. *Synaptic plasticity in the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease*. Neurodegeneration. **1996** Jun;5(2):121-8.
- Aponso** PM, Faull RL, Connor B. *Increased progenitor cell proliferation and astrogenesis in the partial progressive 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease*. Neuroscience. **2008** Feb 19;151(4):1142-53.

B

- Barbato** L, Stocchi F, Monge A, Vacca L, Ruggieri S, Nordera G, Marsden CD. *The long-duration action of levodopa may be due to a postsynaptic effect*. Clin Neuropharmacol. **1997**; 20:394-401.
- Basma** AN, Morris EJ, Nicklas WJ, Geller HM. *L-dopa cytotoxicity to PC12 cells in culture is via its autoxidation*. J Neurochem. **1995** Feb;64(2):825-32.
- Bassilana** F, Mace N, Li Q, Stutzmann JM, Gross CE, Pradier L, Benavides J, Ménager J, Bezard E. *Unraveling substantia nigra sequential gene expression in a progressive MPTP-lesioned macaque model of Parkinson's disease*. Neurobiol Dis. **2005** Oct;20(1):93-103.
- Beal** MF. *Experimental models of Parkinson's disease*. Nat Rev Neurosci. **2001** May;2(5):325-34.
- Beck** KD, Knüsel B, Hefti F. *The nature of the trophic action of brain-derived neurotrophic factor, des(1-3)-insulin-like growth factor-1, and basic fibroblast growth factor on mesencephalic dopaminergic neurons developing in culture*. Neuroscience. **1993** Feb;52(4):855-66.
- Bekris** LM, Mata IF, Zabetian CP. *The genetics of Parkinson disease*. J Geriatr Psychiatry Neurol. **2010** Dec;23(4):228-42.
- Belujon** P, Lodge DJ, Grace AA. *Aberrant striatal plasticity is specifically associated with dyskinesia following levodopa treatment*. Mov Disord. **2010** Aug 15;25(11):1568-76.
- Berger** K, Przedborski S, Cadet JL. *Retrograde degeneration of nigrostriatal neurons induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in rats*. Brain Res Bull. **1991** Feb;26(2):301-7.
- Berthet** A, **Bezard** E. *Dopamine receptors and L-dopa-induced dyskinesia*. Parkinsonism Relat Disord. **2009** Dec;15 Suppl 4:S8-12.

- Bertran-Gonzalez J**, Hervé D, Girault JA, Valjent E. *What is the Degree of Segregation between Striatonigral and Striatopallidal Projections?* Front Neuroanat. **2010** Oct 7;4: pii: 136.
- Betchen SA, Kaplitt M.** *Future and current surgical therapies in Parkinson's disease.* Curr Opin Neurol. **2003** Aug;16(4):487-93.
- 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. **1962**;203:560-74.
- Björklund A**, Dunnett SB, Brundin P, Stoessl AJ, Freed CR, Breeze RE, Levivier M, Peschanski M, Studer L, Barker R. *Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease.* Lancet Neurol. **2003** Jul;2(7):437-45.
- Bloom FE**, Algeri S, Groppetti A, Revuelta A, Costa E. *Lesions of central norepinephrine terminals with 6-OH-dopamine: biochemistry and fine structure.* Science. 1969 Dec 5;166(910):1284-6.
- Braak H**, Del Tredici K, Bratzke H, Hamm-Clement J, Sandmann-Keil D, Rüb U. *Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages).* J Neurol. **2002** Oct;249 Suppl 3:III/1-5.
- Breese GR, Traylor TD.** *Effect of 6-hydroxydopamine on brain norepinephrine and dopamine evidence for selective degeneration of catecholamine neurons.* J Pharmacol Exp Ther. **1970** Sep;174(3):413-20.
- Bunzow JR**, Van Tol HH, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie M, Machida CA, Neve KA, Civelli O. *Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA.* Nature. **1988** Dec 22-29;336(6201):783-7.

C

- Calabresi P**, Di Filippo M, Ghiglieri V, Tambasco N, Picconi B. *Levodopa-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease: filling the bench-to-bedside gap.* Lancet Neurol. **2010** Nov;9(11):1106-17.
- Calabresi P**, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G. *The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia.* Trends Neurosci. **1996** Jan;19(1):19-24.
- Canales JJ, Graybiel AM.** *A measure of striatal function predicts motor stereotypy.* Nature Neurosci. **2000**;3: 377-383.a
- Canales JJ, Graybiel AM.** *Patterns of gene expression and behavior induced by chronic dopamine treatments.* Ann Neurol. **2000** Apr;47(4 Suppl 1):S53-9.b
- Cantuti-Castelvetri I**, Keller-McGandy C, Bouzou B, Asteris G, Clark TW, Frosch MP, Standaert DG. *Effects of gender on nigral gene expression and parkinson disease.* Neurobiol Dis. **2007** Jun;26(3):606-14.
- Carlsson A**, Lindqvist M, Magnusson T. *3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists.* Nature. **1957** Nov 30;180(4596):1200.
- Carvey PM**, McGuire SO, Ling ZD. *Neuroprotective effects of D3 dopamine receptor agonists.* Parkinsonism Relat Disord. **2001** Jul;7(3):213-223.
- Cassarino DS**, Fall CP, Smith TS, Bennett JP Jr. *Pramipexole reduces reactive oxygen species production in vivo and in vitro and inhibits the mitochondrial permeability transition produced by the parkinsonian neurotoxin methylpyridinium ion.* J Neurochem. **1998** Jul;71(1):295-301.
- Cenci MA**, Lee CS, Björklund A. *L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA.* Eur J Neurosci. **1998** Aug;10(8):2694-706.
- Cenci MA, Lundblad M.** *Post- versus presynaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia.* J Neurochem. **2006** Oct;99(2):381-92.
- Cenci MA**, Tranberg A, Andersson M, Hilbertson A. *Changes in the regional and compartmental distribution of FosB- and JunB-like immunoreactivity induced in the dopamine-denervated rat striatum by acute or chronic L-dopa treatment.* Neuroscience. **1999**;94:515-27.
- Chan PL**, Nutt JG, Holford NH. *Levodopa slows progression of Parkinson's disease: external validation by clinical trial simulation.* Pharm Res. **2007** Apr;24(4):791-802.

Chang JW, Wachtel SR, Young D, Kang UJ. *Biochemical and anatomical characterization of forepaw adjusting steps in rat models of Parkinson's disease: studies on medial forebrain bundle and striatal lesions*. *Neuroscience*. **1999** Jan;88(2):617-28.

Chase TN. *Striatal plasticity and extrapyramidal motor dysfunction*. *Parkinsonism Relat Disord*. **2004** Jul;10(5):305-13.

Chaudhuri JD. *Genes arrayed out for you: the amazing world of microarrays*. *Med Sci Monit*. **2005** Feb;11(2):RA52-62.

Cheng N, Maeda T, Kume T, Kaneko S, Kochiyama H, Akaike A, Goshima Y, Misu Y. *Differential neurotoxicity induced by L-DOPA and dopamine in cultured striatal neurons*. *Brain Res*. **1996** Dec 16;743(1-2):278-83.

Choi-Lundberg DL, Lin Q, Schallert T, Crippens D, Davidson BL, Chang YN, Chiang YL, Qian J, Bardwaj L, Bohn MC. *Behavioral and cellular protection of rat dopaminergic neurons by an adenoviral vector encoding glial cell line-derived neurotrophic factor*. *Exp Neurol*. **1998** Dec;154(2):261-75.

Cohen G. *Monoamine oxidase and oxidative stress at dopaminergic synapses*. *J Neural Transm Suppl*. **1990**;32:229-38.

Cohen G. *Oxidative stress, mitochondrial respiration, and Parkinson's disease*. *Ann N Y Acad Sci*. **2000**;899:112-20.

Constantinescu R. *Update on the use of pramipexole in the treatment of Parkinson's disease*. *Neuropsychiatr Dis Treat*. **2008** Apr;4(2):337-52.

Corrigan MH, Denahan AQ, Wright CE, Ragual RJ, Evans DL. *Comparison of pramipexole, fluoxetine, and placebo in patients with major depression*. *Depress Anxiety*. **2000**;11(2):58-65.

Cotzias GC, Van Woert MH, Schiffer LM. *Aromatic amino acids and modification of parkinsonism*. *N Engl J Med*. **1967** Feb 16;276(7):374-9.

Cotzias GC. *Parkinsonism and Dopa*. *J Chronic Dis*. **1969** Nov;22(5):297-301.

Creese I, Burt DR, Snyder SH. *Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity*. *Science*. **1977**. 197(4303):596-8.

D

Damier P, Tremblay L, Féger J, Hirsch EC. *Development of dyskinesias induced by treatment for Parkinson's disease: potential role of first exposure to L-DOPA (or phenomenon of priming)*. *Rev Neurol (Paris)*. **2000** Mar;156(3):224-35.

Datla KP, Blunt SB, Dexter DT. *Chronic L-DOPA administration is not toxic to the remaining dopaminergic nigrostriatal neurons, but instead may promote their functional recovery, in rats with partial 6-OHDA or FeCl(3) nigrostriatal lesions*. *Mov Disord*. **2001** May; 16 (3): 424-34.

Dawson TM, Ko HS, Dawson VL. *Genetic animal models of Parkinson's disease*. *Neuron*. **2010** Jun 10;66(5):646-61.

Deas E, Wood NW, Plun-Favreau H. *Mitophagy and Parkinson's disease: the PINK1-parkin link*. *Biochim Biophys Acta*. **2011** Apr;1813(4):623-33.

Delfino MA, Stefano AV, Ferrario JE, Taravini IR, Murer MG, Gershanik OS. *Behavioral sensitization to different dopamine agonists in a parkinsonian rodent model of drug-induced dyskinesias*. *Behav Brain Res*. **2004**;152:297-306.

DeLong MR, Wichmann T. *Circuits and circuit disorders of the basal ganglia*. *Arch Neurol*. **2007** Jan;64(1):20-4.

Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. *Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway*. *Exp Neurol*. **2002**;175:303-17.

Du Y, Wooten MC, Wooten MW. *Oxidative damage to the promoter region of SQSTM1/p62 is common to neurodegenerative disease*. *Neurobiol Dis*. **2009** Aug;35(2):302-10.

Duke DC, Moran LB, Kalaitzakis ME, Deprez M, Dexter DT, Pearce RK, Graeber MB. *Transcriptome analysis reveals link between proteasomal and mitochondrial pathways in Parkinson's disease*. *Neurogenetics*. **2006** Jul;7(3):139-48.

Duke DC, Moran LB, Pearce RK, Graeber MB. *The medial and lateral substantia nigra in Parkinson's disease: mRNA profiles associated with higher brain tissue vulnerability.* Neurogenetics. **2007** Apr;8(2):83-94.

Dunnett SB, Björklund A, Lindvall O. *Cell therapy in Parkinson's disease - stop or go?.* Nat Rev Neurosci. **2001** May;2(5):365-9.

Dziewczapolski G, Mora MA, Menalled LB, Stéfano FJ, Rubinstein M, Gershanik OS. *Threshold of dopamine content and D1 receptor stimulation necessary for the expression of rotational behavior induced by D2 receptor stimulation under normo and supersensitive conditions.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. **1997** Jan;355(1):30-5.a

Dziewczapolski G, Murer G, Agid Y, Gershanik O, Raisman-Vozari R. *Absence of neurotoxicity of chronic L-DOPA in 6-hydroxydopamine-lesioned rats.* Neuroreport. **1997** Mar 3;8(4):975-9.b

E

EHRINGER H, HORNYKIEWICZ O. *Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system.* Klin Wochenschr. **1960** Dec 15;38:1236-9.

El Atifi-Borel M, Buggia-Prevot V, Platet N, Benabid AL, Berger F, Sgambato-Faure V. *De novo and long-term l-Dopa induce both common and distinct striatal gene profiles in the hemiparkinsonian rat.* Neurobiol Dis. **2009** May;34(2):340-50.

F

Fahn S. *Parkinson disease, the effect of levodopa, and the ELLDOPA trial. Earlier vs Later L-DOPA.* Arch Neurol. **1999** May;56(5):529-35.

Fahn S. *A new look at levodopa based on the ELLDOPA study.* J Neural Transm Suppl. **2006**;(70):419-26.

Fahn S, Cohen G. *The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it.* Ann Neurol. **1992** Dec;32(6):804-12.

Fahn S, Oakes D, Shoulson I, Kieburtz K, Rudolph A, Lang A, Olanow CW, Tanner C, Marek K; Parkinson Study Group. *Levodopa and the progression of Parkinson's disease.* N Engl J Med. **2004** Dec 9;351(24):2498-508.

Fahn S; and the Parkinson Study Group. *Does levodopa slow or hasten the rate of progression of Parkinson's disease? J Neurol.* **2005** Oct;252 Suppl 4:IV37-IV42.

Fan X, Luo G, Ming M, Pu P, Li L, Yang D, Le W. *Nurr1 expression and its modulation in microglia.* Neuroimmunomodulation. **2009**;16(3):162-70.

Fearnley JM, Lees AJ. *Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity.* Brain. **1991** Oct;114 (Pt 5):2283-301.

Ferger B, Teismann P, Mierau J. *The dopamine agonist pramipexole scavenges hydroxyl free radicals induced by striatal application of 6-hydroxydopamine in rats: an in vivo microdialysis study.* Brain Res. **2000** Nov 17;883(2):216-23.

Ferrario JE, Delfino MA, Stefano AV, Zbarsky V, Douhou A, Murer MG, Raisman-Vozari R, Gershanik OS. *Effects of orally administered levodopa on mesencephalic dopaminergic neurons undergoing a degenerative process.* Neurosci Res. **2003** Dec;47(4):431-6.

Ferrario JE, Taravini IR, Mourlevat S, Stefano A, Delfino MA, Raisman-Vozari R, Murer MG, Ruberg M, Gershanik O. *Differential gene expression induced by chronic levodopa treatment in the striatum of rats with lesions of the nigrostriatal system.* J Neurochem. **2004** Sep;90(6):1348-58.

Finn Geneser. Capítulo 14 Tejido Nervioso. Histología. Tercera edición, Editorial Medica Panamericana, Pag 329-330.

Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, Fahn S. *Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease.* N Engl J Med. **2001** Mar 8;344(10):710-9.

Freund TF, Powell JF, Smith AD. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience*. **1984** Dec;13(4):1189-215.

G

Gai, W. P.; Yuan, H. X.; Li, X. Q.; Power, J. T.; Blumbergs, P. C.; Jensen, P. H. *In situ and in vitro study of colocalization and segregation of alpha-synuclein, ubiquitin, and lipids in Lewy bodies.* *Exp. Neurol.* **2000**;166:324-333.

Geetha T, Seibenhener ML, Chen L, Madura K, Wooten MW. *p62 serves as a shuttling factor for TrkA interaction with the proteasome.* *Biochem Biophys Res Commun.* **2008** Sep 12;374(1):33-7.

George JM. *The synucleins.* *Genome Biol.* **2002**;3(1):REVIEWS3002.

Gerfen CR. *The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization.* *Trends Neurosci.* **1992** Apr;15(4):133-9.

Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ Jr, Sibley DR. *D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons.* *Science.* **1990** Dec 7;250(4986):1429-32.

Gerfen CR, Miyachi S, Paletzki R, Brown P. *D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase.* *J Neurosci.* **2002** Jun 15;22(12):5042-54.

Gerfen CR, Young WS 3rd. *Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study.* *Brain Res.* **1988** Sep 13;460(1):161-7.

Gerlach M, Double K, Arzberger T, Leblhuber F, Tatschner T, Riederer P. *Dopamine receptor agonists in current clinical use: comparative dopamine receptor binding profiles defined in the human striatum.* *J Neural Transm.* **2003** Oct;110(10):1119-27.

Gerlach M, Riederer P. *Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man.* *J Neural Transm.* **1996**;103(8-9):987-1041.

Gershanik O, Heikkila RE, Duvoisin RC. *Effects of dopamine depletion on rotational behavior to dopamine agonists.* *Brain Res.* **1983** Feb 21;261(2):358-60.

Gershanik OS, Heikkila RE, Duvoisin RC. *Behavioral correlations of dopamine receptor activation.* *Neurology*, **1983**. 33:1489-1492.

Gluck MR, Zeevalk GD. *Inhibition of brain mitochondrial respiration by dopamine and its metabolites: implications for Parkinson's disease and catecholamine-associated diseases.* *J Neurochem.* **2004** Nov;91(4):788-95.

Goetz CG, Poewe W, Rascol O, Sampaio C. *Evidence-based medical review update: pharmacological and surgical treatments of Parkinson's disease: 2001 to 2004.* *Mov Disord.* **2005** May;20(5):523-39.

Goldstein M, Harada K, Meller E, Schalling M, Hokfelt T. *Dopamine autoreceptors.* *Biochemical, pharmacological, and morphological studies.* *Ann N Y Acad Sci.* **1990**;604:169-75.

Gomes FC, Paulin D, Moura Neto V, Braz J . *Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation.* *Med Biol Res.* **1999** May;32(5):619-31.

Granjeaud S, Bertucci F, Jordan BR. *Expression profiling: DNA arrays in many guises.* *Bioessays.* **1999**;21:781-90.

Graybiel AM. *Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia.* *Trends Neurosci.* **1990** Jul;13(7):244-54.

Graybiel AM, Aosaki T, Flaherty AW, Kimura M. *The basal ganglia and adaptive motor control.* *Science.* **1994** Sep 23;265(5180):1826-31.

Groenewegen HJ, Berendse HW, Wolters JG, Lohman AH. *The anatomical relationship of the prefrontal cortex with the striatopallidal system, the thalamus and the amygdala: evidence for a parallel organization.* *Prog Brain Res.* **1990**;85:95-116; discussion 116-8.

Grünblatt E, Mandel S, Jacob-Hirsch J, Zeligson S, Amariglio N, Rechavi G, Li J, Ravid R, Roggendorf W, Riederer P, Youdim MB. *Gene expression profiling of parkinsonian substantia nigra pars compacta;*

alterations in ubiquitin-proteasome, heat shock protein, iron and oxidative stress regulated proteins, cell adhesion/cellular matrix and vesicle trafficking genes. *J Neural Transm.* **2004** Dec;111(12):1543-73.

Grünblatt E, Mandel S, Maor G, Youdim MB. *Gene expression analysis in N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mice model of Parkinson's disease using cDNA microarray: effect of R-apomorphine.* *J Neurochem.* **2001** Jul;78(1):1-12.

Grünblatt E, Schmidt WJ, Scheller DK, Riederer P, Gerlach M. *Transcriptional alterations under continuous or pulsatile dopaminergic treatment in dyskinetic rats.* *J Neural Transm.* **2010** Dec 25.

Guttman M. *Double-blind comparison of pramipexole and bromocriptine treatment with placebo in advanced Parkinson's disease.* *International Pramipexole-Bromocriptine Study Group.* *Neurology.* **1997** Oct;49(4):1060-5.

Guttman M, Stewart D, Hussey D, Wilson A, Houle S, Kish S. *Influence of L-dopa and pramipexole on striatal dopamine transporter in early PD.* *Neurology.* **2001** Jun 12;56(11):1559-64.

H

Hadjiconstantinou M, Fitkin JG, Dalia A, Neff NH. *Epidermal growth factor enhances striatal dopaminergic parameters in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mouse.* *J Neurochem.* **1991** Aug;57(2):479-82.

Hagell P, Piccini P, Björklund A, Brundin P, Rehnström S, Widner H, Crabb L, Pavese N, Oertel WH, Quinn N, Brooks DJ, Lindvall O. *Dyskinesias following neural transplantation in Parkinson's disease.* *Nat Neurosci.* **2002** Jul;5(7):627-8.

Hagg T, **Varon S.** *Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of adult rat substantia nigra dopaminergic neurons in vivo.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1993** Jul 1;90(13):6315-9.

Hall ED, Andrus PK, Oostveen JA, Althaus JS, VonVoigtlander PF. *Neuroprotective effects of the dopamine D2/D3 agonist pramipexole against postischemic or methamphetamine-induced degeneration of nigrostriatal neurons.* *Brain Res.* **1996** Dec 2;742(1-2):80-8.

Hardy J. *Genetic analysis of pathways to Parkinson disease.* *Neuron.* **2010** Oct 21;68(2):201-6.

Hasbi A, Fan T, Alijanirami M, Nguyen T, Perreault ML, O'Dowd BF, George SR. *Calcium signaling cascade links dopamine D1-D2 receptor heteromer to striatal BDNF production and neuronal growth.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2009** Dec 15;106(50):21377-82.

Hauser MA, Li YJ, Xu H, Noureddine MA, Shao YS, Gullans SR, Scherzer CR, Jensen RV, McLaurin AC, Gibson JR, Scott BL, Jewett RM, Stenger JE, Schmechel DE, Hulette CM, Vance JM. *Expression profiling of substantia nigra in Parkinson disease, progressive supranuclear palsy, and frontotemporal dementia with parkinsonism.* *Arch Neurol.* **2005** Jun;62(6):917-21.

Hefti F, Melamed E, Sahakian BJ, Wurtman RJ. *Circling behavior in rats with partial, unilateral nigrostriatal lesions: effects of amphetamine, apomorphine and DOPA.* *Pharmacol Biochem Behav.* **1980**;12: 185-188.

Heikkilä RE, Shapiro BS, Duvoisin RC. *The relationship between loss of dopamine nerve terminals, striatal [³H]spiroperidol binding and rotational behavior in unilaterally 6-hydroxydopamine-lesioned rats.* *Brain Res.* **1981** May 4;211(2):285-92.

Holloway RG, Shoulson I, Fahn S, Kieburtz K, Lang A, Marek K, et al., Parkinson Study Group. *Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: a 4-year randomized controlled trial.* *Arch Neurol.* **2004** Jul;61(7):1044-53.

Hong JJ, Loiselle CR, Yoon DY, Lee O, Becker KG, Singer HS. *Microarray analysis in Tourette syndrome postmortem putamen.* *J Neurol Sci.* **2004** Oct 15;225(1-2):57-64.

Hornykiewicz O. *Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function.* *Pharmacol Rev.* **1966** Jun;18(2):925-64.

Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.* *Nat Protoc.* **2009**;4(1):44-57.

Hubble JP, **Novak P.** *Pramipexole: a nonergot dopamine agonist as drug therapy in Parkinson's disease.* *Expert Rev Neurother.* **2001** Sep;1(1):43-51.

Huot P, **Parent A.** *Dopaminergic neurons intrinsic to the striatum.* *J Neurochem.* **2007** Jun;101(6):1441-7.

I

Ichitani Y, Okamura H, Matsumoto Y, Nagatsu I, Ibata Y. *Degeneration of the nigral dopamine neurons after 6-hydroxydopamine injection into the rat striatum*. Brain Res. **1991** May 24;549(2):350-3.

Ingham CA, Hood SH, Taggart P, Arbuthnott GW. *Plasticity of synapses in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway*. J Neurosci. **1998** Jun 15;18(12):4732-43.

Iravani MM, Haddon CO, Cooper JM, Jenner P, Schapira AH. *Pramipexole protects against MPTP toxicity in non-human primates*. J Neurochem. **2006** Mar;96(5):1315-21.

Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. *Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data*. Biostatistics. **2003** Apr;4(2):249-64.

Ishii T, Yanagawa T, Kawane T, Yuki K, Seita J, Yoshida H, Bannai S. *Murine peritoneal macrophages induce a novel 60-kDa protein with structural similarity to a tyrosine kinase p56lck-associated protein in response to oxidative stress*. Biochem Biophys Res Commun. **1996** Sep 13;226(2):456-60.

J

Jankovic J, Chen S, Le WD. *The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease*. Prog Neurobiol. **2005** Sep-Oct;77(1-2):128-38.

Jenner P. *Oxidative stress as a cause of Parkinson's disease*. Acta Neurol Scand Suppl. **1991**;136:6-15.

Jenner P. *Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia*. Nat Rev Neurosci. **2008** Sep;9(9):665-77.

K

Kamme F, Salunga R, Yu J, Tran DT, Zhu J, Luo L, Bittner A, Guo HQ, Miller N, Wan J, Erlander M. *Single-cell microarray analysis in hippocampus CA1: demonstration and validation of cellular heterogeneity*. J Neurosci. **2003**;23:3607-15.

Kano O, Ikeda K, Kiyozuka T, Iwamoto K, Ito H, Kawase Y, Sato R, Fujioka T, Araki Y, Baba S, Iwasaki Y. *Beneficial effect of pramipexole for motor function and depression in Parkinson's disease*. Neuropsychiatr Dis Treat. **2008** Aug;4(4):707-10.

Katzenschlager R, Sampaio C, Costa J, Lees A. *Anticholinergics for symptomatic management of Parkinson's disease*. Cochrane Database Syst Rev. **2003**;(2):CD003735.

Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC. *Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization*. Trends Neurosci. **1995** Dec;18(12):527-35.

Kay and **Blum** J.N. *Differential response of ventral midbrain and striatal progenitor cells to lesions of the nigrostriatal dopaminergic projection*. Dev Neurosci 22, **2000**, pp. 56–67.

Kirik D, Georgievska B, Burger C, Winkler C, Muzyczka N, Mandel RJ, Bjorklund A. *Reversal of motor impairments in parkinsonian rats by continuous intrastriatal delivery of L-dopa using rAAV-mediated gene transfer*. Proc Natl Acad Sci U S A. **2002** Apr 2;99(7):4708-13.

Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A. *Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat*. Exp Neurol, **1998**. 152(2): p. 259-77.

Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A, Mandel RJ. *Long-term rAAV-mediated gene transfer of GDNF in the rat Parkinson's model: intrastriatal but not intranigral transduction promotes functional regeneration in the lesioned nigrostriatal system*. J Neurosci. **2000** Jun 15;20(12):4686-700.

Kitamura Y, Kosaka T, Kakimura JI, Matsuoka Y, Kohno Y, Nomura Y, Taniguchi T. *Protective effects of the antiparkinsonian drugs talipexole and pramipexole against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptotic death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells*. Mol Pharmacol. **1998** Dec;54(6):1046-54.

Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. *Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice*. Cell. **2007** Dec 14;131(6):1149-63.

- Konradi C**, Westin JE, Carta M, Eaton ME, Kuter K, Dekundy A, Lundblad M, Cenci MA. *Transcriptome analysis in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia*. *Neurobiol Dis*. **2004** Nov;17(2):219-36.
- Kordower JH**, Freeman TB, Chen EY, Mufson EJ, Sanberg PR, Hauser RA, Snow B, Olanow CW. *Fetal nigral grafts survive and mediate clinical benefit in a patient with Parkinson's disease*. *Mov Disord*. **1998** May;13(3):383-93.
- Kordower JH**, Freeman TB, Snow BJ, Vingerhoets FJ, Mufson EJ, Sanberg PR, Hauser RA, Smith DA, Nauert GM, Perl DP, et al. *Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease*. *N Engl J Med*. **1995** Apr 27;332(17):1118-24.
- Kordower JH**, Kanaan NM, Chu Y, Suresh Babu R, Stansell J 3rd, Terpstra BT, Sortwell CE, Steece-Collier K, Collier TJ. *Failure of proteasome inhibitor administration to provide a model of Parkinson's disease in rats and monkeys*. *Ann Neurol*. **2006** Aug;60(2):264-8.
- Krejci P**, Prochazkova J, Bryja V, Kozubik A, Wilcox WR. *Molecular pathology of the fibroblast growth factor family*. *Hum Mutat*. **2009** Sep;30(9):1245-55.
- Kriegstein K**, Suter-Crazzolara C, Fischer WH, Unsicker K. *TGF-beta superfamily members promote survival of midbrain dopaminergic neurons and protect them against MPP+ toxicity*. *EMBO J*. **1995** Feb 15;14(4):736-42.
- Kuusisto E**, Salminen A, Alafuzoff I. *Ubiquitin-binding protein p62 is present in neuronal and glial inclusions in human tauopathies and synucleinopathies*. *Neuroreport*. **2001** Jul 20;12(10):2085-90.

L

- Lane E, Dunnett S**. *Animal models of Parkinson's disease and L-dopa induced dyskinesia: how close are we to the clinic?*. *Psychopharmacology (Berl)*. **2008** Aug;199(3):303-12.
- Lang AE**, Gill S, Patel NK, Lozano A, Nutt JG, Penn R, Brooks DJ, Hottot G, Moro E, Heywood P, Brodsky MA, Burchiel K, Kelly P, Dalvi A, Scott B, Stacy M, Turner D, Wooten VG, Elias WJ, Laws ER, Dhawan V, Stoessl AJ, Matcham J, Coffey RJ, Traub M. *Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease*. *Ann Neurol*. **2006** Mar;59(3):459-66. Erratum in: *Ann Neurol*. 2006 Dec;60(6):747.
- Lansbury PT Jr, Brice A**. *Genetics of Parkinson's disease and biochemical studies of implicated gene products*. *Curr Opin Cell Biol*. **2002** Oct;14(5):653-60.
- Larramendy C**, Taravini IR, Saborido MD, Ferrario JE, Murer MG, Gershanik OS. *Cabergoline and pramipexole fail to modify already established dyskinesias in an animal model of parkinsonism*. *Behav Brain Res*. **2008** Dec 1;194(1):44-51.
- Le WD**, Jankovic J, Xie W, Appel SH. *Antioxidant property of pramipexole independent of dopamine receptor activation in neuroprotection*. *J Neural Transm*. **2000**;107(10):1165-73.
- Lee CS**, Cenci MA, Schulzer M, Björklund A. *Embryonic ventral mesencephalic grafts improve levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease*. *Brain*. **2000** Jul;123 (Pt 7):1365-79.
- Lee CS**, Sauer H, Björklund A. *Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat*. *Neuroscience*. **1996** Jun;72(3):641-53.
- Li, K.**; Ito, H.; Tanaka, K.; Hirano, A. *Immunocytochemical co-localization of the proteasome in ubiquitinated structures in neurodegenerative diseases and the elderly*. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. **1997**;56:125–131.
- Lin LF**, Doherty DH, Lile JD, Bektess S, Collins F. *GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons*. *Science*. **1993** May 21;260(5111):1130-2.
- Linazasoro G**. *New ideas on the origin of L-dopa-induced dyskinesias: age, genes and neural plasticity*. *Trends Pharmacol Sci* **2005**; 26: 391–97
- Lindvall O, Björklund A**. *Dopamine and norepinephrine-containing neuron systems: their anatomy in the rat brain*. En: *Chemical Neuroanatomy*, Raven Press, New York. PC Emson, ed., pp. 229, **1983**.
- Lindvall O**, Brundin P, Widner H, Rehncrona S, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Marsden CD, et al. *Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in*

Parkinson's disease. Science. **1990** Feb 2;247(4942):574-7.

Liu Y, Kern JT, Walker JR, Johnson JA, Schultz PG, Luesch H. *A genomic screen for activators of the antioxidant response element*. Proc Natl Acad Sci U S A. **2007** Mar 20;104(12):5205-10.

Lomax J. *Get ready to GO! A biologist's guide to the Gene Ontology*. Brief Bioinform. **2005** Sep;6(3):298-304.

Lundblad M, Andersson M, Winkler C, Kirik D, Wierup N, Cenci MA. *Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease*. Eur J Neurosci. **2002** Jan;15(1):120-32.

M

Maj J, RogóZ Z, Skuza G, Kołodziejczyk K. *Antidepressant effects of pramipexole, a novel dopamine receptor agonist*. J Neural Transm. **1997**;104(4-5):525-33.

Mao L, Lau YS, Petroske E, Wang JQ. *Profound astrogenesis in the striatum of adult mice following nigrostriatal dopaminergic lesion by repeated MPTP administration*. Brain Res Dev Brain Res. **2001** Nov 26;131(1-2):57-65.

Marie-Claire C, Courtin C, Roques BP, Noble F. *Cytoskeletal genes regulation by chronic morphine treatment in rat striatum*. Neuropsychopharmacology. **2004** Dec;29(12):2208-15.

Marin C, Aguilar E, Mengod G, Cortés R, Obeso JA. *Concomitant short- and long-duration response to levodopa in the 6-OHDA-lesioned rat: a behavioural and molecular study*. Eur J Neurosci. **2007** Jan;25(1):259-69.

Marin C, Aguilar E, Mengod G, Cortés R, Rodríguez-Oroz MC, Obeso JA. *Entacapone potentiates the long-duration response but does not normalize levodopa-induced molecular changes.* Neurobiol Dis. **2008** Dec;32(3):340-8.

Marks WJ Jr, Bartus RT, Siffert J, Davis CS, Lozano A, Boulis N, Vitek J, Stacy M, Turner D, Verhagen L, Bakay R, Watts R, Guthrie B, Jankovic J, Simpson R, Tagliati M, Alterman R, Stern M, Baltuch G, Starr PA, Larson PS, Ostrem JL, Nutt J, Kieburtz K, Kordower JH, Olanow CW. *Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial*. Lancet Neurol. **2010** Dec;9(12):1164-72.

Matsuda N, **Tanaka K**. *Does impairment of the ubiquitin-proteasome system or the autophagy-lysosome pathway predispose individuals to neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease?* J Alzheimers Dis. **2010**;19(1):1-9.

Matsui H, Ito H, Taniguchi Y, Inoue H, Takeda S, Takahashi R. *Proteasome inhibition in medaka brain induces the features of Parkinson's disease*. J Neurochem. **2010** Oct;115(1):178-87.

McGeorge AJ, **Faull RL**. *The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat*. Neuroscience. **1989**;29(3):503-37.

McNaught KS, Björklund LM, Belizaire R, Isacson O, Jenner P, Olanow CW. *Proteasome inhibition causes nigral degeneration with inclusion bodies in rats*. Neuroreport. **2002** Aug 7;13(11):1437-41.

McNaught KS, **Jenner P**. *Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease*. Neurosci Lett. **2001** Jan 19;297(3):191-4.

McNaught KS, Perl DP, Brownell AL, Olanow CW. *Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease*. Ann Neurol. **2004** Jul;56(1):149-62.

Medhurst AD, Zeng BY, Charles KJ, Gray J, Reavill C, Hunter AJ, Shale JA, Jenner P. *Up-regulation of secretoneurin immunoreactivity and secretogranin II mRNA in rat striatum following 6-hydroxydopamine lesioning and chronic L-DOPA treatment*. Neuroscience. **2001**;105(2):353-64.

Mello-Coelho V, **Hess KL**. *A conceptual and practical overview of cDNA microarray technology: implications for basic and clinical sciences*. Braz J Med Biol Res. **2005** Oct;38(10):1543-52.

Mena MA, Pardo B, Casarejos MJ, Fahn S, García de Yébenes J. *Neurotoxicity of levodopa on catecholamine-rich neurons*. Mov Disord. **1992**;7(1):23-31.

Mierau J, **Schingnitz G**. *Biochemical and pharmacological studies on pramipexole, a potent and selective dopamine D2 receptor agonist*. Eur J Pharmacol. **1992** May 14;215(2-3):161-70.

- Mierau J**, Schneider FJ, Ensinger HA, Chio CL, Lajiness ME, Huff RM. *Pramipexole binding and activation of cloned and expressed dopamine D2, D3 and D4 receptors*. Eur J Pharmacol. **1995** Jun 23;290(1):29-36.
- Mikulowska-Mennis A**, Taylor TB, Vishnu P, Michie SA, Raja R, Horner N, Kunitake ST. *High-quality RNA from cells isolated by laser capture microdissection*. Biotechniques. **2002**;33:176-9.
- Miller RM**, Callahan LM, Casaceli C, Chen L, Kiser GL, Chui B, Kaysser-Kranich TM, Sendera TJ, Palaniappan C, Federoff HJ. *Dysregulation of gene expression in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse substantia nigra*. J Neurosci. **2004** Aug 25;24(34):7445-54.
- Miller RM**, Kiser GL, Kaysser-Kranich TM, Lockner RJ, Palaniappan C, Federoff HJ. *Robust dysregulation of gene expression in substantia nigra and striatum in Parkinson's disease*. Neurobiol Dis. **2006** Feb;21(2):305-13.
- Mochizuki H**, Mizuno Y. *Gene therapy for Parkinson's disease*. J Neural Transm Suppl. **2003**;(65):205-13.
- Mokrý J**. *Experimental models and behavioural tests used in the study of Parkinson's disease*. Physiol Res. **1995**;44(3):143-50.
- Monsma FJ Jr**, Mahan LC, McVittie LD, Gerfen CR, Sibley DR. *Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation*. Proc Natl Acad Sci U S A. **1990** Sep;87(17):6723-7.
- Moran LB**, Duke DC, Deprez M, Dexter DT, Pearce RK, Graeber MB. *Whole genome expression profiling of the medial and lateral substantia nigra in Parkinson's disease*. Neurogenetics. **2006** Mar;7(1):1-11.
- Moran LB**, Graeber MB. *Towards a pathway definition of Parkinson's disease: a complex disorder with links to cancer, diabetes and inflammation*. Neurogenetics. **2008** Feb;9(1):1-13.
- Moreira PI**, Zhu X, Wang X, Lee HG, Nunomura A, Petersen RB, Perry G, Smith MA. *Mitochondria: a therapeutic target in neurodegeneration*. Biochim Biophys Acta. **2010** Jan;1802(1):212-20.
- Morelli M**, Cozzolino A, Pinna A, Fenu S, Carta A, Di Chiara G. *L-dopa stimulates c-fos expression in dopamine denervated striatum by combined activation of D-1 and D-2 receptors*. Brain Res. **1993** Oct 1;623(2):334-6.
- Moscat J**, Diaz-Meco MT, Wooten MW. *Signal integration and diversification through the p62 scaffold protein*. Trends Biochem Sci. **2007** Feb;32(2):95-100.
- Mura A**, Linder JC, Young SJ, Groves PM. *Striatal cells containing aromatic L-amino acid decarboxylase: an immunohistochemical comparison with other classes of striatal neurons*. Neuroscience. **2000**;98(3):501-11.
- Mura A**, Mintz M, Feldon J. *Behavioral and anatomical effects of long-term L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) administration in rats with unilateral lesions of the nigrostriatal system*. Exp Neurol. **2002**;177:252-64.
- Murase S**, McKay RD. *A specific survival response in dopamine neurons at most risk in Parkinson's disease*. J Neurosci. **2006** Sep 20;26(38):9750-60.
- Murer MG**, Boissiere F, Yan Q, Hunot S, Villares J, Faucheux B, Agid Y, Hirsch E, Raisman-Vozari R. *An immunohistochemical study of the distribution of brain-derived neurotrophic factor in the adult human brain, with particular reference to Alzheimer's disease*. Neuroscience. **1999**;88(4):1015-32.a
- Murer MG**, Dziewczapolski G, Menalled LB, García MC, Agid Y, Gershanik O, Raisman-Vozari R. *Chronic levodopa is not toxic for remaining dopamine neurons, but instead promotes their recovery, in rats with moderate nigrostriatal lesions*. Ann Neurol. **1998** May;43(5):561-75.
- Murer MG**, Dziewczapolski G, Menalled LB, García MC, Agid Y, Gershanik O, Raisman-Vozari R. *Absence of neurotoxicity of chronic L-DOPA in 6-hydroxydopamine-lesioned rats*. NeuroReport. **1997**; 8: 975-9.
- Murer GM** y **Gershanik OS**. *Sistema motor II: cerebelo y ganglios de la base*. Capítulo 7. En Fisiología Humana, Tresguerres. McGraw-Hill Interamericana de España. **2005**; 3ª Edición.
- Murer MG**, Raisman-Vozari R, Gershanik O. *Levodopa in Parkinson's disease: neurotoxicity issue laid to rest?* Drug Saf. **1999** Nov;21(5):339-52.b

Mytilineou C, Han SK, Cohen G. *Toxic and protective effects of L-dopa on mesencephalic cell cultures.* J Neurochem. **1993** Oct;61(4):1470-8.

N

Na SJ, DiLella AG, Lis EV, Jones K, Levine DM, Stone DJ, Hess JF. *Molecular profiling of a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease.* Neurochem Res. **2010** May;35(5):761-72.

Nakaso K, Yoshimoto Y, Nakano T, Takeshima T, Fukuhara Y, Yasui K, Araga S, Yanagawa T, Ishii T, Nakashima K. *Transcriptional activation of p62/A170/ZIP during the formation of the aggregates: possible mechanisms and the role in Lewy body formation in Parkinson's disease.* Brain Res. **2004** Jun 25;1012(1-2):42-51.

Nambu A. *A new dynamic model of the cortico-basal ganglia loop.* Prog Brain Res. **2004**;143:461-6.

Nambu A, Tokuno H, Takada M. *Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway.* Neurosci Res. **2002** Jun;43(2):111-7.

Napolitano M, Centonze D, Calce A, Picconi B, Spiezia S, Gulino A, Bernardi G, Calabresi P. *Experimental parkinsonism modulates multiple genes involved in the transduction of dopaminergic signals in the striatum.* Neurobiol Dis. **2002** Aug;10(3):387-95.

Napolitano M, Picconi B, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P, Gulino A. *L-DOPA treatment of parkinsonian rats changes the expression of Src, Lyn and PKC kinases.* Neurosci Lett. **2006** May 8;398(3):211-4.

Nestler EJ. *Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction.* Nature Reviews Neurosci **2001**;2:119-128.

Nikkhah G, Odin P, Smits A, Tingström A, Othberg A, Brundin P, Funa K, Lindvall O. *Platelet-derived growth factor promotes survival of rat and human mesencephalic dopaminergic neurons in culture.* Exp Brain Res. **1993**;92(3):516-23.

Nussbaum RL, Polymeropoulos MH. *Genetics of Parkinson's disease.* Hum Mol Genet. **1997**;6(10):1687-91.

Nutt JG. *Response to L-dopa in PD: the long and the short of it.* Neurology. **2000**, 54:1884-5.

Nutt JG, Burchiel KJ, Comella CL, Jankovic J, Lang AE, Laws ER Jr, Lozano AM, Penn RD, Simpson RK Jr, Stacy M, Wooten GF; ICV GDNF Study Group. *Implanted intracerebroventricular. Glial cell line-derived neurotrophic factor. Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD.* Neurology. **2003** Jan 14;60(1):69-73.

Nutt JG, Carter JH. *Apomorphine can sustain the long-duration response to L-dopa in fluctuating PD.* Neurology. **2000**;54:247-250.

Nutt JG, Carter JH, Van Houten L, Woodward WR. *Short- and long-duration responses to levodopa during the first year of levodopa therapy.* Ann Neurol. **1997** Sep;42(3):349-55.

O

Obeso JA, Marin C, Rodriguez-Oroz C, Blesa J, Benitez-Temiño B, Mena-Segovia J, Rodríguez M, Olanow CW. *The basal ganglia in Parkinson's disease: current concepts and unexplained observations.* Ann Neurol. **2008** Dec;64 Suppl 2:S30-46. a

Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Benitez-Temino B, Blesa FJ, Guridi J, Marin C, Rodriguez M. *Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease.* Mov Disord. **2008**;23 Suppl 3:S548-59. b

Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Chana P, Lera G, Rodriguez M, Olanow CW. *The evolution and origin of motor complications in Parkinson's disease.* Neurology. **2000**; 55 (11 Suppl 4): S13-20; discussion S21-3.

Ogawa N. *Early introduction of dopamine agonists in the long-term treatment of Parkinson's disease.* Neurology. **1998** Aug;51(2 Suppl 2):S13-20.

Ohmachi S, Watanabe Y, Mikami T, Kusu N, Ibi T, Akaike A, Itoh N. *FGF-20, a novel neurotrophic factor, preferentially expressed in the substantia nigra pars compacta of rat brain.* Biochem Biophys Res Commun. **2000** Oct 22;277(2):355-60.

Ojeda V, Fuentealba JA, Galleguillos D, Andrés ME. *Rapid increase of Nurr1 expression in the substantia nigra after 6-hydroxydopamine lesion in the striatum of the rat.* J Neurosci Res. **2003** Sep 1;73(5):686-97.

Olanow CW, Agid Y, Mizuno Y, Albanese A, Bonuccelli U, Damier P, De Yebenes J, Gershanik O, Guttman M, Grandas F, Hallett M, Hornykiewicz O, Jenner P, Katzenschlager R, Langston WJ, LeWitt P, Melamed E, Mena MA, Michel PP, Mytilineou C, Obeso JA, Poewe W, Quinn N, Raisman-Vozari R, Rajput AH, Rascol O, Sampaio C, Stocchi F. *Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current controversies.* Mov Disord. **2004** Sep;19(9):997-1005.

Olanow C.W., Schapira A.H.V., Rascol O. *Continuous dopamine-receptor stimulation in early Parkinson's disease.* Trends Neurosci. **2000**; 23(10):S117-S126.

Olanow CW, Freeman T, Kordower J. *Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease.* N Engl J Med. **2001** Jul 12;345(2):146.

Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, Nauert GM, Perl DP, Godbold J, Freeman TB. *A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease.* Ann Neurol. **2003** Sep;54(3):403-14.

Olanow CW, **McNaught KS**. *Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's disease.* Mov Disord. **2006** Nov;21(11):1806-23.

Olanow CW, **Tatton WG**. *Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease.* Annu Rev Neurosci. **1999**;22:123-44.

Oli RG, Fazeli G, Kuhn W, Walitza S, Gerlach M, Stopper H. *No increased chromosomal damage in L-DOPA-treated patients with Parkinson's disease: a pilot study.* J Neural Transm. **2010** Jun;117(6):737-46.

Olsson M, Nikkiah G, Bentlage C, Björklund A. *Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test.* J Neurosci. **1995**; 15(5 Pt 2): p. 3863-75.

P

Paillé V, Brachet P, Damier P. *Role of nigral lesion in the genesis of dyskinesias in a rat model of Parkinson's disease.* Neuroreport. **2004** Mar 1;15(3):561-4.

Pan T, Xie W, Jankovic J, Le W. *Biological effects of pramipexole on dopaminergic neuron-associated genes: relevance to neuroprotection.* Neurosci Lett. **2005** Mar 29;377(2):106-9.

Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Øvervatn A, Björkøy G, Johansen T. *p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy.* J Biol Chem. **2007** Aug 17;282(33):24131-45.

Parkinson Study Group *A randomized controlled trial comparing pramipexole with levodopa in early Parkinson's disease: design and methods of the CALM-PD Study.* Clin Neuropharmacol. **2000** Jan-Feb;23(1):34-44.

Parkinson Study Group. *Dopamine transporter brain imaging to assess the effects of pramipexole vs levodopa on Parkinson disease progression.* JAMA. **2002** Apr 3;287(13):1653-61.

Parkinson Study Group. *Pramipexole in levodopa-treated Parkinson disease patients of African, Asian, and Hispanic heritage.* Clin Neuropharmacol. **2007** Mar-Apr;30(2):72-85.

Parkinson Study Group CALM Cohort Investigators. *Long-term effect of initiating pramipexole vs levodopa in early Parkinson disease.* Arch Neurol. **2009** May;66(5):563-70.

Pattarini R, Rong Y, Qu C, Morgan JI. *Distinct mechanisms of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyrimidine resistance revealed by transcriptome mapping in mouse striatum.* Neuroscience. **2008** Sep 9;155(4):1174-94.

Paul S. *Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in multiple disease conditions: therapeutic approaches.* Bioessays. **2008** Nov;30(11-12):1172-84.

Paxinos G, **Watson C**. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 2nd ed. ed. **1986**: Academic Press, San Diego.

Perez-Lloret S, **Rascol O**. *Dopamine receptor agonists for the treatment of early or advanced Parkinson's disease.* CNS Drugs. **2010** Nov 1;24(11):941-68.

Perlmann T, Wallén-Mackenzie A. *Nurr1, an orphan nuclear receptor with essential functions in developing dopamine cells.* Cell Tissue Res. **2004** Oct;318(1):45-52.

Perry TL, Yong VW, Ito M, Foulks JG, Wall RA, Godin DV, Clavier RM. *Nigrostriatal dopaminergic neurons remain undamaged in rats given high doses of L-DOPA and carbidopa chronically.* J Neurochem. **1984** Oct;43(4):990-3.

Piccini P, Brooks DJ, Björklund A, Gunn RN, Grasby PM, Rimoldi O, Brundin P, Hagell P, Rehncrona S, Widner H, Lindvall O. *Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient.* Nat Neurosci. **1999** Dec;2(12):1137-40.

Picconi B, Pisani A, Barone I, Bonsi P, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P. *Pathological synaptic plasticity in the striatum: implications for Parkinson's disease.* Neurotoxicology. **2005** Oct;26(5):779-83.

Pisani A, Shen J. *Levodopa-induced dyskinesia and striatal signaling pathways.* Proc Natl Acad Sci U S A. **2009** Mar 3;106(9):2973-4.

Poewe WH, Rascol O, Quinn N, Tolosa E, Oertel WH, Martignoni E, Rupp M, Boroojerdi B; SP 515 Investigators. *Efficacy of pramipexole and transdermal rotigotine in advanced Parkinson's disease: a double-blind, double-dummy, randomised controlled trial.* Lancet Neurol. **2007** Jun;6(6):513-20.

Poulsen KT, Armanini MP, Klein RD, Hynes MA, Phillips HS, Rosenthal A. *TGF beta 2 and TGF beta 3 are potent survival factors for midbrain dopaminergic neurons.* Neuron. **1994** Nov;13(5):1245-52.

Przedborski S, Levivier M, Jiang H, Ferreira M, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Togasaki DM. *Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine.* Neuroscience. **1995**;67: 631-647.

R

Radad K, Gille G, Rausch WD. *Short review on dopamine agonists: insight into clinical and research studies relevant to Parkinson's disease.* Pharmacol Rep. **2005** Nov-Dec;57(6):701-12.

Ramesh Babu J, Lamar Seibenhener M, Peng J, Strom AL, Kemppainen R, Cox N, Zhu H, Wooten MC, Diaz-Meco MT, Moscat J, Wooten MW. *Genetic inactivation of p62 leads to accumulation of hyperphosphorylated tau and neurodegeneration.* J Neurochem. **2008** Jul;106(1):107-20.

Ramos-Miguel A, Esteban S, García-Sevilla JA. *The time course of unconditioned morphine-induced psychomotor sensitization mirrors the phosphorylation of FADD and MEK/ERK in rat striatum: role of PEA-15 as a FADD-ERK binding partner in striatal plasticity.* Eur Neuropsychopharmacol. **2010** Jan;20(1):49-64.

Rangasamy SB, Soderstrom K, Bakay RA, Kordower JH. *Neurotrophic factor therapy for Parkinson's disease.* Prog Brain Res. **2010**;184:237-64.

Rascol O. *Medical treatment of levodopa-induced dyskinesias.* Ann Neurol. **2000**; 47:S179–S188.b

Rascol O. *The pharmacological therapeutic management of levodopa-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease.* J Neurol. **2000** Apr; 247 Suppl 2: II51-7.a

Rataboul P, Vernier P, Biguet NF, Mallet J, Poulat P, Privat A. *Modulation of GFAP mRNA levels following toxic lesions in the basal ganglia of the rat.* Brain Res Bull. **1989** Jan;22(1):155-61.

Robertson GS, Robertson HA. *Synergistic effects of D1 and D2 dopamine agonists on turning behaviour in rats.* Brain Res. **1986** Oct 8;384(2):387-90.

Rodrigues RW, Gomide VC, Chadi G. *Astroglial and microglial reaction after a partial nigrostriatal degeneration induced by the striatal injection of different doses of 6-hydroxydopamine.* Int J Neurosci. **2001** Jul;109(1-2):91-126.

S

Santini E, Valjent E, Fisone G. *Parkinson's disease: levodopa-induced dyskinesia and signal transduction.* FEBS J. **2008** Apr;275(7):1392-9.

Sauer H, Oertel WH. *Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat.* Neuroscience. **1994** Mar;59(2):401-15.

- Schallert T**, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL, Bland ST. *CNS plasticity and assesment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury*. *Neuropharmacology*. **2000**; 39: 777-787.
- Schallert T**, Norton D, Jones TA. *A clinically relevant unilateral rat model of Parkinsonian akinesia*. *J Neural Transpl Plast* **1992**; 3:332-333.
- Schapira AH**. *Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease*. *Adv Neurol*. **1993**;60:288-91.
- Schapira AH**. *Etiology of Parkinson's disease*. *Neurology*. **2006** May 23;66(10 Suppl 4):S10-23.
- Schapira AH**. *Treatment options in the modern management of Parkinson disease*. *Arch Neurol*. **2007** Aug;64(8):1083-8.
- Schapira AH**. *Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease*. *Lancet Neurol*. **2008** Jan;7(1):97-109.
- Schapira AH**. *Neurobiology and treatment of Parkinson's disease*. *Trends Pharmacol Sci*. **2009** Jan;30(1):41-7.
- Schapira AH**, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. *Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease*. *Lancet*. **1989** Jun 3;1(8649):1269.
- Schober A**. *Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP*. *Cell Tissue Res*. **2004** Oct;318(1):215-24.
- Scholz B**, Svensson M, Alm H, Sköld K, Fälth M, Kultima K, Guigoni C, Doudnikoff E, Li Q, Crossman AR, Bezard E, Andrén PE. *Striatal proteomic analysis suggests that first L-dopa dose equates to chronic exposure*. *PLoS One*. **2008** Feb 13;3(2):e1589.
- Schulz JB**. *Update on the pathogenesis of Parkinson's disease*. *J Neurol*. **2008** Sep;255 Suppl 5:3-7.
- Schwartzing RK**, **Huston JP**. *The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments*. *Prog Neurobiol*. **1996** Oct;50(2-3):275-331. a
- Schwartzing RK**, **Huston JP**. *Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae*. *Prog Neurobiol*. **1996** Jun;49(3):215-66. b
- Seibenhener ML**, Babu JR, Geetha T, Wong HC, Krishna NR, Wooten MW. *Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation*. *Mol Cell Biol*. **2004** Sep;24(18):8055-68.
- Sgambato-Faure V**, Buggia V, Gilbert F, Lévesque D, Benabid AL, Berger F. *Coordinated and spatial upregulation of arc in striatonigral neurons correlates with L-dopa-induced behavioral sensitization in dyskinetic rats*. *J Neuropathol Exp Neurol*. **2005** Nov;64(11):936-47.
- Shannon KM**, Bennett JP Jr, Friedman JH. *Efficacy of pramipexole, a novel dopamine agonist, as monotherapy in mild to moderate Parkinson's disease. The Pramipexole Study Group*. *Neurology*. **1997** Sep;49(3):724-8.
- Sharma JC**, Bachmann CG, Linazasoro G. *Classifying risk factors for dyskinesia in Parkinson's disease*. *Parkinsonism Relat Disord*. **2010** Sep;16(8):490-7.
- Shimura, H.**; Schlossmacher, M. G.; Hattori, N.; Frosch, M. P.; Trockenbacher, A.; Schneider, R.; Mizuno, Y.; Kosik, K. S.; Selkoe, D. J. *Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease*. *Science* **2001**;293:263–269.
- Simunovic F**, Yi M, Wang Y, Stephens R, Sonntag KC. *Evidence for gender-specific transcriptional profiles of nigral dopamine neurons in Parkinson disease*. *PLoS One*. **2010** Jan 25;5(1):e8856.
- Smith AD**, **Bolam JP**. *The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones*. *Trends Neurosci*. **1990** Jul;13(7):259-65.
- Smith Y**, Bevan MD, Shink E, Bolam JP. *Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia*. *Neuroscience*. **1998** Sep;86(2):353-87.a
- Smith Y**, Shink E, Sidibé M. *Neuronal circuitry and synaptic connectivity of the basal ganglia*. *Neurosurg Clin N Am*. **1998** Apr;9(2):203-22.b
- Smyth GK**. *Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments*. *Stat Appl Genet Mol Biol*. **2004**;3:Article3.

Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC. *Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics*. Nature. **1990** Sep 13;347(6289):146-51.

Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. *Alpha-synuclein in Lewy bodies*. Nature. **1997** Aug 28;388(6645):839-40.

Stoessl AJ. *Neuroimaging in Parkinson's disease*. Neurotherapeutics. **2011** Jan;8(1):72-81.

Strömberg I, Björklund H, Dahl D, Jonsson G, Sundström E, Olson L. *Astrocyte responses to dopaminergic denervations by 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine as evidenced by glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry*. Brain Res Bull. **1986** Aug;17(2):225-36.

Studer L, Spenger C, Seiler RW, Altar CA, Lindsay RM, Hyman C. *Comparison of the effects of the neurotrophins on the morphological structure of dopaminergic neurons in cultures of rat substantia nigra*. Eur J Neurosci. **1995** Feb 1;7(2):223-33.

Suárez E, Burguete A, Mclachlan GJ. *Microarray data analysis for differential expression: a tutorial*. P R Health Sci J. **2009** Jun;28(2):89-104.

Sunahara RK, Guan HC, O'Dowd BF, Seeman P, Laurier LG, Ng G, George SR, Torchia J, Van Tol HH, Niznik HB. *Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1*. Nature. **1991** Apr 18;350(6319):614-9.

Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W. *D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons*. Trends Neurosci. **2007** May;30(5):228-35.

T

Taravini IR, Ferrario JE, Delbe J, Ginestet L, Debeir T, Courty J, Murer MG, Gershanik OS, Raisman-Vozari R. *Immunodetection of heparin-binding growth associated molecule (pleiotrophin) in striatal interneurons*. Brain Res. **2005** Dec 20;1066(1-2):196-200.

Taravini IR, Chertoff M, Cafferata EG, Courty J, Murer MG, Pitossi FJ, Gershanik OS. *Pleiotrophin over-expression provides trophic support to dopaminergic neurons in parkinsonian rats*. Mol Neurodegener. **2011** Jun 7;6(1):40. [Epub ahead of print].

Thomas A, Iacono D, Luciano AL, Armellino K, Di Iorio A, Onofri M. *Duration of amantadine benefit on dyskinesia of severe Parkinson's disease*. J Neurol Neurosurg Psychiatry. **2004** Jan;75(1):141-3.

Thomas PD, Mi H, Lewis S. *Ontology annotation: mapping genomic regions to biological function*. Curr Opin Chem Biol. **2007** Feb;11(1):4-11.

U

Ungerstedt U. *6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons*. Eur J Pharmacol. **1968** Dec;5(1):107-10.

Ungerstedt, Arbuthnott. *Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-OHDA lesions of the nigrostriatal dopamine system*. Brain Res. **1970**. 24: 785-493.

Upadhyaya SC, Hegde AN. *Role of the ubiquitin proteasome system in Alzheimer's disease*. BMC Biochem. **2007** Nov 22;8 Suppl 1:S12.

Urbanavicius J, Ferreira M, Costa G, Abin-Carriquiry JA, Wonnacott S, Dajas F. *Nicotine induces tyrosine hydroxylase plasticity in the neurodegenerating striatum*. J Neurochem. **2007** Aug;102(3):723-30.

Uretsky NJ, Iversen LL. *Effects of 6-hydroxydopamine on noradrenaline-containing neurones in the rat brain*. Nature. **1969** Feb 8;221(5180):557-9.

V

Valastro B, Dekundy A, Krogh M, Lundblad M, James P, Danysz W, Quack G, Cenci MA. *Proteomic analysis of striatal proteins in the rat model of L-DOPA-induced dyskinesia*. J Neurochem. **2007** Aug;102(4):1395-409.

Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, Civelli O. *Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine.* Nature. **1991** Apr 18;350(6319):610-4.

Verducci JS, Melfi VF, Lin S, Wang Z, Roy S, Sen CK. *Microarray analysis of gene expression: considerations in data mining and statistical treatment.* Physiol Genomics. **2006** May 16;25(3):355-63.

Vincenzi FF, **Hinds** TR. *Pramipexole has antioxidant properties and inhibits lipid peroxidation.* Proc West Pharmacol Soc. **1998**;41:43-6.

Vogt IR, Lees AJ, Evert BO, Klockgether T, Bonin M, Wüllner U. *Transcriptional changes in multiple system atrophy and Parkinson's disease putamen.* Exp Neurol. **2006** Jun;199(2):465-78.

Voon V, Fernagut PO, Wickens J, Baunez C, Rodriguez M, Pavon N, Juncos JL, Obeso JA, Bezaud E. *Chronic dopaminergic stimulation in Parkinson's disease: from dyskinesias to impulse control disorders.* Lancet Neurol. **2009** Dec;8(12):1140-9.

W

Wachter B, Schürger S, Rolinger J, von Ameln-Mayerhofer A, Berg D, Wagner HJ, Kueppers E. *Effect of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on proliferation of glial cells in the rat cortex and striatum: evidence for de-differentiation of resident astrocytes.* Cell Tissue Res. **2010** Nov;342(2):147-60.

Walker MS, **Hughes** TA. *Messenger RNA expression profiling using DNA microarray technology: diagnostic tool, scientific analysis or un-interpretable data?.* Int J Mol Med. **2008** Jan;21(1):13-7.

Wang G, van der Walt JM, Mayhew G, Li YJ, Züchner S, Scott WK, Martin ER, Vance JM. *Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of alpha-synuclein.* Am J Hum Genet. **2008** Feb;82(2):283-9.

Werner T. *Bioinformatics applications for pathway analysis of microarray data.* Curr Opin Biotechnol. **2008** Feb;19(1):50-4.

Westin JE, Andersson M, Lundblad M, Cenci MA. *Persistent changes in striatal gene expression induced by long-term L-DOPA treatment in a rat model of Parkinson's disease.* Eur J Neurosci. **2001**;14(7):1171-6.

Whishaw IQ, Li K, Whishaw PA, Gorny B, Metz GA. *Use of rotorod as a method for the qualitative analysis of walking in rat.* J Vis Exp. **2008** Dec 10;(22).

Wilkinson L, **Friendly** M. *The history of the cluster heat map.* Am. Stat. **2009**; 63(2):179Y84.

Willner P, Lappas S, Cheeta S, Muscat R. *Reversal of stress-induced anhedonia by the dopamine receptor agonist, pramipexole.* Psychopharmacology (Berl). **1994** Aug;115(4):454-62.

Wilson CJ, **Groves** PM. *Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular inject of horseradish peroxidase.* J Comp Neurol. **1980** Dec 1;194(3):599-615.

Winkler C, Kirik D, Björklund A, Cenci MA. *L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function.* Neurobiol Dis. **2002**;10:165-86.

Winkler C, Sauer H, Lee CS, Björklund A. *Short-term GDNF treatment provides long-term rescue of lesioned nigral dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease.* J Neurosci. **1996** Nov 15;16(22):7206-15.

Woodlee MT, Asseo-García AM, Zhao X, Liu SJ, Jones TA, Schallert T. *Testing forelimb placing "across the midline" reveals distinct, lesion-dependent patterns of recovery in rats.* Exp Neurol. **2005** Feb;191(2):310-7.

Wooten MW, Hu X, Babu JR, Seibenhener ML, Geetha T, Paine MG, Wooten MC. *Signaling, polyubiquitination, trafficking, and inclusions: sequestosome 1/p62's role in neurodegenerative disease.* J Biomed Biotechnol. **2006**;2006(3):62079.

Y

Youdim MB, Grunblatt E, Levites Y, Maor G, Mandel S. *Early and late molecular events in neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson's disease MPTP model as assessed by cDNA microarray; the role of iron.* Neurotox. Res. **2002**; 4:679–689.

Z

Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsichler A, Heid H, Schnoelzer M, Kenner L, Kleinert R, Prinz M, Aguzzi A, Denk H. *p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases.* Am J Pathol. **2002** Jan;160(1):255-63.

Zhou Q, Li J, Wang H, Yin Y, Zhou J. *Identification of nigral dopaminergic neuron-enriched genes in adult rats.* Neurobiol Aging. **2011** Feb;32(2):313-26.

Zou L, Jankovic J, Rowe DB, Xie W, Appel SH, Le W. *Neuroprotection by pramipexole against dopamine- and levodopa-induced cytotoxicity.* Life Sci. **1999**;64(15):1275-85.

PÁGINAS WEB

The gene ontology project: <http://www.geneontology.org>

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes): <http://www.genome.jp/kegg/>

DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.7): <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>

ImageJ: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>

Plataforma R: www.r-project.org

Bioconductor: www.bioconductor.org