



Universidad de Navarra

Facultad de Medicina

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE LEVODOPA
SOBRE LA ACTIVIDAD FUNCIONAL DE LA VÍA
NIGROESTRIADA EN MACACOS CON PARKINSONISMO
INDUCIDO POR MPTP**

MARIO RIVEROL FERNÁNDEZ

2010



Universidad de Navarra
Facultad de Medicina

**EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE LEVODOPA
SOBRE LA ACTIVIDAD FUNCIONAL DE LA VÍA
NIGROESTRIADA EN MACACOS CON PARKINSONISMO
INDUCIDO POR MPTP**

Memoria presentada por D. Mario Riverol Fernández para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Navarra

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Neurociencias y autorizo su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, 16 de julio de 2010

Dr. María Rosario Luquin Piudo

A Noe

A María y Candela

Agradecimientos

Este trabajo de investigación no hubiera sido posible sin el apoyo y la ayuda de un gran número de personas e instituciones.

A la Universidad de Navarra y a la Facultad de Medicina, por la formación recibida, que me ha marcado profundamente, tanto en lo personal como en lo profesional. Por el énfasis que siempre ha puesto en que buscásemos la Verdad y a Dios en la vida de todos los días.

Al Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de la Universidad de Navarra y a Novartis España por la ayuda económica y material para desarrollar este trabajo.

Mi especial agradecimiento a la Dra. Rosario Luquin por confiar en mí para la realización de este proyecto. Por sus acertados consejos y por enseñarme, con el ejemplo, la importancia de un trabajo bien hecho.

Al Departamento de Neurología de la Clínica Universidad de Navarra. A mis compañeros del Departamento de Neurología. Al Dr. Eduardo Martínez Vila, que me ha animado en muchos momentos de desesperación, a la Dra. Purificación de Castro y, especialmente, al Dr. Pablo Irimia, que siempre se ha mostrado generoso conmigo, haciéndose cargo de lo que yo dejaba cuando tenía que salir corriendo para hacer algo de la tesis (normalmente un PET). A Jon Toledo por su ayuda con la estadística.

A mis compañeros del Laboratorio de Terapia Regenerativa del CIMA. A Carla, Cristina e Iñaki. Especialmente a Irene por su disponibilidad y comprensión a lo largo de estos años.

A los Servicios de Medicina Nuclear y Radiología, y a la Unidad de Investigación de PET de la Clínica Universidad de Navarra. A María Collantes, Marta e Izaskun. A los doctores Peñuelas, Arbizu, Zubieta y Domínguez.

A David Goñi y a mi cuñada María por su ayuda en la realización de las figuras de este trabajo. Gracias por su paciencia casi infinita.

A mi familia y amigos (especialmente a Cris, Claudio, Óscar, Javi y Ainhoa) por su cariño y apoyo durante la realización de este trabajo.

A Noelia. Gracias por tu apoyo y sacrificio, tantas veces en silencio, casi sin que me diera cuenta. Este trabajo es de los dos... como todo.

Gracias.

Índice

Índice	1
Abreviaturas	7
Introducción	13
1. La enfermedad de Parkinson	15
1.1. Aspectos generales	15
1.2. Aspectos clínicos	16
1.3. Diagnóstico	17
2. Etiopatogenia de la enfermedad de Parkinson	18
2.1. Factores ambientales	18
2.2. Factores genéticos	19
2.3. Principales mecanismos de neurodegeneración	20
2.3.1. Estrés oxidativo	20
2.3.2. Disfunción mitocondrial	22
2.3.3. Neuroinflamación	22
2.3.4. Excitotoxicidad	23
2.3.5. Estrés proteolítico	23
2.4. Los modelos animales de la enfermedad de Parkinson	25
2.4.1. Modelos de exposición a neurotoxinas	27
2.4.1.1. La 6-hidroxidopamina	27
2.4.1.2. La rotenona	28
2.4.1.3. La 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina	28
2.4.1.4. Modelo secundario a la inhibición del proteasoma	31
2.4.2. Modelos genéticos	33
2.4.2.1. Modelos genéticos con defectos en genes que afectan al desarrollo de las neuronas dopaminérgicas	33
2.4.2.2. Modelos genéticos en relación con genes implicados en la EP familiar	34
2.4.2.2.1. Gen <i>SNCA</i>	34
2.4.2.2.2. Gen <i>Parkin</i>	36
2.4.2.2.3. Gen <i>DJ-1</i>	37
2.4.2.2.4. Gen <i>PINK1</i>	37
2.4.2.2.5. Gen <i>LRRK2</i>	38
2.4.2.2.6. Gen <i>UCH-L1</i>	38
2.4.2.2.7. Ratones MitoPark	39
2.4.2.2.8. Otros modelos genéticos	41
2.4.2.3. Modelos genéticos basados en la expresión de genes utilizando vectores virales	41
3. Alteraciones neuropatológicas	42
4. Alteraciones de la neurofisiología de los ganglios basales	43
5. Alteraciones neuroquímicas	46
5.1. La transmisión dopaminérgica	47
5.2. Cambios bioquímicos en la enfermedad de Parkinson	47
6. Progresión de la enfermedad de Parkinson	48
6.1. Progresión neuropatológica: los estadios de Braak	48
6.2. Progresión neuroquímica y mecanismos de compensación	49
6.3. Marcadores de progresión	52
6.4. Las técnicas de neuroimagen funcional en la valoración de la progresión de la enfermedad	53
6.4.1. Valoración de la función dopaminérgica presináptica	54
6.4.1.1. Valoración de la actividad de la AAD	54
6.4.1.2. Valoración del DAT	56

6.4.1.3. Valoración del VMAT2	57
6.4.2. Valoración de la función dopaminérgica postsináptica	57
6.4.3. Valoración de otros sistemas de neurotransmisores	58
6.4.4. Otros estudios de neuroimagen funcional	59
6.5. Tratamiento y progresión de la enfermedad de Parkinson	60
6.5.1. La levodopa, ¿neurotóxica o neuroprotectora? Estudios básicos	61
6.5.2. La levodopa, ¿neurotóxica o neuroprotectora? Estudios clínicos	63
Hipótesis y objetivos	65
Material y métodos	69
1. Animales	71
2. Administración de la MPTP y grupos experimentales	71
3. Evaluación motora	72
4. Estudios de resonancia magnética cerebral	72
5. Estudios de tomografía de emisión de positrones	73
5.1. Adquisición de las imágenes	74
5.2. Análisis y cuantificación de los estudios	75
5.2.1. Creación de las imágenes paramétricas	75
5.2.2. Cuantificación por regiones de interés	75
5.3. Análisis mediante SPM	76
6. Sacrificio de los animales y preparación del tejido	76
7. Técnicas histológicas	77
7.1. Inmunohistoquímica para tiroxina hidroxilasa	77
7.2. Tinción de Nissl	78
7.3. Cuantificación celular	78
7.4. Cuantificación de proteínas mediante <i>Western blot</i>	79
8. Análisis estadístico	80
Resultados	81
1. Actividad motora	83
2. Estudios de neuroimagen	85
2.1. Captación estriatal de ¹⁸ F-fluorodopa en el animal intacto	85
2.2. Efecto de la administración de la MPTP sobre la captación estriatal de ¹⁸ F-fluorodopa	86
2.3. Efecto del placebo y la levodopa sobre la captación estriatal de ¹⁸ F-fluorodopa	89
2.3.1. Análisis de la variación de la constante de captación de ¹⁸ F-fluorodopa dentro cada grupo experimental	89
2.3.2. Análisis comparativo entre los dos grupos experimentales de la variación de la constante de captación de ¹⁸ F-fluorodopa	94
2.3.3. Análisis de imagen mediante SPM del efecto de la levodopa sobre la captación de ¹⁸ F-fluorodopa	96
3. Análisis cuantitativo de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc	97
4. Análisis cuantitativo de las células TH-ir estriatales	98
4.1. Descripción de la morfología de las neuronas TH-ir del estriado	98
4.2. Cuantificación de las neuronas TH-ir del estriado de los distintos grupos experimentales	100
5. Cuantificación de las proteínas dopaminérgicas presinápticas	103
5.1. Cuantificación de la TH	103
5.2. Cuantificación del DAT	106
5.3. Cuantificación de la AAD	106
6. Correlaciones entre los resultados de neuroimagen y los hallazgos <i>post-mortem</i>	109
6.1. Correlaciones entre los datos de neuroimagen y los datos histológicos.	109

6.2. Correlaciones entre los datos histológicos	110
Discusión	113
1. Discusión de la metodología	115
1.1. Modelos animales de la EP y escalas para la evaluación del parkinsonismo	115
1.2. Estudios de imagen	117
1.3. Tamaño de la muestra y pruebas estadísticas	119
2. Discusión de los resultados	120
2.1. Actividad motora de los animales y efecto de la MPTP en la captación estriatal de ¹⁸ F-fluorodopa	120
2.2. La levodopa aumenta la actividad de la AAAD medida en el PET con ¹⁸ F-fluorodopa	122
2.3. La levodopa no tiene efecto sobre la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc	125
2.4. La levodopa induce un aumento de las neuronas dopaminérgicas del estriado	127
2.5. Modificación de los marcadores dopaminérgicos presinápticos	131
Conclusiones	137
Bibliografía	141
Anexo	173

Abreviaturas

A

AAAD: aminoácido aromático decarboxilasa.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxiazolpropiónico.

AMS: atrofia multisistémica.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ATP: adenosín trifosfato.

B

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés *brain-derived neurotrophic factor*).

C

CL: cuerpos de Lewy.

COMT: catecol O-metiltransferasa.

D

DAT: transportador sináptico de dopamina.

DCB: degeneración corticobasal.

DCL: demencia con cuerpos de Lewy.

DDC: DOPA-decarboxilasa.

DS: desviación estándar.

DTBZ: ^{11}C -dihidotetrabenzina.

E

EA: enfermedad de Alzheimer.

En1: gen *Engrailed 1*.

EP: enfermedad de Parkinson.

F

^{18}F FDG: ^{18}F -fluorodeoxiglucosa.

FWE: del inglés *family wise error*.

G

GABA: ácido γ -aminobutírico.

GDNF: factor neurotrófico derivado de células gliales (del inglés *glial cell-derived neurotrophic factor*).

GGBB: ganglios basales.

Gpe: globo pálido externo.

Gpi: globo pálido interno.

H

H_2O_2 : peróxido de hidrógeno.

Hz: Hertzio.

I

IMAO: inhibidor de la enzima monoamino oxidasa.

ICOMT: inhibidor de la enzima catecol O-metiltransferasa.

K

ki: constante de captación de la ¹⁸F-fluorodopa.

M

MAO-B: monoamino oxidasa B.

MPP+: 1-metil-4-fenilpiridinio.

MPPP: 1-metil-4-fenil-4-propionoxi-piperidina.

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidroxipiridina.

N

NMDA: N-metil-d-aspartato.

NST: núcleo subtalámico.

O

6-OHDA: 6-hidroxidopamina.

P

PBS: solución salina tamponada con fosfato (del inglés *phosphate buffer saline*).

PET: tomografía de emisión de positrones (del inglés *positron emission tomography*).

PFA: paraformaldehído.

PSP: parálisis supranuclear progresiva.

R

REM: movimientos oculares rápidos (del inglés *rapid eye movement*).

RM: resonancia magnética.

S

SN: sustancia negra.

SNC: sistema nervioso central.

SNP: sistema nervioso periférico.

SNpc: sustancia negra *pars compacta*.

SNpr: sustancia negra *pars reticulata*.

SPECT: tomografía computerizada por emisión de fotón único (del inglés *single photon emission computed tomography*).

SMP: mapeo estadístico paramétrico (del inglés *statistical parametric mapping*).

T

TH: tirosina hidroxilasa.

TH-ir: tirosina hidroxilasa inmunorreactiva.

U

UCH-L1: ubiquitina carboxiterminal esterasa L1.

UPDRS: escala unificada de evaluación de la enfermedad de Parkinson (del inglés *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*).

V

VA: ventral anterior.

VL: ventral lateral.

VMAT2: transportador vesicular de monoaminas 2.
VOIs: volúmenes de interés.

W

WB: Western blot.

Introducción

1. La enfermedad de Parkinson

1.1. Aspectos generales

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita en 1817 por James Parkinson en su monografía "Ensayo sobre la parálisis agitante", en la que establece los síntomas cardinales de la entidad - rigidez, temblor de reposo, bradicinesia y trastorno de la marcha - que posteriormente llevaría su nombre [1]. La presencia de estas manifestaciones clínicas en un sujeto permite establecer el diagnóstico de un síndrome parkinsoniano, cuya causa más frecuente es la EP. La EP tiene un inicio asimétrico y los pacientes obtienen una clara mejoría clínica con el tratamiento dopaminérgico. El término parkinsonismo plus o atípico designa a entidades que cursan con parkinsonismo asociado a otros signos clínicos. Dentro de este grupo se encuentran enfermedades como la atrofia multisistémica (AMS), la degeneración corticobasal (DCB), la parálisis supranuclear progresiva (PSP) o la demencia con cuerpos de Lewy (DCL) [2,3] . Cuando un paciente presenta un síndrome rígido-acinético antes de los 40 años de edad se utiliza el término parkinsonismo de inicio temprano. Dentro de este grupo aquellos que inician los síntomas entre los 21 y los 40 años con un cuadro clínico similar a la EP reciben la designación de EP de inicio juvenil. En aquellos que comienzan con síntomas antes de los 21 años de edad, el vocablo utilizado es parkinsonismo juvenil [4].

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente tras la enfermedad de Alzheimer (EA). La incidencia anual de la EP en los países occidentales es de 8-18 nuevos casos por 100.000 habitantes y la prevalencia se estima en un 0,3% de la población total, que se eleva al 1-2% cuando se consideran únicamente las personas mayores de 60 años [5]. La frecuencia de la EP, por lo tanto, aumenta con la edad, y es poco común antes de los 50 años. De hecho, sólo el 5-10% de los casos presentan una EP de inicio juvenil [6]. La EP suele iniciarse alrededor de los 65 años de edad y se adelanta si existen antecedentes de EP en familiares de primer grado [7,8] . En algunos estudios epidemiológicos se ha objetivado un ligero predominio del sexo

masculino, lo que de confirmarse, podría indicar un posible efecto neuroprotector de los estrógenos en esta enfermedad [9].

1.2. Aspectos clínicos

Los síntomas cardinales de la EP son el temblor, la rigidez y la acinesia. El temblor de reposo unilateral a 4-6 Hz suele ser el primer síntoma en casi el 70% de los pacientes, siendo más frecuente la afectación de la extremidad superior [2]. En ocasiones, también se observa temblor en los músculos de la mandíbula y la lengua, pero no en otros músculos axiales. El temblor de reposo es el síntoma cardinal que peor responde a la terapia sustitutiva dopaminérgica. Se ha postulado que esta falta de respuesta podría deberse a la participación de otros sistemas de neurotransmisión o a la posibilidad de que la acinesia y el temblor estén mediados por la disfunción de diferentes circuitos de los ganglios basales [10]. Esta hipótesis está apoyada por estudios de tomografía de emisión de positrones (PET) con ^{18}F -fluorodopa que demuestran una buena correlación entre la captación estriatal de este trazador y el grado de rigidez y acinesia [11]. Sin embargo, la presencia e intensidad del temblor se correlaciona con la unión de radiotrazadores de receptores serotoninérgicos en los núcleos del rafe [12].

La rigidez se define como la resistencia al desplazamiento pasivo de una articulación. Es más evidente con los movimientos lentos, y aumenta con las tareas mentales o cuando se realizan movimientos voluntarios con la extremidad contralateral (maniobra de Froment). En los estadios iniciales de la EP la rigidez es más evidente en los músculos axiales, lo que probablemente contribuye a la típica postura que adoptan los pacientes [10].

El término acinesia, definido como ausencia de movimiento, comprende la hipocinesia (reducción de la amplitud del movimiento) y la bradicinesia (lentitud de movimiento). Esta diferencia clínica, aunque sutil, es importante, ya que pueden responder a distintos mecanismos fisiopatológicos. La hipocinesia se manifiesta como una disminución de la expresividad facial y de la frecuencia de parpadeo, así como con la disminución del braceo durante la marcha y la

micrografía. Estos síntomas son los que producen mayor incapacidad funcional en los pacientes al comienzo de la enfermedad [10].

La inestabilidad postural y el trastorno de la marcha aparecen en estadios más avanzados de la EP. Su presencia aumenta el riesgo de caídas y responden peor que el resto de los síntomas motores al tratamiento dopaminérgico. Los pacientes adoptan una postura caracterizada por la flexión del cuello, tronco y extremidades, y la marcha se vuelve más lenta con arrastre de los pies. También aparece dificultad para iniciar la marcha, bloqueos al girar o al llegar a un obstáculo y el fenómeno de festinación, que consiste en una marcha a pasos rápidos y cortos que el paciente no puede detener [13].

En los últimos años, se ha prestado una atención especial a los síntomas no motores que afectan a los pacientes con EP. Dentro de ellos se incluyen trastornos neuropsiquiátricos, autonómicos, sensitivos y del sueño. Los síntomas no motores son muy frecuentes en la EP y tienen un impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes y cuidadores, pudiendo llegar a dominar la sintomatología clínica en las fases avanzadas de la enfermedad. Sin embargo, algunos síntomas no motores pueden preceder en años o décadas al desarrollo de los síntomas motores característicos de la EP, constituyendo la denominada fase premotora de la enfermedad. Éste es el caso de la disfunción del olfato, la depresión, los trastornos de la conducta en la fase REM del sueño y el estreñimiento. La existencia de esta fase premotora podría ser de utilidad para realizar un diagnóstico precoz de esta entidad, en la que la degeneración de la sustancia negra (SN) fuera mínima o inexistente [14-16].

1.3. Diagnóstico

El diagnóstico de la EP continúa siendo clínico, y se realiza mediante una correcta anamnesis y exploración física. El diagnóstico de un síndrome parkinsoniano requiere de la presencia de bradicinesia asociada a otro signo, como el temblor de reposo, la rigidez o la inestabilidad postural. La EP es la causa más frecuente de síndrome parkinsoniano y suele ser el diagnóstico más probable cuando no existen síntomas atípicos o datos en las pruebas de neuroimagen estructural que orienten a un diagnóstico alternativo. Cuando esto

sucede, debe plantearse el diagnóstico diferencial con otras entidades, diferentes a la EP, que cursan con un síndrome parkinsoniano. Por otro lado, una forma de presentación asimétrica, la progresión clínica lenta, la presencia de temblor de reposo o la respuesta mantenida al tratamiento con levodopa apoyan el diagnóstico de EP [13]. No obstante, hasta el 10% de los pacientes con un síndrome parkinsoniano son erróneamente diagnosticados de EP [17]. Sin embargo, cuando el diagnóstico es realizado por un neurólogo especializado en Trastornos del Movimiento la correlación clínico-patológica es muy buena, con una sensibilidad del 91,1%, una especificidad del 98,4% y un valor predictivo positivo del 98,6%. Las entidades con las que con mayor frecuencia se confunde la EP son la AMS, la PSP y la DCB [18]. Para mejorar la exactitud diagnóstica disponemos de un gran número de exploraciones complementarias que incluyen estudios genéticos, de respuesta a fármacos dopaminérgicos, neurofisiológicos, de función autonómica y olfatoria, así como de neuroimagen estructural y funcional [19].

2. Etiopatogenia de la enfermedad de Parkinson

2.1. Factores ambientales

Los estudios epidemiológicos han contribuido a conocer mejor la etiopatogenia de la EP y, en concreto, el papel de los factores genéticos y ambientales en el desarrollo de esta enfermedad. El descubrimiento de que la exposición a la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidroxipiridina (MPTP) podía causar un parkinsonismo similar a la EP, planteó la hipótesis de que la exposición a una toxina medioambiental pudiera ser responsable de la aparición de la EP en algunos sujetos [20]. El MPTP y otros pesticidas como el paraquat y la rotenona, son inhibidores selectivos del complejo I de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria e inducen la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra *pars compacta* (SNpc) cuando se administra a animales de laboratorio, lo que ha servido para obtener modelos animales de esta entidad [21]. En este sentido, la evidencia actual establece una asociación positiva entre la exposición a pesticidas y el riesgo de padecer EP [22-24], relación que es más fuerte en varones de edad avanzada. Todo ello indica que los factores ambientales juegan un papel muy importante en los

casos de EP de inicio tardío [25]. Otro hallazgo constante de los estudios epidemiológicos es la relación inversa entre EP y el hábito de fumar o tomar café [26]. Sin embargo, se desconoce el significado fisiopatológico de esta asociación en el contexto de la EP.

2.2. Factores genéticos

Como ya se ha comentado anteriormente, los factores genéticos intervienen en la etiología de la EP. En este sentido, los estudios publicados establecen sistemáticamente un aumento del riesgo de padecer EP cuando existen antecedentes familiares de esta enfermedad, siendo el riesgo mayor cuando la EP es de inicio temprano [27]. En efecto, los estudios realizados en gemelos han confirmado que los factores genéticos tienen un mayor peso cuando los síntomas comienzan antes de los 50 años. Tanner y colaboradores mostraron que cuando el inicio de la EP se produce antes de esta edad, el gemelo monocigótico tiene una probabilidad seis veces mayor de desarrollar la enfermedad que un gemelo dicigótico [28]. Posteriormente, se han publicado estudios de gemelos en los que, además de la información clínica, se estudiaba mediante PET con ^{18}F -fluorodopa la existencia de una denervación dopaminérgica en los sujetos asintomáticos. Los resultados obtenidos de este estudio mostraron una reducción significativa de la función dopaminérgica putaminal en los gemelos monocigóticos asintomáticos que progresa al cabo de 7 años. Además, en muchos casos y tras un tiempo variable, los gemelos desarrollaron criterios clínicos para el diagnóstico de EP. En este sentido, es muy llamativo que el inicio de los síntomas en individuos genéticamente idénticos pueda distanciarse tantos años, lo que indica una interacción compleja entre los factores genéticos y ambientales [29-31].

Uno de los descubrimientos más importantes en la investigación de la EP ha sido la identificación de genes asociados a parkinsonismo familiar (Tabla 1). Se estima que las mutaciones de estos genes están implicadas únicamente en el 10% de los casos de EP. No obstante, su descubrimiento ha sido de gran utilidad para conocer algunos de los mecanismos moleculares implicados en la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y ha permitido desarrollar modelos transgénicos de la enfermedad [4,9,32,33]. En el caso de la EP

esporádica, se han estudiado qué genes podrían contribuir a aumentar el riesgo de padecer esta entidad. Los estudios publicados indican que la mutación del gen de la glucocerebrosidasa aumenta considerablemente el riesgo de padecer la enfermedad, sobre todo en familias judías, y constituye actualmente el factor de riesgo genético más importante para desarrollar la EP [34,35].

2.3. Principales mecanismos de neurodegeneración

A pesar de todo lo expuesto anteriormente, la etiología de la mayor parte de los pacientes con EP se desconoce, y tampoco se conocen los mecanismos patogénicos responsables del proceso neurodegenerativo de esta enfermedad. Hay evidencias de que el proceso de muerte neuronal es consecuencia de la activación de mecanismos de apoptosis celular, en el que parecen estar implicados eventos como la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la inflamación, los mecanismos de excitotoxicidad y la disfunción los sistemas celulares encargados de la degradación de proteínas como el sistema ubiquitin-proteasoma o la vía de la autofagia lisosomal [3,36-40].

2.3.1. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo fue el primer mecanismo patogénico que se consideró responsable de la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la EP. Esta hipótesis se basa en el hecho de que el metabolismo de la dopamina genera especies reactivas del oxígeno capaces de alterar la estructura y la función de distintas proteínas celulares, dando lugar a un estado de estrés oxidativo celular. A favor de esta hipótesis se encuentran numerosos estudios que demuestran que los reactantes oxidativos inducen la muerte de neuronas dopaminérgicas, y determinados hallazgos en cerebros de pacientes [41]. De hecho, en la SNpc de los pacientes con EP existe un aumento de moléculas oxidadas, incluyendo proteínas, lípidos y ácidos nucleicos [42-44], y una disminución de las enzimas antioxidantes o sus co-enzimas, como el glutatión reducido [45-47].

Tabla 1. Loci y genes relacionados con parkinsonismos familiares

LOCUS	GEN	HERENCIA	CROMOSOMA	PROTEINA	FUNCION PROTEINA	CLINICA
PARK 1/ PARK 4	SNCA	AD	4q21-23/4p16	α - Sinucleína	Componente CL	Similar EPI, inicio temprano y progresión rápida. Demencia y disautonomía.
PARK 2	Parkin	AR	6q25.2-27	Parkina	Componente SUP	EP de inicio temprano, distonía y discinecias tempranas.
PARK 3	Desconocido	AD	2p13	Desconocida	Desconocida	Similar EPI.
PARK 5	UCH-L1	AD	4p14	UCH-L 1	Componente SUP	Similar EPI.
PARK 6	PINK-1	AR	1p35-36	PINK-1	Protección frente disfunción mitocondial	EP de inicio temprano.
PARK 7	DJ-1	AR	1p36	DJ-1	Protección frente estrés oxidativo	EP de inicio temprano.
PARK 8	LRRK 2	AD	12p11.2-q13.1	Dardarina	Desconocida	Similar EPI
PARK 9	ATP 13A2	AR	1p36	ATP 13A2	ATPasa	Parkinsonismo de inicio temprano, piramidalismo y demencia (Síndrome de Kufor- Rakeb)
PARK 10	Desconocido	Desconocida	1p32	Desconocida	Desconocida	Similar EPI
PARK 11	Desconocido	Desconocida	2q36-37	Desconocida	Desconocida	No fenotipo definitivo
PARK 12	Desconocido	Desconocida	Xq21-25	Desconocida	Desconocida	Similar EPI
PARK 13	HTRA2	AD	2p12	HTRA2	Inhibidor de proteínas de apoptosis	Similar EPI
PARK 14	PLA 2 G6	AR	22q12.6-13.1	PLA 2 G6	Fosfolipasa	Distonía y parkinsonismo con respuesta a levodopa
PARK 15	FBX 07	AR	22q12-13	Proteína 7F-OX	Desconocida	Síndrome parkinsoniano-piramidal de inicio temprano
PARK 16	Desconocido	AD	1q32	Desconocida	Desconocida	Similar EPI

AD: autosómico dominante; AR: autosómico recesivo; CL: cuerpos de Lewy; EP: enfermedad de Parkinson; EPI: enfermedad de Parkinson idiopática; SUP: sistema ubiquitin-proteasoma.

2.3.2. Disfunción mitocondrial

La disfunción mitocondrial es considerada una posible causa de neurodegeneración en la EP. La mitocondria es una organela celular que se encarga de la producción de energía a través de la fosforilación oxidativa, pero también cumple un papel fundamental en el proceso de muerte celular mediada por la apoptosis. Un fallo de este orgánulo conlleva un déficit de energía que provoca la disfunción, y en ocasiones, la muerte celular. Estas rutas metabólicas constan de un gran número de reacciones de oxidación-reducción con intercambio de electrones y, por lo tanto, el daño mitocondrial provoca el aumento de los radicales libre y el consiguiente estrés oxidativo [48].

Esta hipótesis etiopatogénica se estableció al objetivarse el déficit del complejo I de la cadena transportadora de electrones en la SN de pacientes con EP idiopática [49,50] . Por otro lado, se ha observado que la inhibición del complejo I mitocondrial por la exposición a diferentes toxinas como el MPTP, induce la degeneración de las neuronas dopaminérgicas [21,51]. Por último, el descubrimiento de que algunos de los genes relacionados con la EP familiar codifican proteínas mitocondriales sugiere un papel muy importante de la mitocondria en la patogenia de esta enfermedad neurodegenerativa [52].

2.3.3. Neuroinflamación

El papel de la inflamación en la patogenia de la EP se propuso tras el descubrimiento por parte de McGeer y colaboradores de la presencia de microglía activada en la SN de los cerebros de pacientes con EP [53]. Posteriormente, se objetivó un incremento de los niveles de citoquinas proinflamatorias y un aumento de la expresión de determinadas enzimas relacionadas con la inflamación, como la óxido nítrico sintetasa y la ciclooxigenasa 2 [54-60]. Los trabajos experimentales apoyan la hipótesis de que la neuroinflamación estaría implicada en la muerte celular dopaminérgica de la EP. De hecho, la degeneración dopaminérgica inducida por distintas neurotoxinas cursa con activación glial y liberación de citoquinas. Asimismo, la inyección intranigrostriatal de lipopolisacáridos en ratas causa activación microglial y degeneración dopaminérgica [40]. Por otra parte, algunos estudios

epidemiológicos han mostrado la disminución del riesgo de padecer EP en sujetos que consumen fármacos antiinflamatorios [61,62]. En el momento actual, se desconoce el factor que induce la activación de la microglía en la EP. Sin embargo, se considera que una vez iniciado este proceso se crea un ambiente inflamatorio que conduce a la disfunción y muerte de las poblaciones neuronales potencialmente vulnerables [63].

2.3.4. Excitotoxicidad

El glutamato actúa como neurotransmisor excitatorio en un número importante de sinapsis, pero al mismo tiempo puede ejercer una acción neurotóxica que se conoce con el nombre de excitotoxicidad [64]. En condiciones fisiológicas la unión del glutamato a los receptores N-metil-d-aspartato (NMDA) o ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxiazolpropiónico (AMPA) induce la activación de los canales de calcio de la membrana plasmática con el consiguiente aumento de su concentración dentro de la célula. Cuando existe una estimulación excesiva de los receptores de glutamato, la entrada masiva de calcio provoca daño mitocondrial, formación de radicales libres de oxígeno y la activación de enzimas capaces de inducir la muerte celular [65]. En la EP hay evidencias indirectas que sugieren que la excitotoxicidad juega un papel en la etiopatogenia de esta entidad. Por ejemplo, en los pacientes con EP se ha descrito una hiperactividad del núcleo subtalámico (NST) que provocaría un incremento de la liberación de glutamato sobre las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, pudiendo contribuir de esta manera a la muerte neuronal [66]. Sin embargo, esta hipótesis no ha podido ser confirmada y la experiencia clínica ha demostrado que la estimulación cerebral profunda reduce la actividad excitadora del NST pero no modifica el curso de la enfermedad. Otra evidencia indirecta del papel del glutamato en la etiopatogenia de la EP la proporcionan los estudios experimentales que han demostrado que los antagonistas del receptor NMDA o el bloqueo de los canales de calcio dependientes de voltaje protegen frente a las neurotoxinas en modelos animales de la EP [67,68].

2.3.5. Estrés proteolítico

Como se mencionará más adelante, en la EP existen inclusiones intraneuronales denominados cuerpos de Lewy (CL), formados por el depósito de

distintas proteínas, principalmente de la α -sinucleína. La hipótesis etiopatogénica del estrés proteolítico sugiere que la formación de estos acúmulos es consecuencia de la alteración de los sistemas celulares encargados de la degradación proteica, y que la acumulación y agregación de las proteínas provoca la alteración de diversas funciones celulares conduciendo a la muerte celular por apoptosis [69].

La célula dispone, fundamentalmente, de dos mecanismos para la degradación de proteínas que son el sistema ubiquitin-proteasoma y la vía de la autofagia lisosomal. El sistema ubiquitin-proteasoma se encarga de la degradación de proteínas mutadas, desplegadas o dañadas y participa, también, en otros procesos celulares como el recambio de proteínas de vida corta [70]. Las proteínas que van a ser eliminadas necesitan ser marcadas con moléculas de ubiquitina para poder ser reconocidas por el proteasoma. Tras el proceso de degradación, los péptidos y aminoácidos generados son reciclados para la formación de nuevas proteínas, mientras que los monómeros de ubiquitina son reutilizados para marcar otras proteínas [36]. Estudios histológicos *postmortem* apoyan la teoría de que la disfunción del sistema ubiquitin-proteasoma está implicada en la patogénesis de la EP. En este sentido, los CL, además de α -sinucleína, contienen ubiquitina y otros componentes del sistema ubiquitin-proteasoma [71,72]. Además, en la SN de los pacientes con EP se ha encontrado una reducción de los niveles de las subunidades 20S y PA28 del proteasoma y una sobreexpresión compensatoria de la subunidad 19S [73-76]. Los estudios genéticos en pacientes con formas familiares de EP también apoyan esta teoría, ya que determinados genes implicados en el desarrollo de la enfermedad codifican proteínas del sistema ubiquitin-proteasoma como la parkina y la ubiquitina carboxiterminal esterasa L1 (UCH-L1) [73,77].

La autofagia es un proceso celular que tiene como objetivo la degradación lisosomal de proteínas estables de vida larga u organelas celulares. Este sistema se activa cuando existen proteínas de gran tamaño o acúmulos proteicos que no pueden ser degradados por el sistema de la ubiquitin-proteasoma. La vía de la autofagia tiene tres rutas distintas: la macroautofagia, la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas. La macroautofagia es inducida por periodos cortos de estrés celular - en el contexto de una infección, la exposición a una toxina,

privación de nutrientes o estrés oxidativo -, mientras que la autofagia mediada por chaperonas se induce cuando este periodo se prolonga. Por otro lado, la microautofagia no se activa por el estrés celular, sino que es un proceso constante de recambio de proteínas del citosol celular. La autofagia mediada por chaperonas se distingue de las otras dos rutas porque utiliza un mecanismo celular selectivo mediante el cual las proteínas pueden entrar en los lisosomas para su ulterior degradación [38,78-80].

La implicación de la vía de la autofagia lisosomal en la etiopatogenia de la EP viene sustentada por estudios experimentales que han demostrado que es uno de los mecanismos más importantes en la degradación de la α -sinucleína [69,81-83]. De hecho, la α -sinucleína no mutada es transportada selectivamente a los lisosomas para su degradación utilizando la autofagia mediada por chaperonas. En esta línea, la α -sinucleína mutada se une a los receptores de la membrana lisosomal que median el proceso de la autofagia y bloquean la degradación, no sólo de la α -sinucleína mutada, sino probablemente también de otros substratos [78]. Por último, la acumulación patológica de proteínas tendría un efecto tóxico sobre la biología de la neurona. Otros hallazgos genéticos, bioquímicos y toxicológicos apoyan la hipótesis de la disfunción de la vía de la autofagia en la etiopatogenia de la EP [80]. Por ejemplo, la mutación del gen *ATP13A2*, que codifica una ATPasa lisosomal, se ha relacionado con un tipo de parkinsonismo familiar de comienzo temprano [84,85].

2.4. Los modelos animales de la enfermedad de Parkinson

En el momento actual, todavía se desconocen muchos aspectos de la neurobiología de la EP. Este hecho, hace que sea de gran importancia la utilización de los modelos animales experimentales [86]. Sin embargo, no existe un modelo perfecto para el estudio de la EP. Por este motivo, es importante conocer las características de los modelos experimentales de las enfermedades humanas, así como, las ventajas y limitaciones de los ya existentes (Tablas 2 y 3). Es importante tener en cuenta que cualquier modelo de EP no es la EP y, por lo tanto, el modelo servirá para contestar a preguntas concretas relacionadas con algún aspecto de esta enfermedad.

El modelo experimental ideal para la EP debería cumplir las siguientes características:

- a. Los animales deberían tener un número normal de neuronas dopaminérgicas en el momento del nacimiento.
- b. Los animales tendrían que desarrollar una pérdida gradual y selectiva de las neuronas dopaminérgicas durante la edad adulta que debe ser superior al 50% y objetiva en estudios de neuroimagen funcional, histológicos e inmunohistoquímicos.
- c. Las manifestaciones clínicas tendrían que ser similares a las de los pacientes con EP y revertir con la administración de fármacos dopaminérgicos.
- d. El estudio histológico debe ser similar al de la EP con la presencia de los característicos cuerpos de Lewy y la degeneración de otros núcleos, como el *locus coeruleus* o los núcleos del rafe.
- e. En el caso de modelos genéticos, debería ser el resultado de una única mutación.
- f. Se prefiere un modelo en el que la enfermedad se desarrolle en un periodo corto de tiempo (pocos meses), ya que esto permitiría reducir los costes de mantenimiento y establecer de forma rápida el efecto de los diferentes agentes terapéuticos [21].

Los primeros modelos animales de la EP se desarrollaron en roedores tratados con reserpina y α -metil-p-tirosina. La reserpina produce una depleción de las reservas de monoaminas cerebrales y, como consecuencia, da lugar a un cuadro de inmovilidad que revierte con la administración de levodopa. La α -metil-p-tirosina es un inhibidor selectivo de la tirosina hidroxilasa (TH), que produce una depleción selectiva de dopamina. En el caso de ambas sustancias, los síntomas producidos son transitorios y los animales no desarrollan cambios histopatológicos. No obstante, estos modelos sirvieron para evaluar el efecto antiparkinsoniano de la levodopa y algunos agonistas dopaminérgicos [87].

En el momento actual, existen diferentes modelos animales de la EP. Los más utilizados en los estudios básicos son los resultantes de la exposición a neurotoxinas como la rotenona, la 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) y la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-

tetrahidropiridina (MPTP). No obstante, también se han desarrollado distintos modelos genéticos de esta enfermedad. A continuación se exponen los modelos animales de EP disponibles en la actualidad, sus similitudes y diferencias con la EP, y su posible utilidad en el estudio de esta enfermedad.

2.4.1. Modelos por exposición a neurotoxinas

2.4.1.1. La 6-hidroxidopamina

Esta sustancia es un análogo de la noradrenalina y fue la primera neurotoxina utilizada para crear modelos animales experimentales de la EP. La 6-OHDA tiene una alta afinidad por los transportadores de membrana de dopamina y norepinefrina, por lo que puede producir lesión en los sistemas dopaminérgicos y noradrenérgicos del sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP). Normalmente, esta molécula se inyecta directamente en la sustancia negra del animal o en el tracto nigroestriado con la finalidad de producir lesiones unilaterales de la SN. La 6-OHDA se acumula de forma selectiva en las neuronas dopaminérgicas y el daño está presumiblemente mediado por la generación de radicales libres, aunque también ejerce una acción inhibitoria sobre la cadena respiratoria mitocondrial. La inyección de 6-OHDA directamente en el estriado produce una degeneración retrograda de las neuronas dopaminérgicas de la SN homolateral y algunos autores han postulado que este modelo podría ser un modelo de degeneración neuronal progresiva similar a la que ocurriría en la EP. El modelo de lesión dopaminérgica unilateral en roedores es conocido también como modelo rotatorio, ya que los animales presentan una respuesta rotatoria contralateral a la lesión nigroestriada cuando se les administra un agonista dopaminérgico y homolateral a la lesión cuando se les administra un fármaco como la amfetamina que incrementa la liberación de dopamina de las terminales sinápticas. Las principales limitaciones del modelo animal por 6-OHDA son la ausencia de CL y que esta sustancia puede producir daños no específicos en otros grupos neuronales. No obstante, el modelo unilateral de 6-OHDA continúa siendo uno de los modelos experimentales de EP más utilizados en estudios preclínicos para el desarrollo de nuevos fármacos sintomáticos, neuroprotectores y en terapia regenerativa [21,88,89].

2.4.1.2. La rotenona

La rotenona es un pesticida que se extrae de la raíz de ciertas leguminosas. Es una sustancia cuya toxicidad principal está ligada a la inhibición selectiva del complejo I mitocondrial. No obstante, existen otros mecanismos implicados que inducirían daño celular por la formación de radicales libres, inflamatorios, activación de vías apoptóticas, agregación de α -sinucleína o inhibición de la formación de microtúbulos. Esta sustancia se inyecta en la vena yugular o en el peritoneo de ratas mediante una bomba de infusión osmótica y produce una degeneración progresiva de las neuronas nigroestriatales [90]. Los animales tratados desarrollan bradicinesia, inestabilidad postural, trastorno de la marcha y temblor. Estos síntomas mejoran con la administración de apomorfina y levodopa. En el estudio histológico es reseñable la presencia de inclusiones citoplasmáticas en las neuronas nigrales que contienen ubiquitina y α -sinucleína y al microscopio electrónico presentan características similares a los CL. La administración de esta sustancia a macacos no reproduce los síntomas motores ni tampoco la degeneración neuronal dopaminérgica típica de la EP. Este modelo cumple muchos de los criterios para ser un modelo válido de EP, pero tiene como mayor limitación la susceptibilidad variable de las ratas a la rotenona y la dificultad para reproducir este modelo en algunos laboratorios [21,88].

2.4.1.3. La 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidroxipiridina (MPTP)

El descubrimiento de la MPTP se produjo en 1982 en California, cuando un grupo de adictos a drogas desarrollaron un síndrome rígido-acinético grave de inicio subagudo que mejoraba con levodopa y agonistas dopaminérgicos. Las investigaciones posteriores pusieron de manifiesto que este cuadro clínico era producido por la inyección sistémica de un análogo sintético de la heroína, la 1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina (MPPP), contaminado con un subproducto, la MPTP [20]. La exposición animal a la MPTP ha dado lugar a modelos de la EP en ratones y primates no humanos [20,91,92]. El modelo con primates tiene ciertas ventajas con respecto al murino, ya que tanto la anatomía como la fisiología de los ganglios basales de los macacos son semejantes a los del humano. La administración sistémica de esta neurotoxina constituye el modelo más fiable y reproducible de la EP en primates, dando lugar a un parkinsonismo bilateral. Sin embargo, también se puede administrar MPTP a través de una arteria carótida interna, resultando un

parkinsonismo unilateral [21]. A continuación se expondrán las principales similitudes y diferencias entre el modelo del mono intoxicado con MPTP y la EP.

Los mecanismos etiopatogénicos implicados en la degeneración dopaminérgica inducida por la MPTP son parecidos, en cierta medida, a los que se han postulado para los pacientes con EP. La MPTP es una molécula muy lipofílica, por lo que puede cruzar la barrera hematoencefálica. Una vez en el cerebro es captada por las células gliales y, por acción de la enzima monoamino oxidasa B (MAO-B) se transforma en el metabolito activo 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+). El MPP+ es captado por las terminales dopaminérgicas utilizando el transportador sináptico de dopamina (DAT). Una vez en el citoplasma de las neuronas dopaminérgicas puede acumularse a las vesículas mediante la acción del transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2), o en las mitocondrias donde inhibe el complejo I de la cadena transportadora de electrones. Como consecuencia, se produce una disminución en la producción de ATP y un incremento de radicales libres que, secundariamente, produce la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SN, probablemente a través de mecanismos inflamatorios y/o de apoptosis celular [21,88,93].

Con respecto a la neuropatología, al igual que sucede en la EP, las neuronas dopaminérgicas de la SNpc son especialmente vulnerables a la MPTP mientras que las del área tegmental ventral son más resistentes [94]. La MPTP también causa una pérdida neuronal en el *locus coeruleus* similar a la que se produce en la EP [95], pero sin embargo, en este modelo animal existe una escasa afectación de otros sistemas de neurotransmisión. Como se ha mencionado, la administración de la MPTP a monos reproduce la pérdida moderada-severa de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc encontrada en los pacientes con EP, que se acompaña de una depleción de dopamina estriatal mayor o igual al 80%. No obstante, cuando la administración de MPTP es aguda, la denervación dopaminérgica inducida es de igual magnitud en el caudado y en el putamen, un patrón que es distinto al que se observa en la EP [94,96]. Sin embargo, cuando el MPTP se administra de forma prolongada y con pequeñas dosis, da lugar a un parkinsonismo de evolución más lenta con una lesión más selectiva de la porción ventral de la SNpc. Por lo tanto, se

produce una mayor pérdida de terminales dopaminérgicas en el putamen, siguiendo el patrón topográfico observado en la EP [94]. Por lo tanto, el modelo crónico de MPTP en primates tiene unas características que se acercan más a la EP que el resultante de la administración aguda de este compuesto [21,97,98].

Una de las principales limitaciones del modelo de parkinsonismo inducido por MPTP en primates, en lo que respecta a la neuropatología, es la ausencia de cuerpos de inclusión citoplasmáticos compatibles con CL [99], que sí han sido descritos en otros modelos [97]. No obstante, en monos tratados de forma aguda y subaguda con la MPTP se ha observado un aumento de los niveles de α -sinucleína en la SNpc [100,101]. En animales tratados con MPTP de forma aguda se ha descrito también la agregación de α -sinucleína a nivel axonal en la SNpc [102]. Así mismo, en el modelo crónico de MPTP se encuentran inclusiones neuronales que recuerdan a los CL [95], aunque no presentan las mismas características bajo el microscopio electrónico [103]. Estudios recientes han mostrado la presencia de agregados celulares de α -sinucleína en las neuronas dopaminérgicas de macacos intoxicados con MPTP y en axones de proyección dopaminérgica [M.R. Luquin, observaciones no publicadas].

El efecto tóxico de la MPTP en los primates reproduce el cuadro clínico característico de la EP, con la excepción del temblor de reposo, que se observa muy raramente. Estos síntomas mejoran con el tratamiento con levodopa y agonistas dopaminérgicos e incluso, pueden aparecer complicaciones motoras relacionadas con la medicación [104]. Sin embargo, aunque la administración de la MPTP a primates no humanos reproduce prácticamente todos los síntomas motores de la EP que responden a levodopa, otros síntomas no motores característicos de esta entidad no aparecen. En este sentido, algunos animales presentan hiposmia, vejiga neurógena, sialorrea, estreñimiento y seborrea, pero otros aspectos como el patrón del sueño, la somnolencia diurna o los niveles de ansiedad o depresión en el modelo animal se desconocen [89].

Uno de los aspectos a debate sobre este modelo es conocer si la administración de la MPTP es capaz de causar una degeneración progresiva de las

neuronas dopaminérgicas de la SN. En el estudio de los sujetos con parkinsonismo inducido por la MPTP se objetivó una progresión del déficit dopaminérgico nigroestriatal, una vez concluida la administración de la MPTP. Esta progresión se evaluó mediante la realización seriada de PET con ^{18}F -fluorodopa [105]. Posteriormente, el estudio neuropatológico de los cerebros de algunos de estos pacientes mostró neuromelanina extraneuronal y numerosas células microgliales activadas en la SN [106]. Resultados similares de estudios de neuroimagen e histológicos se han encontrado también en macacos intoxicados con la MPTP [107,108]. Estos hallazgos sustentaron una hipótesis etiopatogénica según la cual una exposición puntual a una neurotoxina podía inducir la muerte de un grupo reducido de neuronas y perpetuarse a lo largo del tiempo por la activación de mecanismos inflamatorios. No obstante, aunque existe un importante incremento de células microgliales activadas en la SN de macacos parkinsonianos, no se han encontrado neuronas dopaminérgicas en proceso de degeneración más allá de una semana después de interrumpir la administración del tóxico. Estos datos claramente cuestionan la hipótesis que ha considerado al modelo de parkinsonismo inducido por la MPTP como un modelo de EP progresivo [109].

2.4.1.4. Modelo secundario a la inhibición de proteasoma

La descripción por parte de varios grupos de una deficiente actividad de la subunidad 20S del proteasoma en la EP, llevó a considerar que esta enfermedad se desarrollaba por una alteración de los sistemas celulares de proteólisis. Basándose en esta hipótesis, el grupo de Olanow desarrolló un modelo progresivo de la EP en ratas tratadas crónicamente con PSI o epoxomicina, ambos inhibidores del proteasoma. Los animales desarrollaron síntomas característicos de la EP que revertían con levodopa o agonista dopaminérgicos. El estudio histológico mostró pérdida neuronal dopaminérgica en la SNpc, así como en el *locus ceruleus*, núcleo basal de Meynert y núcleo dorsal del vago. Además, las células dopaminérgicas tenían cuerpos de inclusión inmunorreactivos para α -sinucleína y ubiquitina que fueron interpretados como equivalentes a los CL de los pacientes [110,111]. Desgraciadamente lo que parecía ser un modelo ideal de EP no ha podido reproducirse en otros laboratorios, y ello plantea serias dudas sobre su utilidad y su significado patogénico [112-115].

Tabla 2. Características de los modelos animales de EP por exposición a neurotoxinas (Modificado de Beal [21])

	Pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas	Síntomas motores cuantificables	Presencia CL	Tiempo breve de desarrollo
6-Hidroxidopamina	No	Si	No	Si
Rotenona	Si (variable susceptibilidad individual)	Si	Si	Si
Modelo agudo MPTP	No	Si (en macacos similar a pacientes con EP)	No	Si
Modelo crónico MPTP	No	Si (en macacos similar a pacientes con EP)	No (presencia de agregados de α -sinucleína)	Si

CL: cuerpos de Lewy; EP: enfermedad de Parkinson; MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.

2.4.2. Modelos genéticos

En la actualidad se han desarrollado tres tipos distintos de modelos genéticos de la EP. El primero de ellos, se basa en la delección de genes involucrados en el desarrollo o mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas o su fenotipo. El segundo tipo, es el resultante de inducir o silenciar la expresión de genes relacionados con formas familiares de la EP. El tercer modelo genético es el resultante de la sobreexpresión de proteínas mutadas o no utilizando vectores virales inyectados en el cerebro de los animales, normalmente en la SN [116,117].

2.4.2.1. Modelos genéticos con defectos en genes que afectan al desarrollo de las neuronas dopaminérgicas

Dentro de este grupo de modelos genéticos, tres de ellos tienen como característica la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas de la SN. Uno de estos modelos lo constituye la cepa de ratones afaquia en la que existen mutaciones espontáneas en el gen que codifica un factor de transcripción homeodominio, el *Pitx3*. Este gen está especialmente relacionado con el desarrollo del cristalino y la mutación produce un ratón ciego. Posteriormente, se descubrió que los ratones pierden neuronas dopaminérgicas nigroestriatales después del nacimiento y desarrollan déficits motores que mejoran con la administración de levodopa. Al igual que sucede en la EP, las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral degeneran en menor medida [118]. Este modelo de ratón puede ser de interés para estudiar los factores asociados a la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas o la respuesta a tratamientos farmacológicos sintomáticos. Sin embargo, una gran limitación es que la pérdida de células dopaminérgicas no se produce durante la edad adulta del animal [117].

Otro modelo, es el resultante de silenciar un alelo del gen *Engrailed 1 (En1)*. La proteína Engrail 1 se expresa en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y parece ser un factor asociado a la supervivencia de estas células. Los ratones *En1+/-* presentan una degeneración progresiva de neuronas dopaminérgicas, tanto de la SN como del área tegmental ventral, entre las 8 y las 24 semanas tras el nacimiento. Los roedores presentan un comportamiento anhedónico y pierden habilidades motoras [119]. Curiosamente, estudios recientes han relacionado la

presencia de determinados polimorfismos de los genes *Pitx3* y *En1* con una mayor probabilidad de presentar EP [120].

El último de los modelos genéticos de este tipo es el ratón *knock-out* heterocigótico *Nurr1*. La mutación en este gen altera la transcripción de los genes que codifican la TH y el DAT, lo que sugiere que las alteraciones en *Nurr1* podrían incrementar la susceptibilidad a desarrollar EP. De hecho, el ratón *knock-out* heterocigótico *Nurr1*, que al nacer tiene un número normal de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales, muestra un incremento de la vulnerabilidad a la MPTP [121]. Cuando los ratones *Nurr1*^{+/-} envejecen muestran un empeoramiento motor asociado a la disminución de neuronas dopaminérgicas en la SN y de los niveles de dopamina en el estriado. Este modelo se ha propuesto de utilidad para el estudio de la etiopatogenia de la EP y para utilizarlo en estudios de fármacos con potencial actividad neuroprotectora [122].

2.4.2.2. Modelos genéticos en relación con genes implicados en la EP familiar

El descubrimiento de que algunos casos de EP familiar estaban relacionados con mutaciones en determinados genes, ha dado lugar a desarrollar animales modificados genéticamente en los que se ha silenciado o inducido la expresión de uno o varios de los genes involucrados. Estos modelos permiten, no sólo estudiar el papel etiopatogénico de los genes implicados en la EP, sino también valorar la efectividad de potenciales tratamientos [123].

2.4.2.2.1. Gen SNCA

El gen de la α -sinucleína fue el primer gen relacionado con la EP familiar [81] y hasta el momento actual se han descrito tres mutaciones puntuales (A53T, A30P y E46K) [81,82]. Con posterioridad, se estableció en algunas familias la existencia de duplicación o triplicación del gen *SNCA* como responsable del desarrollo de la enfermedad (siendo designado, inicialmente, como PARK4) [83,124]. Este hecho indica que el aumento de los niveles de α -sinucleína puede ser responsable del desarrollo de EP. La α -sinucleína es una proteína con una expresión muy abundante en el SNC. Su función no es completamente conocida, pero parece estar implicada en el reciclado de las vesículas sinápticas y en el almacenamiento y

regulación de neurotransmisores [32]. Los ratones *knock-out* para α -sinucleína son fértiles, viables y presentan una arquitectura cerebral normal. La vía nigroestriada está intacta pero los mecanismos de liberación y recaptación de dopamina están alterados, de tal forma que la dopamina se libera más rápidamente y desaparece antes del espacio sináptico. Todos estos hallazgos sustentan la localización presináptica de la α -sinucleína y su posible función en la homeostasis de la dopamina extracelular [125].

En la última década muchos estudios han intentado establecer una relación entre la α -sinucleína, los CL, la degeneración de las neuronas dopaminérgicas y la EP. La primera demostración experimental de que la α -sinucleína podía estar relacionada con el proceso de neurodegeneración dopaminérgica se obtuvo en la *Drosophila melanogaster*. Se crearon distintas líneas de mosca del vinagre que sobreexpresaban α -sinucleína humana salvaje o mutada. En estos insectos se observó una degeneración de neuronas dopaminérgicas de la SN al cabo de varios días del nacimiento con inclusiones citoplasmáticas filamentosas que se asemejaban a los CL. Además, las moscas presentaban trastornos motores (dificultad para trepar) que mejoraban con la levodopa [126].

Masliah y colaboradores crearon un ratón transgénico que expresa la α -sinucleína humana salvaje y encontraron que en los animales había un acúmulo progresivo de α -sinucleína e inclusiones de ubiquitina en neuronas del neocórtex, el hipocampo, el bulbo olfatorio y la SN. Además, en ratones de 12 meses de edad se observaban inclusiones densas al microscopio electrónico e inmunorreactivas para α -sinucleína, similares a los CL. En este modelo murino, el número de neuronas dopaminérgicas no está disminuido, pero el número de terminales dopaminérgicas estriatales, la expresión de TH y los niveles de dopamina en el estriado son menores que en los animales control. Por último, aunque estos ratones no presentan alteraciones motoras relevantes presentaban una latencia menor a la caída que los controles cuando se les coloca en el rotador [127].

Posteriormente se han desarrollado numerosas líneas de ratones transgénicos que expresan α -sinucleína humana mutada. Las manifestaciones clínicas y neuropatológicas de estos ratones dependen principalmente del promotor utilizado. Por ejemplo, los ratones que expresan la α -sinucleína mutada A53T bajo el control del promotor murino priónico desarrollan una enfermedad de motoneurona, sin que exista degeneración de la SN. La utilización de otros promotores da lugar a animales que presentan hallazgos neuropatológicos que se parecen más a los de la EP, pero no suelen mostrar alteraciones motoras importantes. En general, podemos establecer que ninguno de los ratones transgénicos para la α -sinucleína, desarrollados hasta el momento actual, constituye un buen modelo de la EP. Sin embargo, pueden considerarse útiles para estudiar el efecto neurotóxico de la α -sinucleína y profundizar en los mecanismos patogénicos relacionados con el desarrollo de la EP [117].

2.4.2.2.2. Gen *Parkin*

Las primeras mutaciones en el gen *Parkin* se describieron en familias japonesas con un parkinsonismo juvenil con herencia autosómica recesiva [77]. Los estudios posteriores mostraron que la mutación de este gen es la causa más frecuente de parkinsonismo de inicio temprano [128]. La proteína parkina es una ubiquitina-ligasa E3 implicada en el proceso de degradación de las proteínas por el proteasoma. La mayoría de las mutaciones producen una pérdida de la función ligasa afectando a la ubiquitinación y degradación de las proteínas, y probablemente, este hecho sería responsable de disfunción y muerte celular [129].

Una manera de estudiar cómo la parkina contribuye al desarrollo y normal funcionamiento de las neuronas dopaminérgicas es desarrollando animales en los que se modifica la expresión de esta proteína. Se han creado ratones en los que se ha silenciado el gen *Parkin*. Estos animales presentan un número normal de neuronas dopaminérgicas al nacimiento que no disminuye con la edad. Además, presentan un aumento de la concentración de dopamina en el estriado, la excitabilidad de las neuronas espinosas de mediano tamaño está reducida y tienen alteraciones motoras indicativas de déficit dopaminérgico [130]. En estos ratones se ha demostrado que existe una disfunción mitocondrial y una mayor sensibilidad al

estrés oxidativo [131]. Por lo tanto, a pesar de que este modelo animal no desarrolla la mayoría de las alteraciones características de la EP, ha servido para entender mejor la interacción entre parkina, función mitocondrial y estrés oxidativo.

Recientemente, se ha desarrollado un ratón transgénico que expresa una proteína parkina mutada Q311X. Los animales presentan una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la vida adulta que afecta fundamentalmente a la SNpc y se expresa clínicamente en forma de disfunción motora. Así mismo, hay evidencia de patología tipo α -sinucleína, pero diferente de la que existe en la EP idiopática [132]. Todos los datos experimentales sugieren que la parkina podría tener un efecto neuroprotector, confiriendo a las neuronas dopaminérgicas una mayor resistencia a la neurodegeneración. De hecho, la sobreexpresión de parkina en modelos murinos aumenta la resistencia a la degeneración dopaminérgica inducida tanto por la sobreexpresión de α -sinucleína como por la exposición a neurotoxinas [133,134].

2.4.2.2.3. Gen *DJ-1*

El gen *DJ-1* se localiza en el *locus* PARK7, y sus mutaciones son responsables de un parkinsonismo familiar de inicio temprano y herencia autosómica recesiva. La función de la proteína codificada por este gen parece estar implicada en la resistencia celular al estrés oxidativo [135,136]. Los ratones *knock-out* para *DJ-1* no muestran una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas pero presentan alteraciones motoras compatibles con una disfunción de los mecanismos de regulación de la dopamina estriatal similares a los de los ratones *knock-out* para *Parkin* [137,138]. Este modelo animal puede ser útil para estudiar la función de *DJ-1* en el estrés oxidativo que ha sido implicado como factor etiopatogénico en casos esporádicos de EP [126].

2.4.2.2.4. Gen *PINK1*

Las mutaciones del gen *PINK1* son la segunda causa más frecuente de EP autosómica recesiva de comienzo temprano [4,139]. El producto del *PINK1* es una proteína quinasa presente en la mitocondria que se expresa ampliamente en todo el cerebro. La proteína *PINK1* tiene un efecto neuroprotector y la pérdida de su función podría determinar la muerte neuronal al producir una disfunción mitocondrial y

aumentar la sensibilidad al estrés oxidativo [32,140]. El ratón *knock-out* para *PINK1* muestra un número normal de neuronas dopaminérgicas en la SN y unos niveles de dopamina estriatal dentro de la normalidad. Sin embargo, existe una alteración en los procesos de liberación de dopamina inducidos por anfetamina [141]. Además, estos animales presentan con la edad una disfunción mitocondrial progresiva y un aumento de la sensibilidad al estrés oxidativo [142,143].

2.4.2.2.5. Gen *LRRK2*

La mutación del gen *LRRK2* que codifica la proteína dardarina esta relacionada con una EP familiar de inicio tardío y herencia autosómica dominante. Actualmente supone la causa genética más frecuente de EP tanto familiar como esporádica. El estudio histopatológico de los pacientes con esta mutación muestran hallazgos heterogéneos, que incluyen degeneración de las neuronas dopaminérgicas con la presencia o en ausencia de CL, lesiones tau positivas o placas de amiloide [4,144,145]. La dardarina es una proteína quinasa cuya función no es muy bien conocida, pero parece estar implicada en los procesos de regulación del citoesqueleto [32].

En la actualidad se dispone de un modelo transgénico de ratón que expresa la proteína dardarina mutada R1441G. Este ratón desarrolla en la edad adulta un trastorno motor progresivo que responde a la administración de levodopa. El estudio histológico del cerebro muestra patología axonal y tau hiperfosforilada, pero el número de neuronas dopaminérgicas en la SN es normal con respecto a los controles [146].

2.4.2.2.6. Gen *UCH-L1*

En 1998 se identificó una mutación del gen *UCH-L1* en una familia alemana con varios miembros afectados de EP con un patrón de herencia autosómico dominante [73]. No obstante, su papel causal en la EP ha sido cuestionado por su escasa frecuencia. La proteína codificada por el gen *UCH-L1* se expresa en gran cantidad en el cerebro y está implicada en la vía de degradación de proteínas mediada por ubiquitina [32]. Recientemente, se ha creado un ratón transgénico con la mutación I93M del gen humano *UCH-L1*, descrita inicialmente. Los animales

mostraron una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas e inclusiones citoplasmáticas de proteína UCH-L1 y ubiquitina. Así mismo, presentan un ligero empeoramiento de los movimientos espontáneos y voluntarios [147].

2.4.2.2.7. Ratones MitoPark

Existen evidencias indirectas que relacionan el desarrollo de la EP esporádica con una disfunción mitocondrial. Además, el estudio de pacientes con EP familiar indica que la función de los genes implicados en el desarrollo de la EP tienen relación con la actividad mitocondrial. Con la finalidad de probar de forma experimental si la disfunción de la cadena respiratoria de la mitocondria puede ser un defecto primario que dé lugar a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas y a la formación de CL, o si, por el contrario el defecto mitocondrial es secundario a la degeneración celular dopaminérgica, se ha creado un ratón transgénico condicional para el factor de transcripción mitocondrial A de las neuronas dopaminérgicas. Cuando éstos se cruzan con ratones transgénicos DAT-Cre, se obtienen unos ratones *knock-out* que se denominan MitoPark. Estos animales presentan una disminución del ADN mitocondrial y una deficiencia en la respiración mitocondrial de las neuronas dopaminérgicas de la SN. Los ratones MitoPark presentan muchas de las características que deben reunir los modelos animales de EP como son el comienzo adulto de la sintomatología motora, la presencia de inclusiones intraneuronales que podrían ser el primer paso en el desarrollo de los CL, la degeneración preferente de las neuronas dopaminérgicas de la SN y una menor afectación del área tegmental ventral, y la respuesta de los síntomas motores a la levodopa [148].

Tabla 3. Características de los modelos animales genéticos de la enfermedad de Parkinson

MODELO GENÉTICO	DÉFICIT MOTORES	DEGENERACIÓN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS	PATOLOGÍA α-SINUCLÉINA
Pitx 3 -/-	Si (reversible con levodopa)	Si (tras el nacimiento y no selectivo de SN)	No
Engrailed -/-	Si	Si (selectivo y progresivo)	No
Nurr +/-	Si	Si	No
α-sinucleína			
α -sin promotor PDGF- β	Si	No	Si
α -sin mutada A53T con PPrM	Si (letal)	No	Si
α -sin mutada A30P con PPrM	Si (progresivo)	No	Atípico
Sobreexpresión α -sin	Si	Si	Si
Parkin			
Knock-out	Leves	No	No
Parkin mutada Q311X	Si (progresivo)	Si (selectiva y progresiva)	Atípico
DJ-1 knock-out	Si	No	No
PINK-1 knock-out	Si	No	No
LRRK mutada R1441G	Si (respuesta a levodopa)	No	No (patología axonal y tau hiperfosforilada)
Parkin/DJ-1/PINK-1 knock-out	No	No	No
UCH-L1 mutada I93M	Leves	Si	Atípica
Ratones MitoPark	Si (progresivo)	Si (progresiva y selectiva)	Atípica

PPrM: promotor priónico murino; α -sin: α -sinucleína; SN: sustancia negra.

2.4.2.2.8. Otros modelos genéticos

No es infrecuente encontrar familias con EP en las que coexisten varias de las mutaciones genéticas más frecuentes, por lo que sería interesante desarrollar modelos que permitieran examinar las interacciones entre los genes *Parkin*, *DJ-1* y *PINK1* [149]. De hecho, estos tres genes parecen jugar un papel crucial en la función de la mitocondria y la protección frente al estrés oxidativo. Recientemente, se ha desarrollado un ratón knock-out para los tres genes en el que no se ha objetivado una pérdida de neuronas dopaminérgicas. No obstante, a los 24 meses de edad los animales muestran un aumento de los niveles de dopamina en el estriado en probable relación con una alteración en los mecanismos de homeostasis de este neurotransmisor [150].

2.4.2.3. Modelos genéticos basados en la expresión de genes utilizando vectores virales

La ausencia de pérdida de neuronas dopaminérgicas en la mayoría de los modelos secundarios a la alteración de los genes implicados en la EP familiar puede deberse a numerosos factores, como por ejemplo, al desarrollo de mecanismos compensatorios efectivos. Para superar este inconveniente se han desarrollado modelos basados en la sobreexpresión de proteínas mediante la inyección de vectores virales recombinantes en la SN de los animales de experimentación [117,151]. Actualmente, esta técnica no sólo se está utilizando para crear modelos animales de EP, sino también con fines terapéuticos, ya sea para aumentar la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo de la dopamina, con un objetivo neuroprotector o para modular la actividad de los ganglios basales [152].

En ratas se ha conseguido expresar α -sinucleína humana mutada o no mutada en las neuronas dopaminérgicas de la SN utilizando vectores virales adeno-asociados o lentivirus. Estos animales desarrollan una progresiva pérdida de las neuronas dopaminérgicas, inclusiones positivas para α -sinucleína y neuritas distróficas. Asimismo, presentan trastornos motores cuando la pérdida de neuronas dopaminérgicas alcanza un 50-60% del total [153,154]. Esta misma técnica, utilizando vectores virales adeno-asociados, se ha realizado en el macaco, obteniendo resultados similares a los descritos en la rata [155]. En estos animales se

comprueba que las inclusiones intraneuronales contienen ubiquitina, además de α -sinucleína [156]. Por lo tanto, este modelo experimental tiene como grandes ventajas que es un modelo crónico y progresivo, y que los hallazgos neuropatológicos son similares a los de la EP idiopática. No obstante, el trastorno motor objetivado en los animales no recuerda al cuadro clínico típico de los pacientes.

3. Alteraciones neuropatológicas

El hallazgo neuropatológico más importante de la EP es la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la *pars compacta* de la SN, especialmente en su parte ventrolateral. Este patrón de degeneración es relativamente específico de la EP y es diferente al que se observa en el proceso de envejecimiento normal [157]. La pérdida celular dopaminérgica produce como consecuencia una deplección del contenido de dopamina en el estriado de mayor intensidad en el putamen que en el caudado [158,159]. Además en el putamen de los sujetos con EP la pérdida de dopamina tiene un gradiente rostrocaudal, patrón que no se observa en otras entidades que cursan con una degeneración dopaminérgica. Se estima que es necesaria una pérdida del 60-70% de las neuronas de la región ventrolateral de la SNpc y una pérdida de dopamina estriatal del 70-80% para que aparezcan los síntomas clínicos motores característicos de esta enfermedad [157]. Pérdidas neuronales inferiores cursan de forma totalmente asintomática, lo que implica la puesta en marcha de mecanismos de compensación en las etapas iniciales de la enfermedad.

Además de la pérdida celular dopaminérgica, existen inclusiones intraneuronales formadas principalmente por depósitos de α -sinucleína, que se denomina patología tipo Lewy [160]. Estas inclusiones pueden encontrarse en el cuerpo celular de las neuronas, como es el caso de los cuerpos de Lewy (CL) y los cuerpos pálidos, o en las dendritas y axones neuronales, como sucede con las neuritas de Lewy. Hay dos tipos diferentes de CL, el clásico y el cortical. El CL clásico es una estructura esférica de 8-30 μm con una zona central constituida por un material denso amorfo y una zona periférica pálida, compuesta por filamentos dispuestos radialmente. Los CL corticales tienen una apariencia menos compacta

que los anteriores y se encuentran, principalmente en las neuronas piramidales de las capas V y VI de la corteza temporal, parietal, frontal, insular, cingular y entorrinal. Los cuerpos pálidos son estructuras eosinofílicas predecesoras de los CL [13,161]. La patología tipo Lewy se encuentra frecuentemente en la SN, aunque puede observarse en otras localizaciones del SNC como en la médula espinal, bulbo, protuberancia, mesencéfalo, diencéfalo, amígdala, bulbo olfatorio, prosencéfalo basal, córtex límbico y áreas de asociación cortical. Se han detectado también CL en el SNP como en las neuronas de los plexos entéricos del tracto gastrointestinal, los ganglios simpáticos paravertebrales y las fibras nerviosas simpáticas de la glándula suprarrenal y el corazón, así como en los nervios cutáneos [162-166].

Por otra parte, aunque el hallazgo neuropatológico más importante de la EP es la degeneración de la SN, también se produce neurodegeneración de otras estructuras del SNC, como es el caso del *locus ceruleus*, el núcleo dorsal del vago, el núcleo basal de Meynert y el núcleo dorsal del rafe [159]. Como consecuencia, no sólo se produce una alteración del sistema dopaminérgico, sino también de los sistemas noradrenérgico, colinérgico y serotoninérgico [167,168]. La alteración de estos sistemas de neurotransmisión se ha relacionado con la aparición de síntomas motores, como el temblor, y fundamentalmente, con los síntomas no motores de la EP [16].

Recientemente, se ha descrito la reducción de la arborización dendrítica y la pérdida de aproximadamente un 30% de las espinas dendríticas de las neuronas medianas espinosas estriatales en los cerebros de pacientes con EP [169]. Sin embargo, todavía no se conoce el significado funcional de este hallazgo.

4. Alteraciones de la neurofisiología de los ganglios basales

Los ganglios basales comprenden un grupo de núcleos subcorticales relacionados directamente con el inicio y control de los movimientos voluntarios. En general, su función consiste en procesar y modular la información proveniente de la corteza motora para la adecuada realización de los movimientos voluntarios. Además del circuito motor, existen otros tres circuitos paralelos, el visuomotor,

asociativo y límbico que están implicados, respectivamente, en el control de los movimientos oculares y la ejecución de distintas tareas cognitivas y afectivas [170-172].

Los ganglios basales están formados por: el núcleo estriado (compuesto por los núcleos caudado y putamen), el globo pálido con sus porciones interna (Gpi) y externa (Gpe), la sustancia negra *pars compacta* (SNpc) y *pars reticulata* (SNpr), el núcleo subtalámico (NST) y los núcleos talámicos ventral anterior (VA) y ventral lateral (VL). El estriado es la principal estructura aferente de los ganglios basales y recibe proyecciones excitadoras glutamatérgicas de prácticamente todas las áreas corticales y proyecciones dopaminérgicas desde la SNpc. Las áreas corticales sensitivo-motoras proyectan preferentemente al putamen, mientras que el resto de las áreas corticales envían sus proyecciones hacia el núcleo caudado. El estriado contiene dos poblaciones de neuronas de proyección o neuronas espinosas medianas. Un grupo de ellas expresa los neurotransmisores ácido γ -aminobutírico (GABA), sustancia P y dinorfina, contienen receptores dopaminérgicos tipo D₁ y envían sus proyecciones hacia el Gpi y la SNpr. El otro grupo de neuronas estriatales expresan GABA y encefalina, contienen predominantemente receptores dopaminérgicos tipo D₂ y proyectan al Gpe. El Gpi y la SNpr constituyen los núcleos efectores por excelencia de los ganglios basales y envían sus proyecciones hacia los núcleos talámicos ventral anterior (VA) y ventral lateral (VL), mientras que las del Gpe envían proyecciones inhibitorias GABA al NST, el cual a su vez proyecta de nuevo al Gpi mediante proyecciones excitadoras glutamatérgicas. De esta forma, se delimitan dos circuitos estriopalidales, directo e indirecto que parecen estar mediados por la activación selectiva de receptores dopaminérgicos D₁ o D₂ [173,174]. El circuito estriopalidal directo (corteza – estriado – Gpi/SNpr - núcleos talámicos VA/VL - corteza) es fundamentalmente un circuito activador, mientras que el circuito estriopalidal indirecto (corteza – estriado – Gpe – NST - Gpi/SNpr - núcleos talámicos VA/VL - corteza) es un circuito inhibitorio. La SNpc mediante la dopamina, modula la actividad del estriado, inhibiendo las neuronas GABA/encefalina que proyectan al Gpe (circuito estriopalidal indirecto) y estimulando las neuronas GABA/sustancia P/dinorfina que proyectan al Gpi y SNpr (circuito estriopalidal directo). Para que un movimiento voluntario se realice de forma

adecuada es necesario que exista un perfecto equilibrio entre ambos circuitos, directo e indirecto (Figura 1).

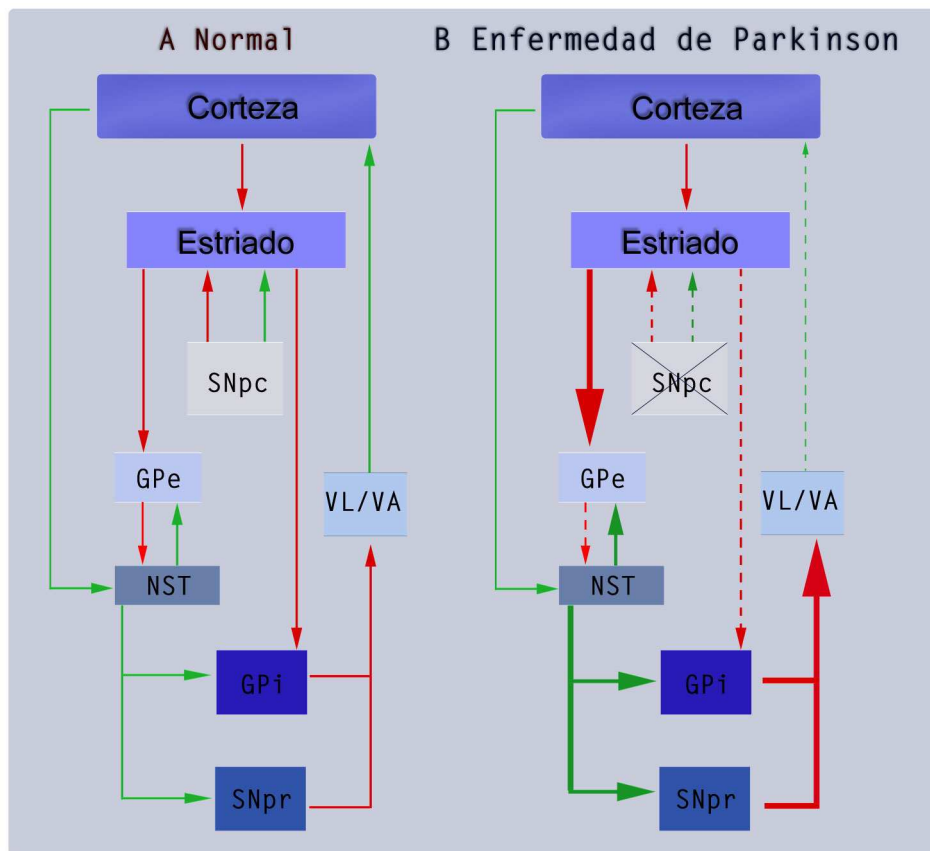


Figura 1. Representación esquemática del modelo clásico del funcionamiento de los ganglios basales en el estado normal (A) y en la enfermedad de Parkinson (B). (Modificado de Obeso y col. [177]). Las flechas en verde corresponden a las proyecciones excitadoras y las rojas, a las inhibitoras. El aumento del grosor de las líneas indica un aumento de la función, mientras que una línea discontinua, se traduce como una disminución de la función. En situación de parkinsonismo, existe una hiperactividad de la vía NST-Gpi por una falta de inhibición del Gpe, que induce una excesiva inhibición de las proyecciones tálamo-corticales. GPe: globo pálido externo; GPi: globo pálido interno; NST: núcleo subtalámico; SNpc: sustancia negra *pars compacta*; SNpr: sustancia negra *pars reticulata*; VA: núcleo ventral anterior del tálamo; VL: núcleo ventrolateral del tálamo.

Según este modelo clásico de funcionamiento de los ganglios basales, el déficit de dopamina que existe en la EP originaría un aumento de la actividad de las neuronas del Gpi y de la SNpr, al estar reducida la inhibición que las neuronas estriatales GABA/sustancia P ejercen sobre ellos. Paralelamente el déficit de dopamina conlleva una excesiva inhibición de las neuronas del Gpe como consecuencia de una hiperactividad de las neuronas estriatales GABA/encefalina. La inhibición del Gpe produce una hiperactividad del NST y, en consecuencia, una

hiperfunción de las neuronas del Gpi/SNpr. Por tanto, el efecto último de la denervación dopaminérgica es una hiperfunción de las neuronas del Gpi y de la SNpr que condiciona una inhibición de las neuronas tálamo-corticales, y como consecuencia una menor activación cortical (Figura 1) [175-177].

El modelo clásico de funcionamiento de los ganglios basales desarrollado en los años 80 ha servido para explicar gran parte de la organización de estas estructuras cerebrales. De hecho, el aumento de la actividad neuronal del NST y el Gpi/SNpr en la EP es una característica fisiopatológica de gran importancia en este modelo, que se sostiene tanto por estudios experimentales con monos tratados con la MPTP, como por estudios clínicos en los que la lesión o estimulación del NST o del Gpi restaura la actividad tálamo-cortical y mejora los síntomas parkinsonianos [178]. Sin embargo, existen numerosas inconsistencias en el modelo propuesto [179]. Por ejemplo, el hecho de que una lesión del tálamo no empeore la acinesia o que la lesión del Gpi no da lugar a la aparición de discinesias. Así mismo, el estado parkinsoniano no se puede explicar únicamente por los cambios en la intensidad de descarga neuronal, sino que los cambios más importantes que se relacionan con la aparición del parkinsonismo ocurren en el patrón y sincronía de la descarga neuronal. Por otro lado, existen numerosas evidencias que indican que las vías estriopalidales directa e indirecta no están tan estrictamente separadas como establece el modelo clásico. Se ha objetivado que las mismas proyecciones estriatales establecen conexiones con neuronas del Gpi, Gpe y SNpr y también que una gran proporción de las neuronas espinosas de mediano tamaño co-expresan receptores D₁ y D₂ [180-182].

5. Alteraciones neuroquímicas

El interés por el estudio de la neuroquímica de la EP comenzó siglo y medio después de la descripción de esta entidad por James Parkinson. Fue en 1960 cuando Ehringer y Hornykiewicz demostraron la disminución de dopamina en la SN y el estriado de los cerebros de pacientes con EP. Este hecho tuvo como consecuencia el inicio del tratamiento de los síntomas motores con levodopa, como forma de restaurar la transmisión dopaminérgica [168]. Sin embargo, en el momento

actual, el estudio bioquímico de los cerebros de pacientes con EP presenta numerosos problemas. Además de la importancia de una correcta conservación y procesamiento del tejido cerebral, el tratamiento farmacológico que reciben los pacientes puede suponer un artefacto a la hora de realizar los diferentes estudios [183]. Este inconveniente se ha superado de forma relativa con la utilización de modelos animales de la EP y con la valoración *in vivo* de determinados marcadores bioquímicos mediante técnicas de neuroimagen funcional.

5.1. La transmisión dopaminérgica

La dopamina es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante del SNC de los mamíferos. Se sintetiza a partir del aminoácido L-tirosina, que es transformado en levodopa por la acción de la enzima tirosina hidroxilasa (TH). Posteriormente, la aminoácido aromático decarboxilasa (AAAD) convierte la levodopa en dopamina, que a su vez, es almacenada en las vesículas sinápticas por la acción del transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2). La liberación del contenido de las vesículas al espacio sináptico se produce como consecuencia de la despolarización de la neurona presináptica y es dependiente de calcio. De este modo, la dopamina se une a los receptores dopaminérgicos postsinápticos, que están acoplados a proteínas G, y son divididos clásicamente en dos familias: los D₁ y los D₂. En la terminal presináptica se encuentra el transportador de dopamina (DAT) que se encarga de la recaptación de este neurotransmisor para ser nuevamente utilizado. Esta proteína es muy importante en el mantenimiento de la homeostasis dopaminérgica. La dopamina presente en el espacio sináptico también puede ser degradada por la acción de las enzimas catecol O-metiltransferasa (COMT) y MAO-B, dando lugar al ácido homovanílico [184].

5.2. Cambios bioquímicos en la EP

En el cerebro de los pacientes con EP se produce una disminución de los niveles de dopamina estriatal como consecuencia de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, pero también se afectan otros sistemas de neurotransmisión como el noradrenérgico, serotoninérgico y colinérgico [168,183]. Los pacientes con EP comienzan a presentar los síntomas motores característicos de esta entidad cuando los niveles de dopamina en el putamen se reducen por

encima del 70% [157]. Como consecuencia, disminuyen los niveles de su metabolito, el ácido homovanílico [167]. Así mismo, otros marcadores de las terminales dopaminérgicas presinápticas también disminuyen. En este sentido, se ha descrito la disminución de la cantidad y la actividad de la proteína TH, de la actividad de la AAAD y de la cantidad de DAT en los cerebros de pacientes con EP [183,185]. También en monos intoxicados con la MPTP se ha objetivado la disminución de los marcadores dopaminérgicos presinápticos [186-188], aunque la reducción no es similar en todos ellos. La proteína TH es la que más se reduce, seguida del VMAT2, del DAT, y por último, la AAAD [189].

6. Progresión de la enfermedad de Parkinson

La investigación actual de fármacos para la EP está orientada a conseguir productos que prevengan o retrasen la progresión de la enfermedad, interfiriendo en los mecanismos patogénicos de la misma. Para poder determinar si un fármaco tiene este efecto sobre la evolución de la EP es necesario contar con instrumentos fiables que permitan valorar el inicio y la progresión de esta entidad. En este apartado se explicarán los procesos neuropatológicos y neuroquímicos asociados a la progresión de la EP, así como los potenciales biomarcadores de progresión, con especial énfasis en las técnicas de neuroimagen funcional, y, por último, el posible efecto de la levodopa sobre la progresión de la EP.

6.1. Progresión neuropatológica: los estadios de Braak

Como ya se ha comentado anteriormente, la EP se caracteriza, entre otros hallazgos neuropatológicos, por la presencia de agregados intracitoplasmáticos de α -sinucleína o patología tipo Lewy en múltiples regiones del sistema nervioso. Braak y colaboradores, atendiendo a la distribución de las inclusiones de α -sinucleína, establecieron de forma arbitraria seis estadios o grados de afectación. Los estadios 1 y 2 se caracterizan por la presencia de CL en los núcleos mesopontinos y el bulbo olfatorio. Estas alteraciones se corresponderían con la fase previa a la aparición de los síntomas motores característicos de la EP y explicaría síntomas no motores como el trastorno de la conducta durante la fase REM del sueño y la hiposmia. El estadio 3 correspondería a la afectación de las neuronas dopaminérgicas de la SN y

se correlacionaría con la aparición de los síntomas motores. Los siguientes estadios implican la presencia de CL corticales, en un primer momento, restringido al mesocórtex temporal, y posteriormente con extensión dentro del neocórtex [190].

Ante estos hallazgos, los autores propusieron una hipótesis en la que establecían un patrón de degeneración ascendente en la EP idiopática que se inicia en el núcleo motor dorsal del vago en el bulbo y, en las fases más tardías, llega hasta el neocórtex [161,190]. Debido a que las regiones afectadas en la EP están estrechamente interconectadas, estos autores sugieren que este patrón de degeneración ascendente sería consecuencia de la propagación de un patógeno, por el momento no determinado, mediante transporte axonal retrógrado desde el nervio olfatorio, el sistema nervioso periférico o el entérico [191]. Algunos investigadores han propuesto como posible patógeno a agentes infecciosos con características similares a los priones, apoyándose en la similitud entre las enfermedades priónicas y otras enfermedades neurodegenerativas, que como la EP, cursan con el acúmulo patológico de proteínas dentro de las neuronas [192]. De hecho, se ha sugerido que la propia α -sinucleína en su forma no plegada podría comportarse como una proteína priónica e inducir el cambio conformacional de la α -sinucleína nativa y su agregación [193]. Esta hipótesis ha cobrado gran interés tras descubrir la presencia de CL en las neuronas dopaminérgicas de origen fetal implantadas en el estriado de pacientes con EP, lo que sugiere una propagación de la enfermedad desde las neuronas del huésped a las del donante [194,195].

Sin embargo, y a pesar de la relevancia del sistema de clasificación de la EP descrito por Braak y colaboradores, hay estudios recientes que muestran que no todos los pacientes siguen este patrón de progresión de la patología de tipo Lewy [196].

6.2. Progresión neuroquímica y mecanismos de compensación

Para objetivar los síntomas motores en la EP es necesaria una pérdida de al menos el 70% de la dopamina en el putamen [157]. Esto indica que en la fase presintomática existen mecanismos de compensación destinados a retrasar la aparición de los signos que caracterizan esta entidad [186,197,198]. Algunos autores

como Zigmond y colaboradores sostienen que estos mecanismos de compensación son fundamentalmente dopaminérgicos, es decir, destinados a mantener constantes los niveles de dopamina sináptica. De hecho, en el cerebro de los pacientes con EP la reducción del ácido homovanílico, un metabolito de la dopamina, es menor de lo esperado para la disminución que existe de la dopamina estriatal. Esto indicaría que existe un aumento en el recambio de dopamina, mediado por un incremento en la síntesis de dopamina y su liberación como respuesta al potencial de acción [167,197]. Este aumento de la síntesis de dopamina se supone que es consecuencia del aumento de la actividad molecular de las enzimas TH y AAAD. Esta hipótesis se apoya en algunos estudios histológicos que muestran que la actividad molecular de la TH está aumentada en los cerebros de pacientes con EP aunque su cantidad total se encuentra disminuida [183]. Por otro lado, diversos estudios de PET con ¹⁸F-fluorodopa han demostrado que en las fases iniciales de la EP, la actividad de la AAAD aumenta en las terminales dopaminérgicas residuales [199,200]. Además del aumento de la síntesis y liberación de dopamina, también se produce una regulación a la baja del DAT en un intento de mantener una concentración óptima de dopamina en la terminal sináptica [200-202]. Cuando estos mecanismos de compensación presinápticos no son suficientes, se produce un aumento de los receptores dopaminérgicos D₂ en la terminal postsináptica, que tiene como finalidad mantener una adecuada transmisión dopaminérgica [186,203].

Otro posible mecanismo de compensación, relacionado con la disminución de la dopamina estriatal, es el aumento de neuronas dopaminérgicas estriatales que se ha observado en modelos animales y en pacientes con EP [204,205]. En ambos casos el incremento en el número de neuronas dopaminérgicas puede llegar a ser de un 300% y, curiosamente, aparecen en el estriado anterior (concretamente, en el borde lateral del núcleo caudado y el putamen precomisural) [206,207]. Además de la denervación dopaminérgica existen otros factores que modulan el número y fenotipo de estas neuronas dopaminérgicas estriatales [204]. Entre ellos, destaca el efecto de los factores neurotróficos que aumentan el número de estas neuronas [208-210], mientras que la levodopa lo reduce hasta valores basales [211]. La funcionalidad de estas neuronas no se conoce, pero el hecho de que contengan la maquinaria necesaria para sintetizar y liberar dopamina hace suponer que podrían

restablecer una función dopaminérgica deficitaria [206,207,211]. Otro posible mecanismo de compensación estructural podría ser el proceso de gemación o *sprouting* de las fibras dopaminérgicas no afectadas para aumentar el número de terminales presinápticas, sugerido en algunos modelos animales [212-214]. Sin embargo, la EP es un proceso degenerativo en el que la capacidad de regeneración de las neuronas supervivientes puede estar disminuida.

Por otra parte, los resultados aportados por un estudio de Bezard y colaboradores en un modelo subagudo de parkinsonismo por MPTP en primates no humanos sugieren que los cambios compensatorios dopaminérgicos se instauran de forma tardía, cuando los síntomas clínicos son evidentes [186]. De tal forma, que estos autores han propuesto la existencia de otros mecanismos compensatorios no dopaminérgicos destinados a reducir la actividad de la vía estriopallidal indirecta responsable del desarrollo de los síntomas parkinsonianos [198,215]. Esta reducción de la actividad de la vía indirecta se podría producir tanto, por una disminución de la actividad de las aferencias corticales hacia el estriado [169], como por cambios en el propio estriado que disminuyan la inhibición hacia el Gpe. Este último mecanismo podría estar mediado por la regulación al alza de los receptores D₂ [186] y por el aumento de la expresión de las encefalinas en el estriado [216] que, a su vez, reduciría la liberación de GABA [217].

Por último, antes de la aparición de los síntomas parkinsonianos es evidente un aumento de la actividad electrofisiológica del Gpi y del NST, que podría ser interpretado como un mecanismo compensatorio dentro del propio sistema de los ganglios basales [218,219]. Algunos autores consideran que es posible que el déficit dopaminérgico inicial conlleve un efecto directo sobre el NST y/o el Gpi, que permita mantener dentro de la normalidad la fisiología de los circuitos eferentes de los ganglios basales, hasta que la pérdida de dopamina estriatal provoque una alteración que desvíe el sistema por completo hacia el estado parkinsoniano [220,221].

6.3. Marcadores de progresión

Se define como marcador de progresión de una enfermedad a un hallazgo característico de ésta que cambia en frecuencia o intensidad con su evolución en el tiempo, siendo un indicador del proceso patogénico subyacente. Los posibles marcadores de progresión de la EP estudiados hasta el momento son clínicos – evaluados mediante distintas escalas –, bioquímicos y de neuroimagen [222].

Para la valoración de la función motora de los pacientes con EP se utilizan diversas escalas clínicas. Las más frecuentes en los estudios clínicos son la escala de Hoehn y Yahr y la escala unificada de evaluación de la EP (UPDRS). Los primeros estudios realizados para valorar la evolución clínica de los pacientes con EP, antes de utilizarse la levodopa, sugieren una rápida progresión de la discapacidad motora, llegándose al estado de encamamiento en 10-14 años [223,224]. En esta línea, la valoración de los pacientes en el brazo placebo de algunos ensayos con fármacos sugieren una rápida progresión de los síntomas motores durante los primeros 5 años en sujetos no tratados, con un aumento en la UPDRS de 7,8-14 puntos/año y de 5,2-8,9 puntos/año en la parte motora de la UPDRS. Según estos datos se llegaría al estado de encamamiento en 10 años. Sin embargo, estudios más recientes en pacientes tratados objetivan una desaceleración de la progresión de los síntomas motores en estadios avanzados de la enfermedad, al igual que un incremento de la supervivencia de los pacientes [222]. Como conclusión, podemos afirmar que la valoración de la progresión de la EP basada en las escalas motoras no es posible debido a la efectividad del tratamiento sintomático y a que no contamos con suficientes datos sobre la historia natural de esta enfermedad de los estudios realizados antes de la era de la levodopa.

El deterioro de las funciones superiores es muy frecuente en la EP y hasta el 40% de los pacientes cumplen criterios clínicos de demencia. Sin embargo, el deterioro cognitivo no afecta de igual forma a todos los pacientes y la edad de inicio de la EP parece ser un factor de riesgo determinante en el desarrollo de la demencia, y no tanto la duración de la enfermedad [225]. Los estudios que han utilizado el test minimental para la valoración cognitiva de los pacientes con EP han

mostrado que es un instrumento útil para el diagnóstico y el seguimiento de los pacientes con EP asociada a demencia, pero no es capaz de valorar el deterioro cognitivo de pacientes con EP sin criterios de demencia [222].

Las escalas que evalúan las actividades de la vida diaria o aspectos de la calidad de vida de los pacientes también son útiles para valorar la progresión clínica de la EP. En ellas influyen, fundamentalmente, los síntomas propios de esta entidad y, por lo tanto, pueden verse modificadas por el efecto sintomático de la medicación antiparkinsoniana. Sin embargo, un estudio retrospectivo ha mostrado una asociación entre la parte de la UPDRS que valora distintos aspectos de las actividades de la vida diaria y la duración de la enfermedad independientemente del efecto de la medicación [226], aunque este hallazgo debe ser confirmado en estudios posteriores.

Por el momento, los estudios de neuroimagen estructural o los marcadores biológicos de neurodegeneración en el suero o el líquido cefalorraquídeo (tau total, tau fosforilada, β -amiloide o α -sinucleína oligomérica) no aportan datos relevantes sobre la progresión de la EP [222]. Los estudios de neuroimagen funcional, especialmente aquellos que valoran la función dopaminérgica presináptica y el metabolismo cerebral global, son prometedores, aunque habría que dilucidar el posible efecto inducido por los fármacos empleados para el tratamiento de la EP [227]. Por lo tanto, actualmente no disponemos de ningún marcador biológico fiable para valorar la progresión de esta enfermedad neurodegenerativa.

6.4. Las técnicas de neuroimagen funcional en la valoración de la progresión de la enfermedad

Los estudios de neuroimagen funcional con PET y tomografía computerizada por emisión de fotón único (SPECT), en función del trazador utilizado, permiten valorar distintas características del cerebro parkinsoniano como son la función cerebral global, el sistema dopaminérgico y otros sistemas de neurotransmisores. Fundamentalmente, durante las dos últimas décadas ha habido un gran interés por las técnicas que valoran el sistema dopaminérgico nigroestriado. Estas exploraciones pueden ser útiles en el diagnóstico diferencial de la EP, para el

diagnóstico del estadio premotor en determinadas poblaciones de riesgo [228] y como marcador de progresión de la EP [227,229].

6.4.1. Valoración de la función dopaminérgica presináptica

La valoración de la integridad de las proyecciones nigroestriatales presinápticas mediante PET o SPECT se realiza con la utilización de trazadores que se unen a tres enzimas: el DAT, que se encuentra en la membrana plasmática de la terminal dopaminérgica y se encarga de la recaptación de la dopamina de la hendidura sináptica; el VMAT2, que se localiza en la membrana vesicular y permite almacenar la dopamina en las vesículas sinápticas de la terminal dopaminérgica; y la enzima AAAD, que se encuentra dentro de la terminal sináptica y transforma la levodopa en dopamina [230].

6.4.1.1. Valoración de la actividad de la AAAD

El PET con ^{18}F -fluorodopa fue la primera técnica de neuroimagen funcional validada para establecer la integridad dopaminérgica presináptica. La ^{18}F -fluorodopa pasa la barrera hematoencefálica por la acción del sistema transportador de aminoácidos. Posteriormente, es transformada en ^{18}F -fluorodopamina por la acción de la AAAD y es almacenada en la terminal sináptica. Por último, la ^{18}F -fluorodopamina es metabolizada por la acción de las enzimas MAO y COMT [231]. La constante de captación de la ^{18}F -fluorodopa (k_i) en el estriado refleja la actividad enzimática de la AAAD y la densidad de terminales dopaminérgicas. Por lo tanto, en los pacientes con EP la captación de ^{18}F -fluorodopa va a estar influida por la pérdida de neuronas dopaminérgicas. De hecho, los estudios histopatológicos, tanto en pacientes con EP como en el modelo de mono intoxicado con la MPTP, confirman que la k_i obtenida durante las dos primeras horas tras la administración de esta sustancia se correlaciona linealmente con los niveles de dopamina estriatal y con el número de neuronas dopaminérgicas presentes [232,233]. Sin embargo, y especialmente en los estadios iniciales de la enfermedad, la k_i sobrestima el número de neuronas dopaminérgicas debido a un mecanismo de compensación por el que aumenta la actividad de la AAAD en las terminales dopaminérgicas restantes [199-201].

El patrón de imagen de la PET con ^{18}F -fluorodopa en los pacientes con EP idiopática se caracteriza por una captación asimétrica con una mayor reducción afectando al putamen contralateral al hemicuerpo donde predominan los síntomas motores [234]. Este patrón es distinto al de otros parkinsonismos atípicos como la PSP, la AMS o la DCB, donde hay una afectación nigroestriada menos selectiva del putamen posterior. Sin embargo, esta técnica no es adecuada para diferenciar la EP de estas entidades ni para diferenciar unas de otras, ya que puede existir un solapamiento en los hallazgos de neuroimagen [235]. El PET con ^{18}F -fluorodopa puede ser un instrumento válido para el diagnóstico diferencial con entidades que se parecen a la EP, pero que no presentan una degeneración nigroestriada como el temblor esencial o el parkinsonismo farmacológico [230]. Por otro lado, existe hasta un 10-15% de pacientes que cumplen los criterios clínicos para el diagnóstico de una EP en los que los estudios de neuroimagen que valoran la integridad nigroestriada son normales. Estos sujetos tienen una evolución muy benigna, no presentan alteraciones del olfato y no responden al tratamiento con levodopa. Se sugiere que algunos casos presentan, en realidad, temblor esencial o un temblor distónico [236,237].

Desde el punto de vista clínico, el grado de degeneración nigroestriatal valorada mediante PET con ^{18}F -fluorodopa se relaciona con la gravedad de los síntomas motores de la EP (con excepción del temblor de reposo), con la disfunción motora de los pacientes, con la duración de la enfermedad y con la presencia de complicaciones motoras [11,238,239]. Los estudios longitudinales en pacientes han permitido objetivar que la reducción de la ki estriatal se inicia en el putamen posterior y se extiende hacia el putamen anterior y el caudado. Sin embargo, el grado de progresión de la enfermedad es similar entre las distintas regiones del estriado. Se ha estimado el grado de pérdida anual de la ki putaminal entre un 6% y un 12% y en el caudado entre un 3% y un 6%, estableciéndose el inicio de la lesión nigroestriada de 3 a 7 años antes de la aparición de los síntomas motores [238,240-246]. Estudios recientes demuestran que este descenso en la ki es mayor durante los estadios iniciales de la enfermedad, presentando un patrón exponencial negativo, que se enlentece con el paso del tiempo [243,245,246]. Estos datos estarían en consonancia con los estudios histopatológicos que sugieren una pérdida del 45% de

las neuronas dopaminérgicas de la SN en la primera década de la evolución de la EP, que posteriormente, se lentifica hasta que la degeneración se aproxima al deterioro esperable por el efecto de la edad [157]. Esta capacidad de los estudios de neuroimagen para valorar y cuantificar la progresión de la degeneración nigroestriada en los pacientes con EP ha contribuido a considerarlos como marcadores biológicos del proceso de neurodegeneración. Si esto se confirmara, permitiría valorar la posible acción neuroprotectora de distintos fármacos [222].

6.4.1.2. Valoración del DAT

El DAT se encuentra en las dendritas y los axones de las neuronas dopaminérgicas, por lo que es un buen marcador de la integridad de las proyecciones nigroestriatales. Actualmente, existen numerosos trazadores que se unen a DAT, tanto para la PET como para la SPECT. A pesar de las diferentes características de los trazadores y la peor resolución del SPECT con respecto al PET, los resultados entre las técnicas son comparables.

En general, los estudios de neuroimagen con marcadores del DAT en la EP muestran hallazgos similares a los estudios de PET con ^{18}F -fluorodopa. Esta técnica tiene una sensibilidad del 90% para diferenciar un sujeto normal de otro con una EP muy incipiente. El patrón de neuroimagen es igual al mencionado para el PET con ^{18}F -fluorodopa y tienen la misma utilidad en el diagnóstico diferencial con el temblor esencial y el parkinsonismo farmacológico [247]. Los estudios longitudinales muestran una disminución de los niveles anuales de DAT del 8-13% en el putamen y del 4-10% en el caudado, con una mayor reducción en las fases iniciales de la EP y siguiendo una distribución exponencial [222]. No obstante, al contrario que en el caso del PET con ^{18}F -fluorodopa, la unión del trazador a DAT puede infravalorar el número de neuronas presentes debido a una regulación a la baja de esta proteína. Esto se debe a un mecanismo de compensación en las fases iniciales de la enfermedad que tiene como finalidad mantener estables las concentraciones de dopamina sináptica [200-202]. Un factor de confusión en la valoración de la progresión de la EP marcando el DAT, es la evidencia de la disminución de esta proteína en relación con la edad [229]. Esta disminución del DAT podría tener un

papel importante en el mantenimiento de la función motora en el envejecimiento normal [248].

6.4.1.2. Valoración del VMAT2

La ^{11}C -dihidrotetrabenazina (DTBZ) es el trazador de PET que se une a la proteína VMAT2. Este transportador es un marcador específico de la inervación dopaminérgica nigroestriatal. El patrón de neuroimagen de los pacientes con EP es superponible a los descritos para la ^{18}F -fluorodopa y los marcadores del DAT [249]. Los estudios de PET con DTBZ también se han utilizado para valorar la progresión de la EP y han confirmado los hallazgos descritos en otros estudios con distintos marcadores [250]. Algunos grupos consideran que la PET con DTBZ muestra de forma más fiable la densidad de terminales dopaminérgicas estriatales, ya que no parecen existir mecanismos de compensación de importancia en la expresión del VMAT2 en la EP, al contrario de lo que sucede con la AAD y el DAT [187,200,246]. Para asumir esta hipótesis, además, habría que demostrar que los fármacos dopaminérgicos no tienen efecto sobre la unión estriatal de la DTBZ. En este sentido, existen estudios animales que descartan que los fármacos dopaminérgicos tengan efecto sobre la unión de la DTBZ al VMAT2 [251,252]. Sin embargo, un estudio reciente ha demostrado una disminución en la fijación estriatal de DTBZ tras la toma de levodopa, fundamentalmente en pacientes con una EP avanzada. Los autores de la publicación sugieren que este efecto sería consecuencia del aumento de dopamina vesicular de origen exógeno [253]. El VMAT2, al igual que el DAT, disminuye con la edad, un hecho comprobado tanto en estudios en humanos como con animales [187,249].

6.4.2. Valoración de la función dopaminérgica postsináptica

Para la valoración de la función dopaminérgica postsináptica se utilizan trazadores que se unen a los receptores dopaminérgicos D_2 . Para la PET se utilizan el ^{11}C -raclopride y la ^{11}C -metilespiperona y para la SPECT el ^{123}I -iodobenzamida. Los estudios de PET con ^{11}C -raclopride en pacientes con EP *de novo* muestran una fijación estriatal de este trazador normal o ligeramente aumentada, posiblemente como mecanismo de compensación en respuesta a la disminución de dopamina presináptica [254-256]. En el caso de pacientes tratados con fármacos

dopaminérgicos, el estudio se normaliza, si previamente existía un aumento de la unión del ^{11}C -raclopride, o disminuye ligeramente [203]. Esta relativa ausencia de cambio en la unión de los radiotrazadores de los receptores D_2 en la EP, contrasta con los hallazgos en la AMS o la PSP, donde existe una disminución de la unión de ^{11}C -raclopride, en consonancia con los estudios histopatológicos que muestran una disminución de los receptores D_2 en el estriado [230,254]. Por lo tanto, las técnicas de neuroimagen que utilizan estos radiotrazadores son útiles para el diagnóstico diferencial entre la EP y los parkinsonismos atípicos [230,257].

Uno de los aspectos más interesantes del PET con ^{11}C -raclopride es que es capaz de mostrar cambios en los niveles de dopamina sináptica, ya que este neurotransmisor compite con el radiotrazador por la unión a los receptores D_2 . La elevación de los niveles de dopamina sináptica se puede producir por la administración de fármacos que inhiben o invierten la función del DAT, como las anfetaminas, el metilfenidato o la cocaína, o mediante la realización de tareas motoras o cognitivas que inducen la liberación de dopamina. Se ha estimado que una reducción del 10% en la unión del ^{11}C -raclopride refleja un aumento por cinco de los niveles de dopamina. Entre otros aspectos, esta técnica ha ayudado a estudiar la variación de los niveles de dopamina sináptica en los pacientes con EP y complicaciones motoras [258].

6.4.3. Valoración de otros sistemas de neurotransmisores

Los estudios histopatológicos en los cerebros de pacientes con EP han demostrado afectación del núcleo basal de Meynert, los núcleos del rafe y el *locus ceruleus*. Por lo tanto, además de la degeneración del sistema dopaminérgico, el proceso patológico afecta a las neuronas colinérgicas, serotoninérgicas y noradrenérgicas, que podrían ser responsables de algunos síntomas motores y no motores de la EP [167].

Un estudio de PET con el trazador ^{11}C -WAY100635, que se une a los receptores serotoninérgicos presinápticos $5\text{-HT}_{1\text{A}}$, ha mostrado una reducción del 27% en la unión de este marcador en los núcleos del rafe de los pacientes con EP. Esta disminución se correlaciona con la severidad del temblor y sugiere que la

etiopatogenia de este signo motor está relacionada con la degeneración de estos núcleos serotoninérgicos [12].

Los cambios en la neurotransmisión serotoninérgica se han implicado en la etiopatogenia de la depresión idiopática. Sin embargo, los estudios de neuroimagen con trazadores serotoninérgicos no han correlacionado la disfunción de este sistema de neurotransmisión con la presencia de depresión en los pacientes con EP [229,259]. Sin embargo, un estudio de PET con ^{11}C -RT132, marcador que se une a los transportadores de membrana de la dopamina y la noradrenalina, ha mostrado que la depresión y la ansiedad en la EP se correlacionan con una menor unión de éste en el *locus ceruleus* y en diversas áreas del sistema límbico como la corteza cingular anterior, el tálamo, la amígdala y el estriado ventral. Por lo que, la depresión y la ansiedad en la EP parecen estar relacionadas con la pérdida de innervación dopaminérgica y noradrenérgica del sistema límbico [260].

Los estudios de neuroimagen con radiotrazadores para valorar el sistema colinérgico se han utilizado para estudiar la etiopatogenia del deterioro cognitivo en la EP. Los trazadores utilizados para la PET son el ^{11}C -MP4A y el ^{11}C -PMP, que valoran la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, y para la SPECT, el trazador es el ^{123}I -BMV, que marca el transportador vesicular de acetilcolina [229,259,261]. Los estudios de SPECT con ^{123}I -BMV ponen de manifiesto un leve déficit colinérgico restringido a la corteza parietal y occipital en los pacientes con EP sin demencia, mientras que en los pacientes que cumplen criterios de demencia, el déficit colinérgico se generaliza a toda la corteza [262]. Los estudios de PET con ^{11}C -MP4A y ^{11}C -PMP también evidenciaron una disminución en la actividad de la acetilcolinesterasa en los pacientes con EP, que era mayor en los pacientes con demencia [263,264].

6.4.4. Otros estudios de neuroimagen funcional

La técnica de PET, además de valorar diversos marcadores bioquímicos, puede estudiar el metabolismo cerebral global mediante la utilización de glucosa marcada. Los estudios de PET con ^{18}F -fluorodeoxiglucosa (^{18}F FDG) en los pacientes con una EP incipiente, muestran un aumento del metabolismo del núcleo lenticular

contralateral al hemicuerpo afecto [230]. Eidelber y colaboradores mediante la técnica de análisis del componente principal han objetivado un patrón anormal de metabolismo en los pacientes con EP, que se caracteriza por un aumento de la actividad pálido-talámica, cerebelosa y pontina, y una reducción de ésta en áreas de asociación y en la corteza motora. Este patrón metabólico se relaciona con la disfunción motora, con la progresión de la enfermedad y se modula con los tratamientos administrados a los pacientes [265,266]. Esta técnica de análisis de las imágenes de la PET con ¹⁸FDG puede tener mucha utilidad clínica, ya que permite discriminar entre pacientes con EP y sujetos sanos, así como diferenciar la EP de otros parkinsonismos atípicos como la AMS, la PSP y la DCB [266-268].

6.5. Tratamiento y progresión de la enfermedad de Parkinson

Aunque en la actualidad la EP es todavía una entidad incurable, las terapias sintomáticas de las que disponemos mejoran de forma sustancial la capacidad funcional y la calidad de vida de los pacientes. En este sentido, el tratamiento con levodopa, en combinación con un inhibidor de la AAAD periférica (carbidopa o benserazida), desde que se comenzó a utilizar a mediados del siglo XX [184,269,270], continúa siendo el fármaco más eficaz, pudiéndose llegar a obtener una mejoría de hasta el 70% en el control de los síntomas motores. Sin embargo, un porcentaje muy importante de los pacientes tratados crónicamente con levodopa presenta complicaciones motoras en forma de fluctuaciones y discinesias [13,271,272]. Los agonistas dopaminérgicos no ergóticos (pramipexol, ropirinol y rotigotina) son fármacos que se unen a los receptores dopaminérgicos. Son sustancias eficaces que en monoterapia inducen menos complicaciones motoras que la levodopa y, por este motivo, se utilizan como primera opción terapéutica en los pacientes con EP menores de 55 años. Sin embargo, a los pocos años del diagnóstico suele ser necesario añadir levodopa, dada su mayor eficacia para el control de los síntomas motores [273]. Los inhibidores de la MAO-B (IMAO-B), selegilina y rasagilina, son fármacos menos eficaces que la levodopa o los agonistas dopaminérgicos. Sin embargo, a la rasagilina se le ha atribuido un efecto modificador de la progresión de la enfermedad cuando se utiliza tempranamente [274]. Por último, la administración de inhibidores periféricos de la COMT (ICOMT), como la entacapona o la tolcapona, junto con levodopa prolonga la vida media de esta última

y, es útil para estabilizar las fluctuaciones motoras. Otras terapias invasivas que se pueden utilizar en determinados casos son la administración subcutánea de apomorfina, la administración intraduodenal de levodopa (Duodopa) y la cirugía funcional [13,275-277].

Desde hace décadas existe un gran debate sobre el momento oportuno para iniciar el tratamiento sustitutivo con levodopa. A principios de los años 70, había autores que recomendaban iniciar de forma temprana el tratamiento con levodopa para evitar el aumento de la actividad de las neuronas dopaminérgicas residuales. Sin embargo, la aparición de complicaciones motoras asociadas al tratamiento precoz con levodopa hizo que, pocos años más tarde, se sugiriera que era preferible diferir esta terapia hasta que los síntomas parkinsonianos fueran más incapacitantes [184]. En los años 80, Cohen y colaboradores sugirieron que la dopamina podía estar implicada en la producción de peróxido de hidrógeno y radicales libres del oxígeno, y que este hecho, podría causar la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de los pacientes con EP, en las que ya existe una alteración de la función de los mecanismos antioxidantes [278]. La dopamina podría generar sustancias derivadas del oxígeno como consecuencia de la actividad enzimática de la MAO sobre la dopamina y por la autooxidación de este neurotransmisor, ayudado por el alto contenido en hierro y neuromelanina en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc [279]. A partir de este momento se estableció la sospecha de que la levodopa, al incrementar los niveles de dopamina en el citosol de las neuronas dopaminérgicas, podía tener un efecto neurotóxico sobre éstas [280-282]. A favor de la hipótesis del estrés oxidativo, se encuentra el hecho de un aumento de los productos de la oxidación inducida por los radicales libres [42-44] y una disminución de las enzimas antioxidantes o sus co-enzimas en la SN de los pacientes con EP [45-47].

6.5.1. La levodopa, ¿neurotóxica o neuroprotectora? Estudios básicos

Durante la década de los 90, varios estudios *in vitro* mostraron que las neuronas catecolaminérgicas a cuyo medio se le añade dosis elevadas de levodopa o dopamina presentan una alta mortalidad celular [283-287]. El efecto neurotóxico de la levodopa está en relación con el aumento de los niveles citosólicos de dopamina,

que a su vez está limitado por la actividad de la AAD. Sin embargo, la muerte de las neuronas dopaminérgicas también parece estar influenciada por otros factores como la presencia de α -sinucleína mutada y los niveles elevados del calcio intracelular, que inducen un aumento de la dopamina citosólica al modular al alza la actividad de la enzima AAD [288].

Por otro lado, hay estudios *in vitro* que muestran que la levodopa no sólo no es neurotóxica, sino que en todo caso, tiene un efecto neuroprotector mediado por la producción de sustancias antioxidantes o neurotróficas. De hecho, la exposición de neuronas mesencefálicas de rata a la levodopa estimula la producción de sustancias antioxidantes como el glutatión reducido, que les confiere protección frente al estrés oxidativo [289,290]. Otro dato que apoya la hipótesis neuroprotectora de la levodopa es el hecho de que su administración aumenta la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas cuando en los cultivos también hay células gliales, formando un medio que se acerca a la situación real de las neuronas en la SN [291]. También hay autores que han cuestionado los resultados de los estudios *in vitro* que proponen que la levodopa y la dopamina son neurotóxicas, y lo atribuyen a un efecto indirecto como consecuencia de la oxidación de estas sustancias en el medio de cultivo celular [292].

Los estudios *in vivo* en modelos animales de la EP también aportan datos contradictorios. La administración intraperitoneal aguda o crónica de levodopa a ratas sanas da como resultado el aumento de la formación de 6-OHDA estriatal y de la peroxidación lipídica [293]. Sin embargo, la administración de dosis elevadas de levodopa a roedores o monos sanos no produce degeneración nigroestriatal [294,295]. Algunos estudios en roedores parkinsonianos han mostrado que el tratamiento con levodopa disminuye la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas [296,297]. No obstante, otros descartan este efecto y establecen que la levodopa mejora la recuperación celular de los animales e incluso, que tiene un efecto protector frente a sustancias neurotóxicas como la 6-OHDA o la MPTP [298-300].

6.5.2. La levodopa, ¿neurotóxica o neuroprotectora? Estudios clínicos

En los años 2002 y 2003 fueron publicados dos estudios en pacientes con EP que valoraban el efecto de la administración de levodopa o de un agonista dopaminérgico en la función dopaminérgica presináptica mediante técnicas de neuroimagen funcional. En el estudio CALM-PD se utilizó como técnica de neuroimagen la SPECT con ^{123}I - β -CIT, un radiotrazador para el DAT, y se compararon 40 pacientes tratados con levodopa frente a 42 pacientes tratados con pramipexol. A los 4 años de seguimiento, los pacientes tratados con levodopa presentaron una reducción de la captación estriatal de ^{123}I - β -CIT del 28,9% con respecto al estudio basal, mientras que en el grupo tratado con pramipexol la reducción fue del 17,2% ($p=0,01$) [301]. Sin embargo, los pacientes tratados con levodopa presentaron una mejoría clínica significativamente mayor que los sujetos tratados con pramipexol, aunque estos últimos desarrollaron menos complicaciones motoras [302]. En el estudio REAL-PET se utilizó como técnica de neuroimagen la PET con ^{18}F -fluorodopa y se compararon 59 pacientes tratados con levodopa frente a 68 pacientes tratados con ropirinol. A los 2 años de seguimiento, los pacientes tratados con levodopa presentaron una reducción de la actividad de la AAAD putaminal del 20,3% con respecto al estudio basal, mientras que en el grupo tratado con ropirinol la reducción fue del 13,4% ($p=0,022$) [303]. Los hallazgos de ambos estudios podrían ser interpretados tanto como que la levodopa tiene un efecto neurotóxico y acelera el proceso neurodegenerativo de la EP, o, por otra parte, que los agonistas dopaminérgicos tienen un efecto neuroprotector sobre las neuronas dopaminérgicas de la SN, o ambos efectos a la vez. Sin embargo, estos hallazgos de neuroimagen también podrían ser consecuencia del efecto del tratamiento farmacológico sobre la expresión del DAT o la actividad de la AAAD. Para intentar dilucidar el posible efecto neurotóxico de la levodopa se diseñó el estudio ELLDOPA. Se reclutaron 361 pacientes con EP en un estadio inicial y no tratados previamente. Los pacientes fueron divididos en cuatro grupos. Tres de ellos recibieron tratamiento con levodopa con distinta dosificación (150, 300 ó 600 mg/día) y el cuarto grupo recibió placebo. Los pacientes fueron tratados durante 40 semanas y, pasado este tiempo, se redujo la toma de medicación durante tres días hasta que fue suspendida completamente. Posteriormente, los pacientes tuvieron que pasar un periodo de lavado de dos semanas, en el que no recibieron tratamiento alguno para la EP. Los

pacientes tratados con levodopa presentaron un mejor control de los síntomas de la EP valorado mediante la escala UPDRS. Esta mejoría clínica era mayor en los pacientes que recibieron dosis más elevadas del fármaco. Sin embargo, los pacientes tratados con 600 mg/día de levodopa tenían más tendencia a presentar complicaciones motoras como discinesias y fluctuaciones motoras. Durante el periodo de lavado farmacológico, los pacientes tratados con levodopa mostraron un empeoramiento clínico que no llegó a ser como el observado en los pacientes del grupo placebo. Dentro de este ensayo clínico a un subgrupo de pacientes se les realizó una SPECT con ^{123}I - β -CIT basal y a la semana 40 del estudio. Sorprendentemente, se objetivó una disminución significativa ($p=0,036$) de la captación de este radiotrazador en los pacientes tratados con levodopa frente al grupo placebo. Por lo tanto, los datos clínicos sugieren que la utilización de levodopa ralentiza la progresión de la EP, mientras que los datos de neuroimagen apuntan lo contrario [304]. En el caso de que la levodopa fuera neuroprotectora, una posible explicación de los hallazgos de neuroimagen sería el efecto modulador de ésta sobre el DAT. Mientras que si la levodopa fuera neurotóxica, el efecto clínico podría reflejar una eliminación incompleta del beneficio sintomático de esta sustancia por un periodo de lavado farmacológico excesivamente corto [305].

En el momento actual, aunque persiste la duda sobre el posible efecto tóxico de la levodopa sobre las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, no hay evidencias clínicas para pensar que favorezca la progresión de la EP. Por lo tanto, los datos de las pruebas de neuroimagen de los estudios REAL-PET, CALM-PD y ELLDOPA podrían representar un efecto modulador de la levodopa sobre el DAT y la actividad de la AAAD. El modelo del macaco intoxicado con MPTP podría ser útil para la valorar el efecto modulador de esta sustancia sobre los distintos marcadores presinápticos dopaminérgicos, ya que se trata de un modelo no progresivo de la EP. De esta forma evitaríamos el factor de confusión que supone la progresión de la degeneración nigroestriada.

Hipótesis y objetivos

Como se ha expuesto en la introducción, aunque la EP es una enfermedad neurodegenerativa todavía incurable, en la actualidad disponemos de terapias sintomáticas que prolongan la vida de los pacientes y mejoran de forma sustancial tanto su capacidad funcional como su calidad de vida. En este sentido, el tratamiento con levodopa continúa siendo la terapia más eficaz para controlar los síntomas motores de esta entidad. Sin embargo, un porcentaje muy importante de los pacientes tratados crónicamente con levodopa desarrollan complicaciones motoras. Por este motivo, todavía existe un gran debate sobre el momento oportuno para iniciar el tratamiento sustitutivo con levodopa. Esta controversia se ha acentuado con los resultados obtenidos en modelos experimentales de EP en los que la levodopa y la dopamina reducen la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas tanto *in vivo* como *in vitro*. En base a estos resultados se postuló que la levodopa podía tener un efecto neurotóxico y, por lo tanto, podría acelerar la progresión de la EP. Sin embargo, los resultados de los estudios experimentales *in vitro* e *in vivo* y los estudios clínicos y de neuroimagen funcional en pacientes con EP diseñados para probar el efecto tóxico de la levodopa/dopamina han resultado contradictorios. En el caso de los estudios REAL-PET, CALM-PD y ELLDOPA, a pesar de la mejoría clínica que obtienen los pacientes tratados con levodopa, las técnicas de neuroimagen sugieren que estos pacientes tienen mayor degeneración nigroestriada que los tratados con agonistas dopaminérgicos. Otros autores, sin embargo, consideran que estos datos podrían ser consecuencia de un efecto modulador de la levodopa/dopamina sobre los marcadores dopaminérgicos utilizados en las técnicas de neuroimagen (DAT y AAD) [306-308].

Este trabajo de investigación se ha planteado con la finalidad de valorar si el tratamiento crónico con levodopa ejerce un efecto modulador de la actividad de la AAD que pueda explicar la discrepancia de resultados clínicos y de neuroimagen descritos en los estudios mencionados, para lo cual hemos utilizado el modelo no progresivo de EP que resulta de la administración de MPTP a macacos. Nuestra **hipótesis** de trabajo es que el tratamiento crónico con levodopa modifica de forma reversible la actividad enzimática de la AAD, lo que se traduciría en una disminución en la captación estriatal de ^{18}F -fluorodopa sin ejercer un efecto

neurotóxico sobre las neuronas dopaminérgicas de la SNpc del macaco parkinsoniano. Para confirmar esta hipótesis planteamos los siguientes **objetivos**:

1. Estudiar el efecto *in vivo* de la administración crónica de levodopa en la actividad de la enzima AAAD estriatal mediante estudios de PET con ^{18}F -fluorodopa en macacos con parkinsonismo inducido por la MPTP.
2. En el caso de que la levodopa produzca una modificación de la actividad de la AAAD estriatal, medida mediante PET con ^{18}F -fluorodopa, determinar si ésta es reversible y el tiempo de lavado farmacológico necesario para que revierta a la situación previa al tratamiento.
3. Estudiar el efecto del tratamiento con levodopa sobre el número de neuronas dopaminérgicas de la SNpc y del estriado de los monos parkinsonianos.
4. Valorar el efecto del tratamiento crónico con levodopa sobre la cantidad de proteína TH, DAT y AAAD estriatal.

Material y Métodos

1. Animales

Se incluyeron 11 macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) machos de 3 años de edad y 3-4,5 kg de peso al comienzo del estudio. Los animales se establecieron bajo condiciones estándar de intercambio de aire (16 l/min), humedad relativa (50%) y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Los animales tenían acceso libre al agua y fueron alimentados con fruta fresca y piensos comerciales específicos.

Los protocolos experimentales cumplían la directiva del Consejo de la Unión Europea del 24 de noviembre de 1986 (86/609/EEC) sobre el cuidado y utilización de los animales de experimentación y fueron supervisados por la Comisión de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Navarra.

2. Administración de la MPTP y grupos experimentales

Ocho animales recibieron la MPTP (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) disuelta en suero salino estéril (NaCl 0,9%) a una concentración final de 1 mg/ml. Estos animales recibieron dosis individuales de 0,25 mg de MPTP/kg/semana a través de la vena safena de la extremidad inferior durante 7 semanas consecutivas para inducir un parkinsonismo leve. Antes de la administración de la MPTP, los animales eran anestesiados con ketamina (Imalgene®, 10 mg/kg) por vía intramuscular. Para los estudios bioquímicos e histológicos se utilizó un grupo control de tres animales (denominados M9 a M11).

Tras una fase de estabilización de los síntomas parkinsonianos de un mes, los animales que recibieron la MPTP fueron divididos en dos grupos:

- Grupo 1 (M1-M4): constituido por 4 animales a los que se les administró zumo de naranja 3 veces al día sin ningún principio activo durante 11 meses consecutivos.
- Grupo 2 (M5-M8): formado por 4 macacos parkinsonianos que fueron tratados con levodopa (30 mg/kg/día repartidos en tres dosis) por vía oral junto con

benserazida (7,5 mg/kg/día repartido en tres tomas) diluido en el mismo volumen de zumo de naranja durante 11 meses consecutivos.

3. Evaluación motora

La evaluación motora se realizó antes de la intoxicación con la MPTP, al mes de la última dosis sistémica de esta neurotoxina y, posteriormente, de forma mensual hasta el sacrificio de los animales. Mientras los animales estaban siendo tratados con levodopa o placebo, la valoración motora mensual se realizó cada quince minutos, una hora antes de la administración del zumo de naranja con el principio activo o el placebo, y a lo largo de las dos horas posteriores a la misma. Todos los animales fueron grabados mientras eran evaluados.

Se utilizó una escala de valoración de la discapacidad motora para primates no humanos que consta de siete parámetros con distinto rango de puntuación:

- Intensidad y duración el temblor: de 0 (normal) a 3 (máxima discapacidad)
- Equilibrio: de 0 (normal) a 3 (máxima discapacidad)
- Alimentación: de 0 (normal) a 3 (máxima discapacidad)
- Freezing: de 0 (normal) a 3 (máxima discapacidad)
- Actividad espontánea: de 0 (normal) a 5 (máxima discapacidad)
- Bradicinesia: de 0 (normal) a 4 (máxima discapacidad)
- Postura: de 0 (normal) a 4 (máxima discapacidad)

La puntuación total de esta escala varía entre 0 (normal) y 28 (máxima incapacidad) [309].

4. Estudios de resonancia magnética cerebral

A todos los animales de los grupos 1 y 2 se les realizaron dos estudios de RM cerebral. Éstos se llevaron a cabo con los animales anestesiados (10mg/kg de ketamina y 0,5 mg/kg de midazolam [Dormicum®] vía intramuscular, repitiéndose la mitad de esta dosis cada 45-60 minutos). El primero de ellos se realizó antes de la

administración de la primera inyección de la MPTP. El segundo se efectuó tras suspender el tratamiento con levodopa-benserazida o placebo, es decir al cabo de un año aproximadamente tras el primer estudio. La RM cerebral se realizó en un equipo 1,5 Teslas Magnetom Symphony Tim (Siemens, Erlangen, Germany) utilizando una bobina flexible rodeando el cráneo del animal. Se realizó una secuencia tridimensional isotrópica potenciada en T1 MPRAGE (*Magnetization Prepared Rapid Gradient Echo*) (TR 2140 ms; TE 5,03 ms; TI 1100 ms; FOV 192 mm; 88 imágenes; ángulo de inclinación 15°; ancho de banda: 130 Hz/pixel; tamaño de voxel de 1x1x1 mm; tiempo de adquisición 6 minutos 52 segundos). Las imágenes anatómicas obtenidas sirvieron de ayuda para la posterior identificación de las estructuras encefálicas y la correcta cuantificación de las imágenes obtenidas en los estudios de PET.

5. Estudios de tomografía de emisión de positrones

Para los estudios de PET se utilizó el radioisótopo ^{18}F (periodo de semidesintegración de 110 minutos) unido al marcador DOPA. Dicho radiotrazador fue sintetizado en el laboratorio PET de la Clínica Universidad de Navarra. Se realizaron estudios de PET de ^{18}F -fluorodopa a los dos grupos de monos intoxicados con la MPTP según el siguiente esquema: 1) basal, antes del tratamiento con la MPTP; 2) al mes de la última inyección de la MPTP y antes de iniciar la administración de levodopa; 3) al día siguiente de terminar el tratamiento con levodopa; 4) al mes de haber finalizado el tratamiento con levodopa; 5) a los 3 meses de haber finalizado el tratamiento con levodopa; 6) a los 6 meses de haber finalizado el tratamiento con levodopa (Figura 2). Estos estudios serán denominados como PET basal, PET MPTP, PET tratamiento, PET lavado 1, PET lavado 2 y PET lavado 3, respectivamente.

Los animales permanecieron en ayunas al menos las 12 horas previas a la realización de la prueba. Una hora antes de la realización del estudio de PET de ^{18}F -fluorodopa, los animales recibieron 50 mg de carbidopa por vía oral (inhibidor periférico de la AAAD) para bloquear la metabolización periférica del trazador a fluorodopamina. El traslado de los monos a las instalaciones y el estudio de PET se

efectuaron bajo sedación (10 mg/kg de ketamina y 0,5 mg/kg de midazolam vía intramuscular, repitiéndose la mitad de la dosis inicial cada 45-60 minutos).

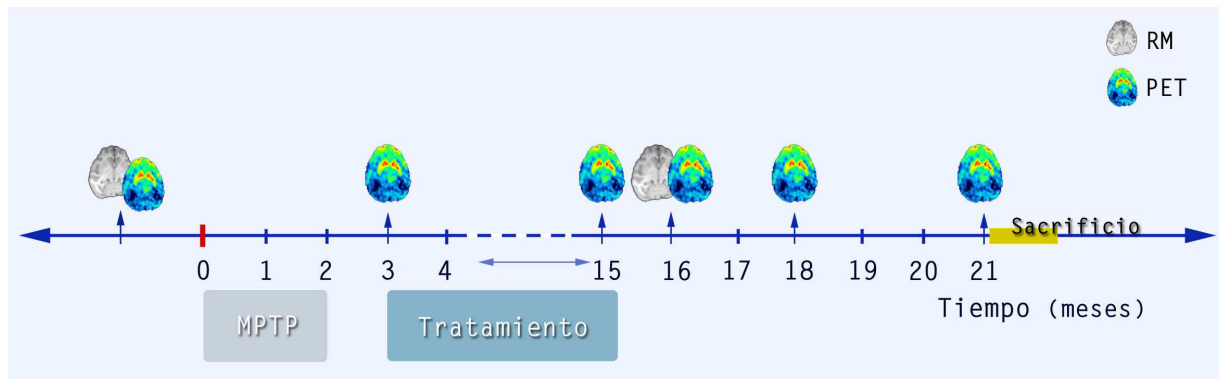


Figura 2. Representación esquemática del desarrollo del estudio experimental sobre un eje que representa el tiempo en meses. RM: resonancia magnética cerebral; PET: estudio de tomografía por emisión de positrones con ^{18}F -fluorodopa.

5.1. Adquisición de las imágenes

El equipo utilizado para los estudios PET fue un tomógrafo para pequeños animales Mosaic de Philips (Cleveland, Ohio, USA), con una resolución de 2 mm y un campo axial de 11,9 cm y transaxial de 12,8 cm siguiendo el protocolo descrito previamente [310]. Resumiendo, los animales anestesiados fueron colocados en la camilla del equipo con el cerebro centrado en el campo de visión en posición prono. Previamente a los estudios de emisión, se realizó una transmisión con una fuente externa de Cs-137 de 10 mCi para la posterior corrección por atenuación de las imágenes. El radiofármaco ($72,9 \pm 0,9$ MBq de actividad) se inyectó vía vena safena simultáneamente al comienzo de un estudio dinámico de 100 minutos, inyectándose posteriormente suero salino para asegurar que toda la dosis había sido administrada correctamente. Para cada estudio se creó un senograma de todo el intervalo de emisión a partir del cual se reconstruyó una imagen suma que recogía toda la información del estudio. Además, se creó un senograma dinámico de 23 *frames* (10x90"; 9x300"; 4x600") a partir del cual se generó una imagen dinámica que contenía la información de las correspondientes franjas temporales. Todas las imágenes, tanto la imagen suma como las dinámicas, se reconstruyeron mediante un algoritmo 3D aplicándose las correcciones de tiempo muerto, *decay*, dispersión y atenuación.

5.2. Análisis y cuantificación de los estudios

5.2.1. Creación de las imágenes paramétricas

Las imágenes obtenidas en los estudios PET tienen un valor de actividad (KBq/cc). Sin embargo, la cuantificación y análisis de los estudios se llevó a cabo mediante el estudio de imágenes paramétricas creadas a partir de estas imágenes de actividad, donde el valor de la imagen se corresponde a un parámetro biológico. Este parámetro calculado depende de la naturaleza del radiofármaco utilizado, que en el caso de la ^{18}F -fluorodopa es la constante de Patlak o constante de captación (k_i), que representa la fracción de la actividad sanguínea de la ^{18}F -fluorodopa que ha sido captada por el cerebro por unidad de tiempo. La creación de las imágenes paramétricas se llevó a cabo con el programa informático especializado PMOD (PMOD Technologies Ltd., Adliswil, Switzerland). Las etapas que se siguieron para la creación de las imágenes paramétricas se resumen a continuación:

I) Las imágenes PET suma se normalizaron espacialmente mediante la utilización de una plantilla de RM creada especialmente para este estudio [310]. Una vez realizada la normalización de la imagen suma, la misma matriz de transformación espacial se aplicó al estudio dinámico.

II) Sobre la imagen normalizada se aplicó un mapa de volúmenes de interés (VOIs) definido previamente en imágenes de RM y que incluye la corteza occipital, considerada una región de captación no específica del radiotrazador o región de referencia. Gracias a la aplicación de las VOIs sobre a la imagen dinámica, se obtuvieron la curva actividad-tiempo para esta región de referencia. La normalización espacial de cada uno de los estudios PET fue fundamental para el correcto posicionamiento de las VOIs y agilizó el análisis al utilizar un mapa de VOIs común válido para todos los estudios.

III) A continuación, se crearon las imágenes paramétricas mediante el análisis de Patlak [311], donde se utiliza la curva de la región de referencia de corteza occipital.

5.2.2. Cuantificación por regiones de interés

Sobre la imagen paramétrica, se aplicó un nuevo mapa de VOIs que incluía el estriado completo (caudado+putamen), así como el caudado, putamen precomisural

y putamen postcomisural, obteniéndose los valores específicos de la k_i para ^{18}F -fluorodopa en cada región de interés.

5.3. Análisis mediante SPM

El análisis SPM (del inglés, *Statistical Parametric Mapping*) constituye otra forma de analizar las imágenes obtenidas en el PET en el que se utiliza el programa informático especializado SPM2 (Wellcome Department of Imaging Neuroscience, Institute of Neurology, University College, London, UK). La finalidad de este programa informático es el diseño y análisis de estudios estadísticos sobre imágenes funcionales para validar hipótesis sobre efectos presentes en las imágenes y sin definir *a priori* las regiones a analizar [312]. Este estudio estadístico se aplica voxel a voxel sobre las imágenes normalizadas espacialmente, obteniéndose un nuevo volumen o mapa estadístico en el que cada voxel indica el nivel de significación de las diferencias entre las condiciones o estados.

Antes de realizar el análisis, se aplicó un suavizado de 4 mm para poder localizar cambios significativos en niveles de un voxel y se aplicó una máscara específica para dejar fuera del análisis las regiones extracerebrales. Las comparaciones fueron hechas empleando un t-test pareado y se definieron dos contrastes para detectar aumentos o disminuciones de la k_i de la ^{18}F -fluorodopa comparando los estudios entre los monos controles y los tratados y dentro de cada uno de los dos grupos de animales, permitiendo que los vóxeles que tenían un cambio significativo pudieran ser identificados sobre todo el cerebro. Se usó un umbral de significación de $p < 0,05$ corregido por múltiples comparaciones (FWE: *family wise error*). Finalmente, los mapas significativos paramétricos fueron superpuestos sobre la plantilla de RM y usados para la identificación de regiones afectadas.

6. Sacrificio de los animales y preparación del tejido

Los animales fueron sacrificados a los seis meses de haber suspendido el tratamiento con levodopa-benserazida o placebo. Para ello, se anestesiaron con una mezcla de ketamina (15 mg/kg) y xilacina (0,75 mg/kg) llegando casi al extremo de la

sobredosis con la finalidad de que estuvieran profundamente anestesiados al comenzar la perfusión. Todos los animales fueron perfundidos por vía intracardiaca con 1 litro de tampón fosfato salino 0,1M pH 7,3 (PBS) seguido de 3 litros de solución fijadora compuesta por paraformaldehído (PFA, Sigma) al 4% diluido en PBS. Los cerebros se extrajeron inmediatamente y se mantuvieron en esta solución fijadora a 4°C durante toda una noche. Posteriormente, los cerebros se introdujeron en una solución de sacarosa (Sigma) al 30% en PBS hasta su procesamiento. Por último, se obtuvieron secciones coronales de 40 µm de grosor mediante un microtomo de congelación (Leica, Germany) que fueron recogidas en una solución crioprotectora compuesta por PB 0,125 M a la que se añade dimetilsulfóxido (DMSO, Panreac) al 2% y glicerina (Panreac) al 20%. Las secciones fueron almacenadas a una temperatura de -20°C hasta su posterior análisis.

7. Técnicas histológicas

7.1. Inmunohistoquímica para tiroxina hidroxilasa

El estudio inmunohistoquímico se realizó con el tejido en flotación y siempre en continua agitación. En primer lugar, todas las secciones fueron lavadas en tampón fosfato salino 0,1 M pH 7,3 (PBS) para eliminar la solución crioprotectora, y posteriormente tratadas durante 15 minutos con peróxido de hidrógeno (H₂O₂, Sigma) al 0,2 % para inactivar las peroxidasas endógenas que permanecen activas en el tejido y así eliminar artefactos. A continuación se procedió al desenmascaramiento de los antígenos mediante un baño en tampón citrato pH 6 a 60°C durante 30 min. Las secciones fueron lavadas e incubadas en una solución de PBS con 0,02 % de Tritón X-100 (Sigma) y suero de cabra al 5% que bloquea las uniones inespecíficas del anticuerpo secundario. Tras este bloqueo el tejido fue incubado en la misma solución a la que añadimos el anticuerpo primario monoclonal específico contra la TH humana dilución 1/25000 (Chemicon) durante una noche a 4°C. Al día siguiente, tras tres lavados de 5 minutos en PBS, se procedió a la incubación del tejido durante 30 minutos con el anticuerpo secundario biotinilado (dilución 1/200) y a continuación con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Vector Laboratories) durante otros 30 minutos. Para visualizar las células inmunopositivas, las secciones fueron incubadas en una solución con acetato-

imidazol (acetato 0,125 M e imidazol 0,01 M, pH 7,2) y 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma) al 0,05% y H₂O₂ al 0,01 % hasta que se observó una coloración marrón oscura. Finalmente, las secciones fueron montadas en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar a temperatura ambiente. Al día siguiente, estos cortes se contrastaron con una tinción de Nissl.

7.2. Tinción de Nissl

La tinción de Nissl se utiliza para diferenciar diferentes estructuras o núcleos cerebrales. Los cortes se sumergieron en una solución de cloroformo y etanol al 50% durante 1 hora. Seguidamente se rehidrataron pasándolos por una batería de etanoles de concentraciones decrecientes (100%, 96%, 80%, 70% y 50%) hasta llegar a H₂O, y se tiñeron durante 2 minutos en una solución comercial de tionina (Sigma). A continuación se enjuagaron en H₂O y se diferenciaron y deshidrataron sumergiéndolos en otra serie de etanoles de concentraciones crecientes (80%, 96% y 100%) que contenían ácido acético glacial al 0,5% (excepto el etanol absoluto). Finalmente los cortes se aclararon en xilol (Panreac) y se cubrieron con medio de montaje DPX (BDH).

7.3. Cuantificación celular

Se realizó una estimación estereológica del número total de células inmunorreactivas para TH (TH-ir) en la SN de los animales con el objetivo de analizar la pérdida neuronal dopaminérgica en la SNpc de los distintos animales incluidos en el estudio. La medición se realizó con un microscopio Olympus BX51 equipado con una plataforma X-Y-Z que se controla mediante el software CAST-GRID (Olympus, Denmark) y aplicando el método del fraccionador óptico [313]. La SNpc fue delimitada con un objetivo de baja ampliación (4X) en cada una de las secciones TH-ir. Para el recuento celular se utilizaron de 12 a 13 secciones que contenían la sustancia negra espaciadas a intervalos de 280 µm, cubriendo toda la extensión de la zona. Desde una posición inicial aleatoria, se superpone a la imagen un marco de cuantificación y las neuronas dopaminérgicas dentro de cada área se contabilizan con un objetivo de 60X. El espesor de la sección fue determinado previamente en un estudio piloto mostrando que las secciones teñidas mediante inmunohistoquímica con un espesor inicial de 40 µm, tras el proceso de

deshidratación y ser cubiertas, disminuyen el grosor hasta a unas $8,44 \pm 0,27 \mu\text{m}$. Esto permite utilizar un disector de $6 \mu\text{m}$ de alto, teniendo en cuenta la necesidad de salvaguardar las distancias por encima y debajo del disector. Se muestrearon un mínimo de 200 células de acuerdo a las reglas del método del disector óptico. El porcentaje de fracción de la muestra y el tamaño y espaciado entre los marcos de cuantificación se establecieron para lograr un error de coeficiente menor del 0,1.

También se cuantificaron las células TH-ir del estriado derecho (caudado y putamen) con microscopía de campo claro, utilizando un microscopio Olympus BX51 con un objetivo de 20x. De cada animal se seleccionaron ocho secciones de $40 \mu\text{m}$ cada una a distintos niveles del estriado precomisural con una distancia de $480 \mu\text{m}$ entre ellas (AP: desde 0 a +4 mm) de acuerdo con el atlas de Martin y Bowden (1996). Se calculó la densidad de las células (número de células TH-ir por 100mm^2) dividiendo el número de células encontradas por el área del estriado rastreado. Los datos obtenidos fueron agrupados por cada animal y en anteriores (primeras cuatro secciones) y posteriores (últimas cuatro secciones).

7.4. Cuantificación de proteínas mediante *Western blot*

Se realizó una cuantificación de las proteínas TH, AAAD y DAT en el estriado de todos los animales mediante *Western blot* (WB). La obtención de tejido (caudado, putamen anterior y putamen posterior) se llevó a cabo mediante la disección de secciones de $40 \mu\text{m}$. En total se emplearon quince secciones de estriado por cada animal. Para la extracción de proteínas del tejido fijado se les añadió $100 \mu\text{L}$ de solución tamponada a pH 9 de Tris-HCl 20 mM que contiene SDS (Sigma) al 2% y se calentó a 100°C en un bloque de calor (VWR Scientific Products) durante 20 minutos y a 60°C en un calentador (Indelab) durante 2 horas. A continuación, se realizó la electroforesis de la muestra en un gel de SDS-poliacrilamida al 10% en una unidad de electroforesis BIO-Rad Miniprotean III. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Biorad) a 300 mA durante 60 minutos. Para evitar reacciones inespecíficas, las membranas fueron bloqueadas con Tris-NaCl-Tween 20 (TNT) complementado con leche seca al 0,5 % durante 1 hora a temperatura ambiente y, a continuación, incubadas con anticuerpos contra TH humana (1:2000) (Chemicon), AAAD (1/2000) (Sigma) o DAT (1/500) (Chemicon)

durante la noche a 4°C. Después de tres lavados de 10 minutos cada uno con TNT, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (GE healthcare). Las membranas fueron lavadas nuevamente con TNT, como hemos descrito anteriormente, y las proteínas se detectaron mediante la adición de sustratos quimioluminiscentes (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante de la película de Kodak X-Omat. Las bandas obtenidas fueron cuantificadas usando un escáner digital (Bio-Rad GS-800) y el software Quantity One 19.0 (Bio-Rad Laboratories Inc.). Con el fin de corregir posibles variaciones en la cantidad total de proteína cargada, los valores obtenidos se relativizaron respecto a la cantidad total de β -actina de cada calle.

8. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Los datos estadísticos de los distintos grupos de animales se compararon utilizando el test no paramétrico de Kruskal Wallis seguido de comparaciones dos a dos mediante el test de U de Mann-Whitney. Para la comparación de las muestras y el estudio de su correlación se utilizó un test de correlación bivariada no paramétrico (coeficiente de correlación de Spearman). La mayoría de los datos se presentan como media \pm desviación estándar (DS). Los valores de probabilidad (p) son a dos colas y se fijó a priori un umbral de significación estadística de p menor o igual a 0,05.

Resultados

1. Actividad motora

La administración sistémica de la MPTP indujo un parkinsonismo leve-moderado en todos los animales con puntuaciones en las escalas de incapacidad motora que oscilaron entre 3 y 8 (rango: 0-28). Ninguno de los animales desarrolló un síndrome parkinsoniano agudo que requiriera la administración de fármacos dopaminérgicos durante la fase de inducción del parkinsonismo. Las dosis de MPTP que recibieron los animales fueron similares para todos ellos y consistió en 7 dosis individuales semanales de 0,25 mg/kg hasta alcanzar una dosis acumulada total que osciló entre 6,8 y 9,4 mg (Tabla 4). Esta dosis de MPTP fue elegida basándose en estudios previos de nuestro laboratorio que indican que esa pauta de administración induce una pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNpc de un 50% e imágenes de captación estriatal de ^{18}F -fluorodopa que permiten su cuantificación posterior. Una vez concluida la administración de la neurotoxina los 8 animales fueron distribuidos de forma aleatoria en dos grupos diferentes. No se observaron diferencias significativas entre las escalas de incapacidad motora de ambos grupos de animales tras la administración de la MPTP (grupo 1: $5 \pm 1,41$; grupo 2: $5,75 \pm 1,47$). Tras un mes de estabilización, los animales del grupo 1 recibieron tres dosis diarias de placebo durante 11 meses, mientras que los del grupo 2 recibieron tres dosis de levodopa asociado a benserazida (dosis total: 30 mg/kg/día y 7,5 mg/kg/día, respectivamente). La administración de levodopa produjo un incremento de la actividad espontánea de los animales. Sin embargo, debido a la leve incapacidad motora que presentaban los animales, no pudo constatarse una reducción significativa de las escalas de incapacidad. Solamente uno de los animales tratados con levodopa desarrolló discinesias en la región orofacial y en menor intensidad en las extremidades inferiores. Ninguno de los animales que recibió placebo desarrolló movimientos involuntarios. Como el objetivo principal de este trabajo fue el estudio de la influencia de la levodopa sobre la funcionalidad de la vía nigroestriada, no se cuantificó la duración de la respuesta motora en relación con las dosis individuales de levodopa, ni tampoco si ésta se modificaba tras su administración crónica.

Tabla 4. Características y tratamientos administrados a los animales del estudio

Animal	Grupo	Edad (años)	Peso (kg)	Dosis de MPTP (mg/kg)	Nº dosis MPTP	Dosis acumulada (mg/kg)	Dosis acumulada total (mg)	Escala de incapacidad motora (rango 0-28)	Dosis diaria levodopa (mg/kg)	Tiempo tratamiento (meses)	Tiempo al sacrificio tras tratamiento (meses)
M1	MPTP + placebo	6	6,200	0,25	7	1,75	6,81	5	NA	11	6
M2	MPTP + placebo	6,8	6,950	0,25	7	1,75	7,63	3	NA	11	6
M3	MPTP + placebo	5,7	6,650	0,25	7	1,75	7,33	5	NA	11	6
M4	MPTP + placebo	6,6	7,170	0,25	7	1,75	7,79	7	NA	11	6
M5	MPTP + levodopa	6,3	8,100	0,25	7	1,75	9,43	5	30	11	6
M6	MPTP + levodopa	6,2	9,070	0,25	7	1,75	8,10	6	30	11	6
M7	MPTP + levodopa	6,4	8,030	0,25	7	1,75	9,39	8	30	11	6
M8	MPTP + levodopa	6,2	7,005	0,25	7	1,75	7,43	4	30	11	6
M9	Control	4,3	3,760	NA	NA	NA	NA	0	NA	NA	NA
M10	Control	4,2	5,180	NA	NA	NA	NA	0	NA	NA	NA
M11	Control	4,3	8,090	NA	NA	NA	NA	0	NA	NA	NA

NA: no aplicable.

2. Estudios de neuroimagen

2.1. Captación estriatal de ^{18}F -fluorodopa en el animal intacto

El estudio de PET de ^{18}F -fluorodopa basal mostró, en todos los animales, una captación estriatal del radiotrazador simétrica y bien contrastada con respecto al resto del parénquima cerebral (Figura 3). Analizando juntos los estudios de todos los animales se obtuvo una constante de captación de ^{18}F -fluorodopa (k_i) en el estriado de $10,41 \pm 1,71$. Dentro del estriado, diferenciando las distintas regiones, la k_i del caudado fue de $10,6 \pm 1,91$, la del putamen anterior fue de $11,8 \pm 1,95$ y la del putamen posterior de $9,63 \pm 1,53$. Posteriormente, se valoraron las k_i basales de los dos grupos de animales por separado (Grupo 1: k_i estriado $11,37 \pm 1,75$, k_i caudado $11,12 \pm 2,23$, k_i putamen anterior $12,51 \pm 1,48$, k_i putamen posterior $10,43 \pm 1,69$; Grupo 2: k_i estriado $9,44 \pm 1,10$, k_i caudado $10,07 \pm 1,65$, k_i putamen anterior $10,25 \pm 1,79$, k_i putamen posterior $8,82 \pm 0,91$) y al compararlas no se observaron diferencias significativas entre ellas.

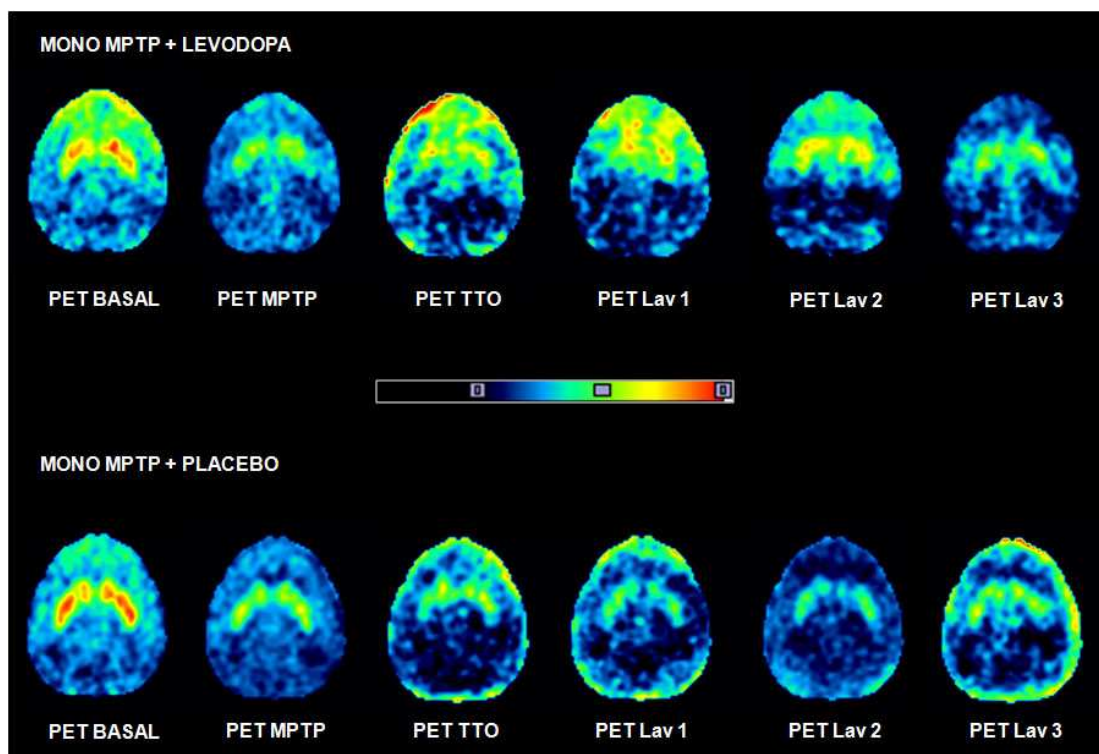


Figura 3. Imágenes paramétricas de los estudios de PET con ^{18}F -fluorodopa realizados a un animal del grupo tratado con levodopa (parte superior) y a otro del grupo placebo (parte inferior de la figura).

En los estudios de PET basales de ambos animales se puede observar una captación estriatal del radiotrazador simétrica y bien contrastada con respecto al resto del parénquima cerebral. En el estudio de PET MPTP se objetiva la disminución de la captación inducida por la administración sistémica de la neurotoxina que no se modifica significativamente a lo largo del estudio (ver texto Resultados). Tto.: Tratamiento; Lav: lavado.

2.2. Efecto de la administración de la MPTP sobre la captación estriatal de ¹⁸F-fluorodopa

En un primer momento, se procedió a analizar conjuntamente los estudios de PET de todos los animales a los que se les administró la MPTP para valorar el efecto de este compuesto sobre la captación estriatal de ¹⁸F-fluorodopa. Los estudios de PET realizados tras la administración de la MPTP mostraron una disminución significativa de la captación del trazador respecto a los estudios de PET basal (Tabla 5). Al analizar en su conjunto los estudios PET de todos los animales se objetivó una disminución de la ki estriatal del $29,79 \pm 20,31\%$ ($p=0,004$) con respecto a los estudios basales. Hay que señalar el alto valor de la desviación estándar (DS) que obtuvimos, lo que señala la gran dispersión de los datos obtenidos. La disminución de la ki estriatal en el estudio de PET tras la administración de la MPTP con respecto al estudio basal varió desde el 4,5 al 62% (Figura 4 y Tabla 6).

Tabla 5. Valores de la constante de captación de ¹⁸F-fluorodopa (ki) del PET basal y tras la administración sistémica de la MPTP del conjunto de los animales del estudio experimental

	ki PET basal	ki PET MPTP	% disminución de la ki del PET MPTP frente al basal	Valor de p
Estriado	10,41 ± 1,71	7,35 ± 2,45	29,79 ± 20,31	0,004
Caudado	10,60 ± 1,91	7,49 ± 2,38	28,05 ± 24,31	0,014
Putamen anterior	11,8 ± 1,95	8,42 ± 2,87	26,38 ± 22,94	0,012
Putamen posterior	9,63 ± 1,53	6,27 ± 3,08	37,04 ± 26,95	0,003

Nota: Los datos se muestran como media ± desviación estándar.

Tabla 6. Valores de la constante de captación de ¹⁸F-fluorodopa (ki) estriatal del estudio del PET basal y tras la administración de la MPTP de cada uno de los animales del estudio experimental

	ki PET basal	ki PET MPTP	% pérdida de la ki
M1	8,95	7,2	19,56
M2	13,05	8,46	35,18
M3	11,4	6,44	43,51
M4	12,11	11,57	4,46
M5	8,2	3,12	61,96
M6	9,38	7,33	21,86
M7	10,89	5,89	45,92
M8	9,3	8,74	6,03

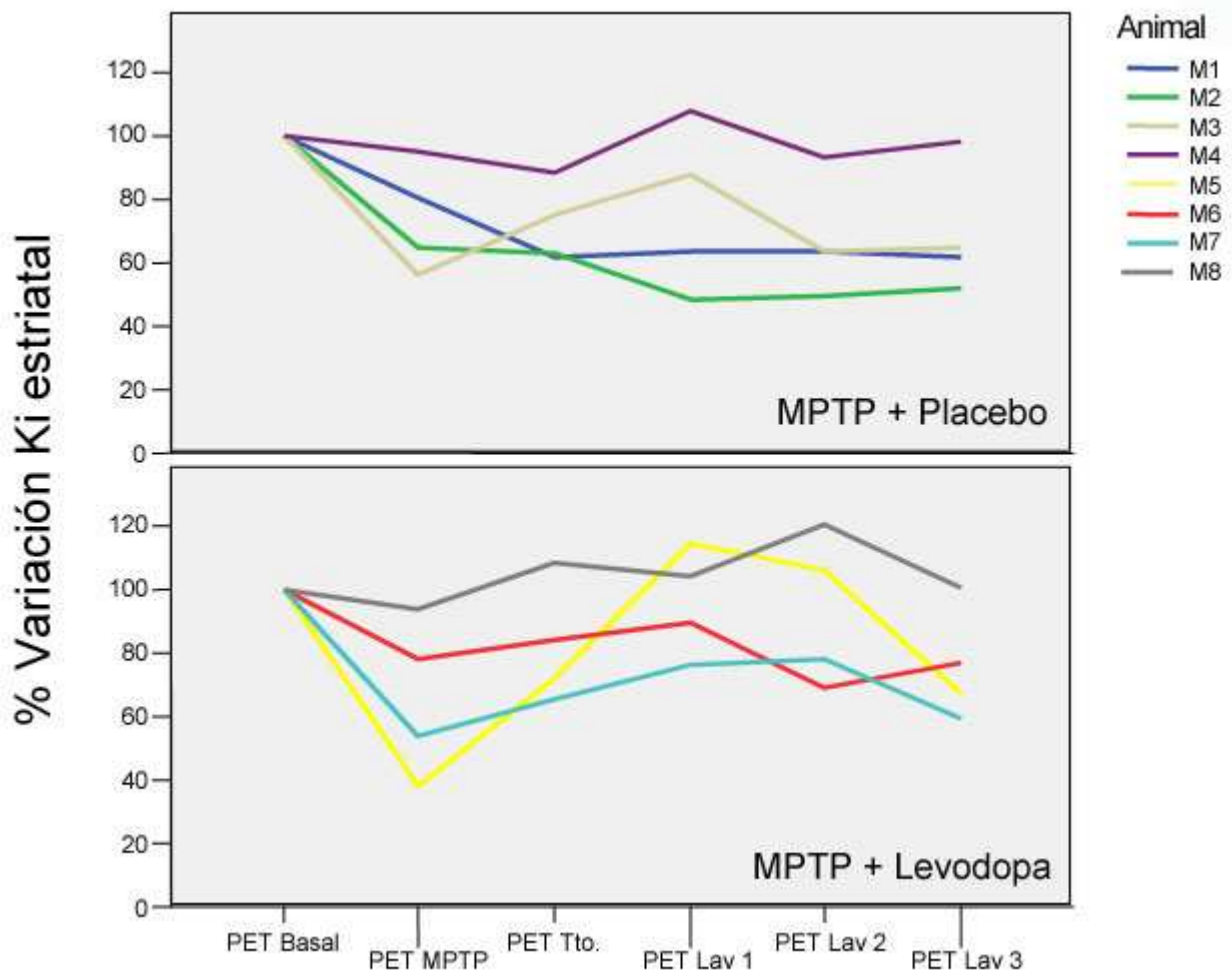


Figura 4. Variación de la media de la ki estriatal de los estudios de PET con ^{18}F -fluorodopa con respecto al PET basal en cada uno de los animales estudiados. Tto.: Tratamiento; Lav: lavado.

Posteriormente, se analizó por separado el efecto de la MPTP sobre la ki estriatal en cada una de las regiones del estriado (caudado, putamen anterior y putamen posterior). La disminución de captación estriatal de ^{18}F -fluorodopa con respecto al estudio de PET basal observada en el análisis conjunto también se constató al analizar las distintas regiones del estriado, alcanzando significación estadística en todas ellas. La disminución de la ki con respecto al valor del PET basal fue de mayor magnitud en el putamen posterior ($37,04 \pm 26,95\%$; $p=0,003$), mientras que en el putamen anterior y en el caudado, la disminución de captación de ^{18}F -fluorodopa fue menor ($26,38 \pm 22,94\%$; $p=0,012$ y $28,05 \pm 24,31\%$; $p=0,014$, respectivamente). Sin embargo, el porcentaje de variación de la ki fue similar en

todas las regiones estriatales analizadas, lo que indica que la MPTP induce una disminución homogénea en la captación de ^{18}F -fluorodopa estriatal, resultados que difieren de los hallazgos descritos en los pacientes con EP.

Además del análisis estadístico de las k_i también se realizó un análisis de la imagen de los estudios de PET basal y tras la intoxicación con la MPTP de los ocho animales mediante SPM. Esta técnica nos permite comparar voxel a voxel las imágenes del PET tras la administración de la MPTP con las imágenes del estudio basal y establecer las diferencias significativas ($p < 0,05$) en la captación de ^{18}F -fluorodopa. Este análisis de imagen también mostró una disminución de la captación de ^{18}F -fluorodopa tras la administración de la neurotoxina que afectó a todo el estriado, tanto al caudado como al putamen (Figura 5).

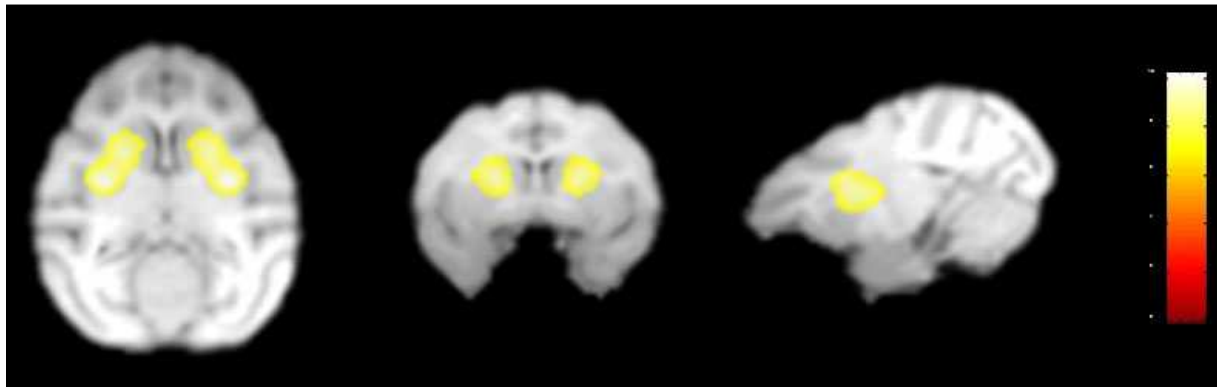


Figura 5. Análisis por SPM de los PET que muestra en amarillo las regiones en las que existe una reducción significativa ($p < 0,05$) de la captación de ^{18}F -fluorodopa estriatal tras la administración de MPTP con respecto al estudio basal.

Con la finalidad de conocer si los dos grupos de animales incluidos en el estudio presentaban una disminución similar de captación de ^{18}F -fluorodopa en el estriado antes de iniciar el tratamiento, se valoró en cada grupo por separado la disminución de la constante de captación de ^{18}F -fluorodopa inducida por la intoxicación con la MPTP con respecto su estudio basal correspondiente. El análisis estadístico mostró que los dos grupos de animales tenían un grado similar de actividad AAAD estriatal antes del inicio tratamiento con levodopa o placebo, lo que sugiere que ambos grupos de animales tenían un grado de denervación dopaminérgica nigroestriada similar (Grupo 1: pérdida de k_i estriado $25,65 \pm 17,27\%$, pérdida de k_i caudado $31 \pm 24,23\%$, pérdida de k_i putamen anterior $19,67 \pm 24,29\%$,

pérdida de ki putamen posterior $27,77 \pm 20,5\%$; Grupo 2: pérdida de ki estriado $33,93 \pm 24,85\%$, pérdida de ki caudado $25,12 \pm 27,71\%$, pérdida de ki putamen anterior $33,09 \pm 22,76\%$, pérdida de ki putamen posterior $46,32 \pm 32,32\%$).

2.3. Efecto del placebo y de la levodopa sobre la captación estriatal de ^{18}F -fluorodopa

A todos los animales se les realizaron estudios de PET con ^{18}F -fluorodopa 11 meses después de la administración de placebo o levodopa, y también al cabo de 1, 3 y 6 meses de haber interrumpido el tratamiento. Para analizar los datos de los estudios de neuroimagen se procedió primero a calcular por separado en cada grupo de animales, el porcentaje de variación de la ki de los PET tras el tratamiento y durante el periodo de lavado con respecto al estudio realizado tras concluir la administración de la MPTP. Ello permite valorar el posible efecto farmacológico de la levodopa o del placebo sobre la captación de ^{18}F -fluorodopa del estriado denervado (Tablas 7 y 8).

2.3.1. Análisis de la variación de la constante de captación de ^{18}F -fluorodopa dentro de cada grupo experimental

Para conocer si el tratamiento con levodopa o placebo inducía cambios de la ki estriatal se comparó, en cada grupo experimental, la ki del estriado y de sus distintas regiones (caudado, putamen anterior y posterior) de los PET MPTP con las ki de los PET obtenidas tras finalizar el tratamiento (Tabla 8, Figura 6). El impacto del lavado farmacológico se analizó comparando las ki de los PET tras tratamiento con las ki de los PET realizados al cabo de 1, 3 y 6 meses de interrumpir el tratamiento.

Grupo placebo

En el grupo placebo la mediana del porcentaje de variación de la ki estriatal del PET tras 11 meses de tratamiento fue de $-4,54\%$ (caudado: $2,38\%$; putamen anterior: $-2,10\%$; putamen posterior: $-8,08\%$). El porcentaje de variación de la ki estriatal al mes de haber suspendido el tratamiento (PET de lavado 1) con respecto al PET MPTP fue de $-3,76\%$ (caudado: $8,71$; putamen anterior: $-5,24$; putamen posterior: $-15,16$). Al cabo de 3 meses de haber suspendido el tratamiento (PET de lavado 2) el porcentaje de variación de la ki estriatal del PET con respecto al PET

Tabla 7. Valores de la k_i de los estudios de PET con ^{18}F -fluorodopa realizados a lo largo del estudio experimental a los dos grupos de animales

	PET basal	PET MPTP	PET tratamiento	PET lavado 1	PET lavado 2	PET lavado 3
Grupo MPTP + placebo						
Estriado	11,76 (10,18; 12,58)	7,84 (6,83; 10,02)	8,44 (6,93; 9,68)	8,18 (6,02; 11,57)	6,87 (6,10; 9,29)	7,09 (6,19; 9,65)
Caudado	11,39 (9,51; 12,74)	7,51 (6,01; 8,98)	6,43 (5,77; 9,29)	7,23 (5,25; 11,80)	5,95 (5,15; 8,62)	7,53 (6,31; 10,56)
Putamen ant	12,60 (11,33; 13,70)	9,05 (8,27; 11,61)	10,88 (8,56; 11,63)	10,51 (7,95; 12,13)	8,59 (7,45; 10,38)	6,91 (6,08; 9,86)
Putamen post	10,09 (9,13; 11,75)	7,18 (5,58; 9,60)	7,65 (6,36; 9,05)	7,89 (5,47; 9,89)	5,90 (5,16; 8,98)	6,72 (6,32; 8,35)
Grupo MPTP + levodopa						
Estriado	9,34 (8,75; 10,14)	6,61 (4,51; 8,04)	7,52 (6,52; 9,00)	8,91 (8,36; 9,56)	8,64 (7,53; 9,96)	6,83 (5,98; 8,29)
Caudado	9,89 (8,70; 11,46)	7,86 (5,49; 9,50)	8,07 (7,64; 9,02)	8,70 (8,25; 9,67)	9,22 (7,83; 9,84)	7,75 (6,44; 9,19)
Putamen ant	10,09 (8,83; 11,67)	7,59 (5,23; 8,57)	7,78 (7,17; 9,00)	10,44 (9,63; 10,55)	10,38 (9,35; 11,33)	7,29 (5,97; 8,82)
Putamen post	9,04 (8,10; 9,55)	5,05 (2,27; 7,63)	5,65 (4,26; 7,66)	6,56 (6,12; 7,08)	6,18 (5,23; 8,90)	6,47 (5,61; 7,62)

Nota: Los datos son expresados en mediana (primer cuartil; tercer cuartil).

Tabla 8. Porcentaje de variación de la ki con respecto al estudio de PET MPTP en cada uno de los dos grupos experimentales

	PET tratamiento	PET lavado 1	PET lavado 2	PET lavado 3
Grupo MPTP + placebo				
Estriado	-4,54 (-14,86; 15,58)	-3,76 (-23,00; 34,45)	-11,43 (-22,04; 5,23)	-8,29(-21,15; 8,77)
Caudado	2,38 (-14,37; 18,85)	8,71(-30,06; 68,07)	-8,64 (-31,39; 21,12)	16,58 (-7,50; 38,26)
Putamen ant	-2,10 (-20,77; 29,07)	-5,24 (-12,53; 16,86)	-10,03 (-14,27; -5,16)	-16,56 (-28,72; -12,58)
Putamen post	-8,08 (-11,88; 24,95)	-15,16 (-23,79; 41,95)	-8,04 (-27,47; 15,49)	-0,56 (-18,42; 21,74)
Grupo MPTP + levodopa				
Estriado	18,23 (11,70; 55,12)	27,88 (12,79; 121,55)	36,65 (8,40; 112,32)	8,26 (2,73; 42,93)
Caudado	6,47 (-8,85; 55,38)	11,32 (1,97; 62,82)	16,11 (-12,17; 82,40)	-1,96 (-7,24; 30,89)
Putamen ant	13,03 (0,72; 57,95)	27,86 (22,51; 114,86)	28,39 (23,21; 122,48)*	2,66 (-4,06; 30,60)*
Putamen post	29,59 (-0,40; 114,77)	40,00 (-6,66; 238,41)	65,26 (0,56; 232,30)	39,41 (0,57; 205,93)

Nota: Los datos son expresados en mediana (primer cuartil; tercer cuartil). El * representa una diferencia significativa (p= 0,027) entre los animales tratados con levodopa comparado con el grupo placebo mediante el test U-Mann-Whitney.

MPTP fue de -11,43% (caudado: -8,64; putamen anterior: -10,03; putamen posterior: -8,04). Por último, el porcentaje de variación de la ki estriatal del PET realizado a los 6 meses de haber suspendido el tratamiento (PET lavado 3) con respecto al PET MPTP fue de -8,29% (caudado: 16,58; putamen anterior: -16,56; putamen posterior: -0,56). Al comparar los valores de los estudios de PET tras tratamiento y los del lavado farmacológico con respecto al PET MPTP no se observaron diferencias significativas en la captación de ^{18}F -fluorodopa estriatal ni tampoco en ninguna de sus regiones. Tampoco se observaron variaciones significativas al comparar entre sí los valores de los estudios de PET obtenidos tras tratamiento y lavado. Es decir, en el grupo placebo la ki estriatal inducida por la MPTP no se modificó a lo largo del tratamiento en ninguna de las regiones estriatales analizadas. Por otro lado, la comparación entre sí de los valores de las ki del caudado, putamen anterior y posterior obtenidos en cada uno de los estudios de PET no mostró diferencias significativas.

Grupo tratado con levodopa

En el grupo tratado con levodopa la mediana del porcentaje de variación de la ki estriatal del PET tras 11 meses de tratamiento con respecto al estudio del PET MPTP fue de 18,23% (caudado 6,47; putamen anterior: 13,03; putamen posterior: 29,59). En este mismo grupo de animales, la variación de la ki estriatal del PET de lavado 1 con respecto al PET MPTP fue de 27,88% (caudado: 11,32%; putamen anterior: 27,86%; putamen posterior: 40%). La variación de la ki estriatal del PET de lavado 2 con respecto al PET MPTP fue de 36,65% (caudado: 16,11%; putamen anterior: 28,39 %; putamen posterior: 65,26%) y la del PET de lavado 3 de 8,26% (caudado: -1,96 %; putamen anterior 2,66 %; putamen posterior: 39,41%). Al comparar los valores de los estudios de PET tras tratamiento y los del periodo de lavado farmacológico con los PET MPTP no se observaron variaciones significativas de la captación de ^{18}F -fluorodopa ni en el estriado en su conjunto ni en ninguna de las regiones estriatales analizadas. Tampoco se observaron diferencias significativas al comparar entre sí los valores de ki de los estudios de PET tras tratamiento y lavado farmacológico. Es decir, al igual que se observó en el grupo tratado con placebo, el tratamiento con levodopa no modificó la ki estriatal inducida por MPTP. Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se

compararon entre sí las variaciones de la ki del caudado, putamen anterior y posterior en cada uno de los estudios de PET.

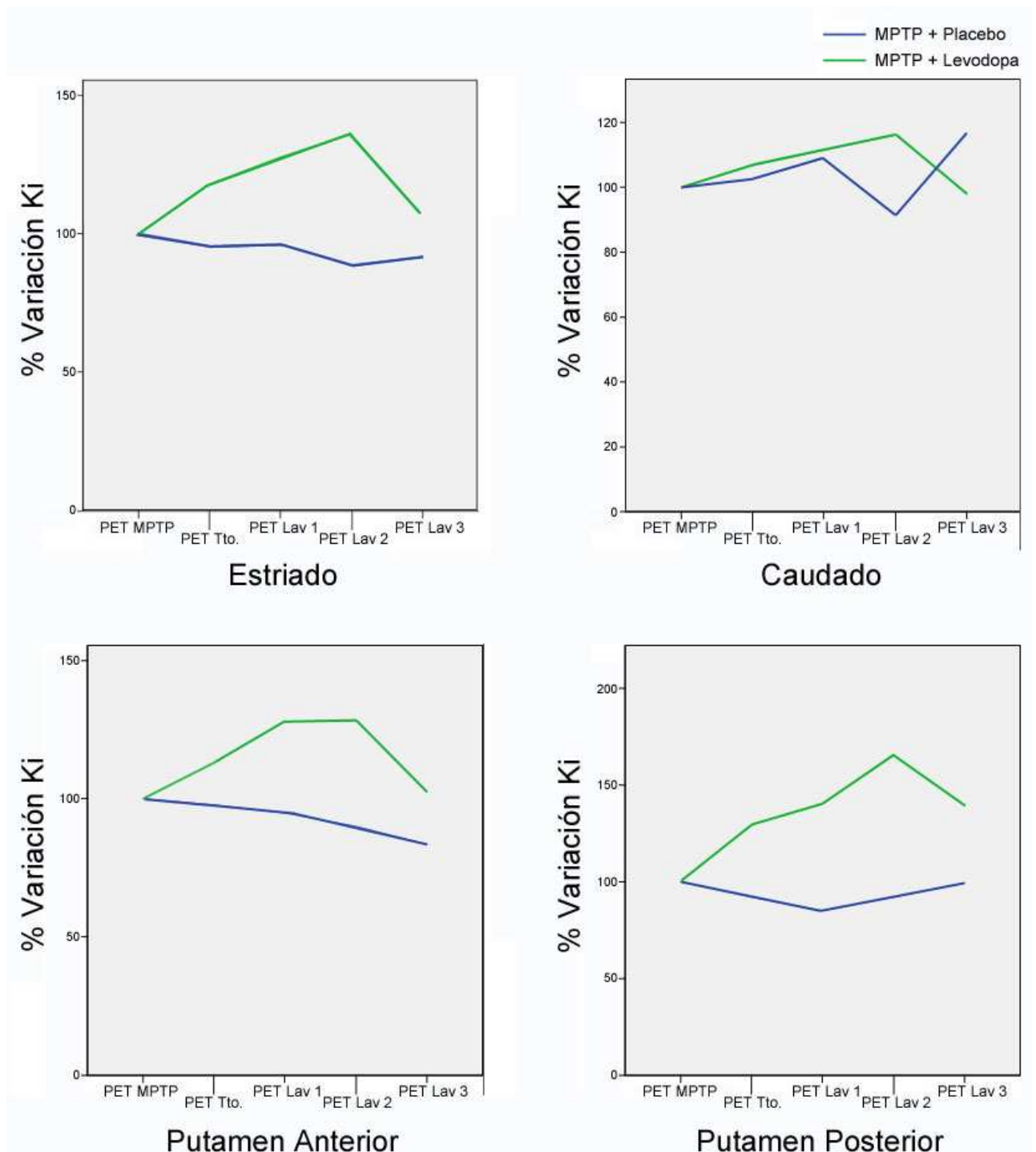


Figura 6. Variación de la mediana de la ki en el estriado y en sus distintas regiones (caudado, putamen anterior y putamen posterior) con respecto al estudio de PET MPTP en el grupo placebo y el tratado con levodopa. Tto. : tratamiento; Lav: lavado.

En **resumen**, el análisis de los resultados muestra que ninguno de los dos tratamientos ni tampoco el tiempo de lavado farmacológico, modificó la ki estriatal del PET MPTP. Tampoco se observaron diferencias significativas al comparar la ki de las distintas regiones del estriado entre sí en cada uno de los estudios de PET.

2.3.2. Análisis comparativo entre los dos grupos experimentales de la variación de la constante de captación de ^{18}F -fluorodopa

Al cabo de 11 meses de tratamiento, en el grupo tratado con levodopa el porcentaje de variación de la mediana de la ki estriatal con respecto al estudio PET MPTP fue del 18,23%, mientras que en el grupo placebo fue del -4,54%. En el análisis por regiones se observó que en el grupo tratado con levodopa la variación de la ki del caudado fue del 6,47% y en el grupo placebo del 2,38%; en el putamen anterior fue del 13,03% en el grupo tratado con levodopa y del -2,10% en el grupo placebo. Finalmente en el putamen posterior la variación de la ki fue del 29,59% en el grupo tratado con levodopa y del -8,08% en el grupo placebo. No se observaron diferencias significativas al comparar los valores obtenidos en el grupo tratado con levodopa con respecto a los valores del grupo placebo. Es decir, el tratamiento con levodopa o placebo durante 11 meses tiene un impacto similar sobre la captación de ^{18}F -fluorodopa estriatal.

Al comparar el estudio de PET de lavado 1 con el PET tras la administración de MPTP se observó que en el grupo tratado con levodopa el porcentaje de variación de la mediana de la ki estriatal fue del 27,88%, mientras que en el grupo placebo fue del -3,76%. En el caudado la variación de la ki en el grupo tratado con levodopa fue del 11,32% y en el grupo placebo de 8,71%; en el putamen anterior fue del 27,86% en el grupo tratado con levodopa y del -5,24% en el grupo placebo. Finalmente, en el putamen posterior la variación de la ki fue del 40% en el grupo tratado con levodopa y del -15,16% en el grupo placebo. No se observaron diferencias significativas cuando se compararon los valores de la ki del grupo tratado con levodopa con respecto al grupo placebo. Es decir, el periodo de un mes de lavado farmacológico de placebo o levodopa afectó por igual a la captación estriatal de ^{18}F -fluorodopa.

Al cabo de 3 meses de haber interrumpido el tratamiento (PET de lavado 2) las variaciones de la ki estriatal con respecto al PET MPTP fueron del 36,65% en el grupo tratado con levodopa y del -11,43% en el grupo placebo. En el caudado, la variación de la ki fue del 16,11% en el grupo tratado con levodopa y del -8,64% en el grupo placebo; en el putamen anterior la variación de la ki fue del 28,39% en el grupo tratado con levodopa y del 10,03 % en el grupo placebo. Finalmente, en el putamen posterior la variación de la ki fue del 65,26% y del -8,04%, en los grupos tratados con levodopa y placebo, respectivamente. El análisis estadístico utilizando el test de U-Mann-Whitney mostró un aumento significativo ($p=0,027$) de la captación de ^{18}F -fluorodopa en el putamen anterior en el estudio de PET de lavado 2 del grupo tratado con levodopa con respecto al grupo placebo. Es decir, el tratamiento con levodopa incrementa la captación estriatal de ^{18}F -fluorodopa al cabo de 3 meses de haber interrumpido el tratamiento.

Por último, al comparar el estudio de PET de lavado 3 con el PET MPTP se observó que la variación de la ki estriatal fue del 8,26% en el grupo tratado con levodopa, mientras que en el grupo placebo fue del -8,29%. En el caudado la variación de la ki fue del -1,96% en el grupo tratado con levodopa y del 16,58% en el grupo placebo; en el putamen anterior la variación de la ki en el grupo tratado con levodopa fue del 2,66% y del -16,56 % en el grupo placebo. Finalmente, en el putamen posterior la variación de la ki fue del 39,41%, en el grupo tratado con levodopa y del -0,56% en el tratado con placebo. En este caso, el análisis estadístico utilizando el test de U-Mann-Whitney también mostró un aumento significativo ($p=0,027$) de la captación de ^{18}F -fluorodopa en el putamen anterior del grupo tratado con levodopa con respecto al grupo placebo.

Por lo tanto, se puede **concluir** que en el grupo tratado con levodopa la variación de la ki de los estudios de PET tras el tratamiento y durante el periodo de lavado farmacológico indica que existe una tendencia a que se incremente la captación de ^{18}F -fluorodopa con respecto al grupo placebo, tanto en el conjunto del estriado como en sus distintas regiones, especialmente en el putamen anterior y posterior (Tabla 8; Figura 6). Sin embargo, el análisis estadístico únicamente mostró un aumento significativo ($p=0,027$) de la captación de ^{18}F -fluorodopa en el putamen

anterior del grupo tratado con levodopa con respecto al grupo placebo en los estudios de PET realizados a los 3 y 6 meses de interrumpido el tratamiento. Este hallazgo muestra que la levodopa aumenta la actividad de la enzima AAAD a largo plazo, que persiste incluso 6 meses después de su interrupción.

2.3.3. Análisis de imagen mediante SPM del efecto de la levodopa sobre la captación de ¹⁸F-fluorodopa

El análisis mediante SPM de la imagen de los estudios de PET se realizó con las imágenes de PET obtenidas tras el tratamiento y las imágenes PET de los estudios de lavado farmacológico de 1, 3 y 6 meses. Las comparaciones se realizaron intra y entre grupos. Por ejemplo, se compararon los PET de tratamiento con respecto a los PET de lavado en el grupo tratado con levodopa y en el grupo placebo por separado. Además cada uno de los estudios de PET se comparó con el correspondiente del otro grupo experimental. No se pudieron establecer diferencias significativas ($p < 0,05$) en la captación de ¹⁸F-fluorodopa dentro de cada grupo o entre los dos grupos experimentales

Resumen de los resultados de neuroimagen

Nuestros resultados indican que la administración de la MPTP reduce de forma significativa y homogénea la captación estriatal de ¹⁸F-fluorodopa, siendo de igual intensidad en el caudado que en el putamen. Esta disminución de captación de ¹⁸F-fluorodopa estriatal permanece estable al menos 18 meses después de haber interrumpido la administración de la neurotoxina. Por otro lado, la administración de levodopa durante 11 meses o un lavado farmacológico de 6 meses tampoco modifica la captación de ¹⁸F-fluorodopa estriatal en ninguna de las regiones estriatales examinadas. Sin embargo, los animales que reciben levodopa muestran una k_i significativamente superior en el putamen anterior en los PET realizados tras 3 y 6 meses de lavado farmacológico.

3. Análisis cuantitativo de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc

Con la finalidad de conocer la pérdida neuronal dopaminérgica, se realizó una estimación estereológica del número total de células TH-ir en la SNpc de ambos grupos de animales y de un grupo control. En los animales intactos el número total de neuronas dopaminérgicas fue de 260.256 ± 3.236 , en el grupo de animales tratados con la MPTP y placebo el número de neuronas dopaminérgicas fue de 155.672 ± 16.672 y en el grupo de monos tratados con la MPTP y levodopa se contabilizaron 146.577 ± 3.236 células TH-ir, lo que supone una reducción con respecto al grupo control de un 41% en el grupo placebo, y de un 44%, en el grupo tratado con levodopa (Figura 7). Esta reducción del número de neuronas TH-ir fue significativa con respecto al grupo control ($p=0,03$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas cuando se compararon entre sí el número de neuronas dopaminérgicas de los animales tratados con levodopa con el número de neuronas dopaminérgicas de los animales tratados con placebo (Figura 8). Esto indica que el tratamiento crónico con levodopa no modifica la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.

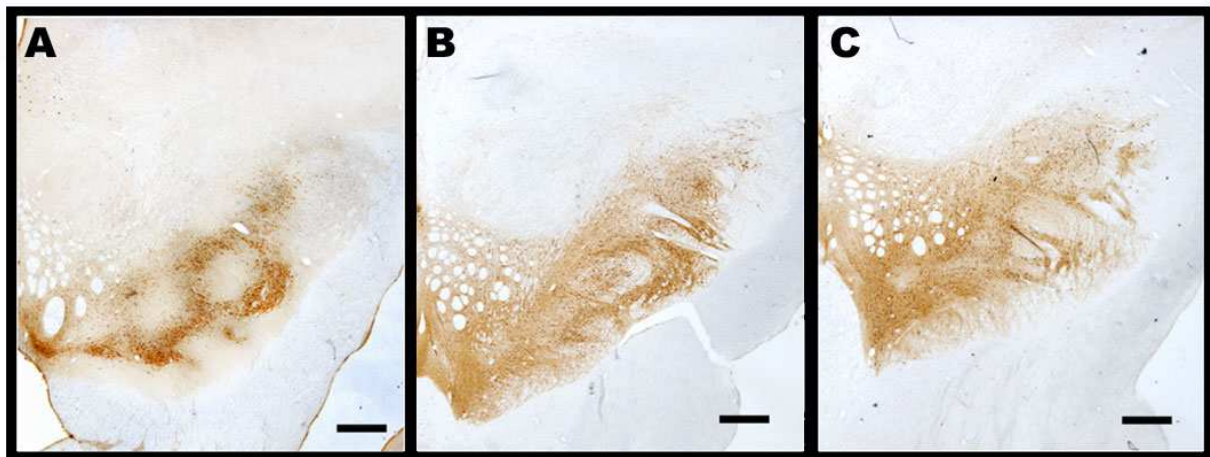


Figura 7. Secciones coronales de la SN de un animal de cada grupo experimental teñidas con inmunohistoquímica para TH en un mono control (A), un mono del grupo tratado con MPTP y placebo (B) y de un animal del grupo tratado con MPTP y levodopa (C). Se observa una ligera disminución de inmunoreactividad frente a TH en B y C con respecto al control (A). Escala de la barra: 1 mm.

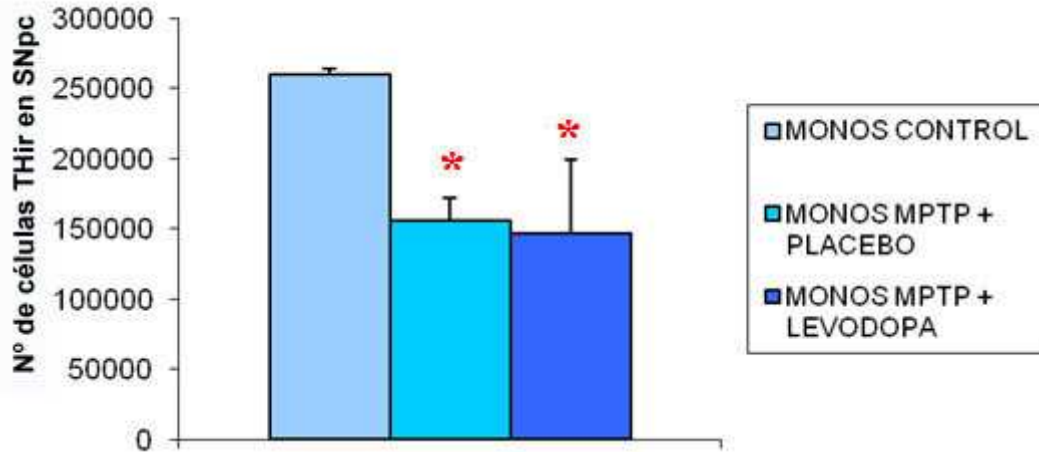


Figura 8. Número de células dopaminérgicas en la SNpc de los distintos grupos experimentales. Los dos grupos experimentales tienen el mismo número de células dopaminérgicas en la SNpc y en ambos grupos la reducción con respecto al grupo control fue de un 40% aproximadamente. * $p=0,03$ con respecto al grupo control.

4. Análisis cuantitativo de las células TH-ir estriatales

La identificación de las células TH-ir estriatales se realizó sobre secciones de estriado precomisural teñidas con inmunocitoquímica para TH y contrastadas con Nissl (Figura 9). Sólo se cuantificaron aquellas estructuras TH-ir que contenían un núcleo teñido. Esto permite obviar estructuras TH-ir redondeadas que pueden corresponder a prolongaciones dopaminérgicas rotas.

4.1. Descripción de la morfología de las neuronas TH-ir del estriado

En todos los grupos experimentales, la mayoría de las células TH-ir fueron neuronas bipolares de pequeño tamaño no espinosas con un soma redondeado u ovalado (Figura 9). Como previamente hemos descrito en otros trabajos, observamos que estas células son más abundantes en la región rostro-dorsal del caudado y del putamen (210). En este trabajo no se realizó un estudio detallado de la morfología de las células TH-ir del estriado que contemplase el diámetro o el área del soma neuronal, ya que no era objeto de este estudio. Tampoco se ha realizado una caracterización fenotípica de las mismas mediante técnicas de doble inmunofluorescencia con diferentes anticuerpos.

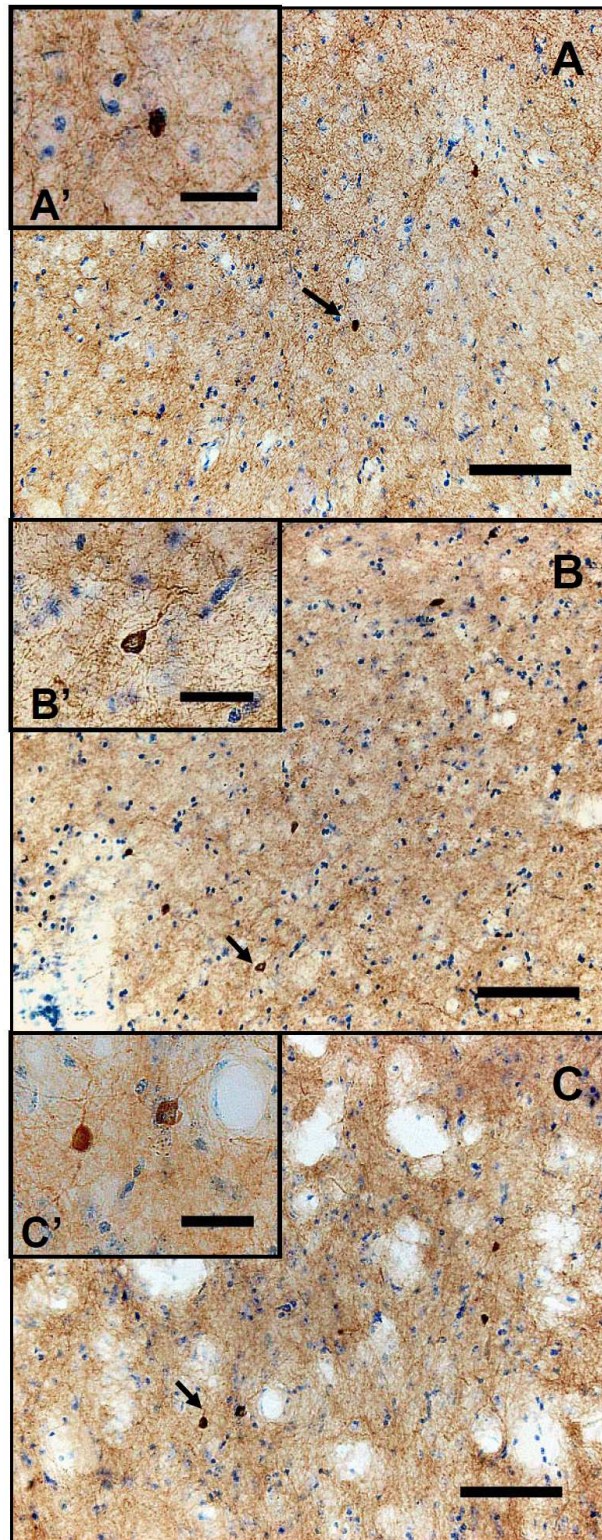


Figura 9. Secciones coronales de estriado anterior teñidas con Nissl e inmunocitoquímica con TH de un mono control (A), un mono tratado con MPTP y placebo (B) y un macaco tratado con MPTP y levodopa (C) en las que se observan las células TH-ir intrínsecas del estriado. Se observa un ligero incremento del número de estas neuronas en el animal que recibió tratamiento con levodopa (C). Las flechas indican las neuronas TH-ir de cada uno de los animales que se muestran a mayor aumento (A', B' y C'). La escala de la barra de A-C muestra 100 μm y la de A'-C', 30 μm .

4.2. Cuantificación de las neuronas TH-ir del estriado de los distintos grupos experimentales

La cuantificación de las células TH-ir del estriado precomisural se realizó dividiendo esta estructura en una región anterior y una región posterior. Los datos que se detallan a continuación muestran tanto la densidad de células TH-ir de las regiones anterior y posterior del estriado precomisural, como la densidad celular de todo el estriado precomisural, es decir, la media de las cifras anteriores. Posteriormente, dentro de cada grupo experimental se realizaron comparaciones entre la región anterior y posterior del estriado precomisural. Así mismo, se comparó la densidad celular del estriado precomisural, globalmente, y de las regiones anterior y posterior del mismo, entre los distintos grupos experimentales.

En los monos control, la densidad de células TH-ir en el estriado precomisural fue de $41,1 \pm 11,8$ células/100 mm², con un valor de $47,7 \pm 13,6$ células/100 mm² en la región anterior y de $33,6 \pm 8,5$ células/100 mm² en la región posterior. En el estriado precomisural del grupo de los animales tratados con placebo, el número de neuronas TH-ir fue $62,1 \pm 13,5$ células/100 mm² (estriado precomisural anterior: $72,5 \pm 24,9$ células/100 mm²; estriado precomisural posterior: $52,1 \pm 10,6$ células/100 mm²). Por último, en el estriado precomisural de los animales tratados con levodopa, la densidad de neuronas TH-ir fue de $84 \pm 9,2$ células/100 mm² (estriado precomisural anterior: $97 \pm 11,8$ células/100 mm²; estriado precomisural posterior: $65,4 \pm 8,4$ células/100 mm²) (Tabla 9). En cada uno de los grupos se analizó si existían diferencias en la densidad celular entre la región anterior y posterior del estriado precomisural. Únicamente en el grupo de monos tratados con levodopa se observó una densidad de neuronas TH-ir significativamente mayor en la región anterior del estriado precomisural que en la región posterior ($p=0,021$). En el resto de los animales, el número de células TH-ir fue similar en el estriado precomisural anterior que en el posterior.

Así mismo, se comparó la densidad de neuronas dopaminérgicas estriatales entre los tres grupos experimentales. La densidad de células TH-ir en la región posterior del estriado precomisural del grupo de animales tratados con MPTP y placebo fue significativamente mayor que la del grupo control ($p=0,03$). En el

estriado precomisural y en su porción anterior se observó una tendencia a una mayor densidad de neuronas TH-ir ($p=0,07$), sin alcanzar significación estadística. En los animales tratados con levodopa encontramos una mayor densidad de células TH-ir con respecto al control, tanto en el estriado precomisural globalmente, como al analizar por separado la región anterior y posterior del mismo ($p=0,03$). Por otra parte, se objetivó una mayor densidad de neuronas dopaminérgicas en el estriado precomisural de los animales del grupo tratado con levodopa que en los animales del grupo placebo ($p=0,04$) (Figura 10).

Por lo tanto, se puede **establecer** que el grupo de animales tratados con MPTP y posteriormente levodopa es el grupo con mayor densidad de neuronas TH-ir estriatales precomisurales, seguido del grupo tratado con MPTP y placebo y, finalmente, el grupo control.

Tabla 9. Cuantificación de las células TH inmunorreactivas del estriado (células TH-ir por 100 mm^2) en los diferentes grupos experimentales

	Densidad de células TH-ir Est	Densidad de células TH-ir EstA	Densidad de células TH-ir EstP
Grupo control	41,1±11,8	47,7±13,6	33,6±8,5
Grupo MPTP + placebo	62,1±13,5	72,5±24,9	52,1±10,6*
Grupo MPTP + levodopa	84±9,2*#	97±11,8*	65,4±8,4*

Est: estriado; EstA: región anterior del estriado precomisural; EstP: región posterior del estriado precomisural; TH-ir: tirosina hidroxilasa inmunorreactiva. Nota: Los datos se muestran como media \pm desviación estándar. * $p=0,03$ con respecto al grupo control. # $p=0,04$ con respecto al grupo placebo.

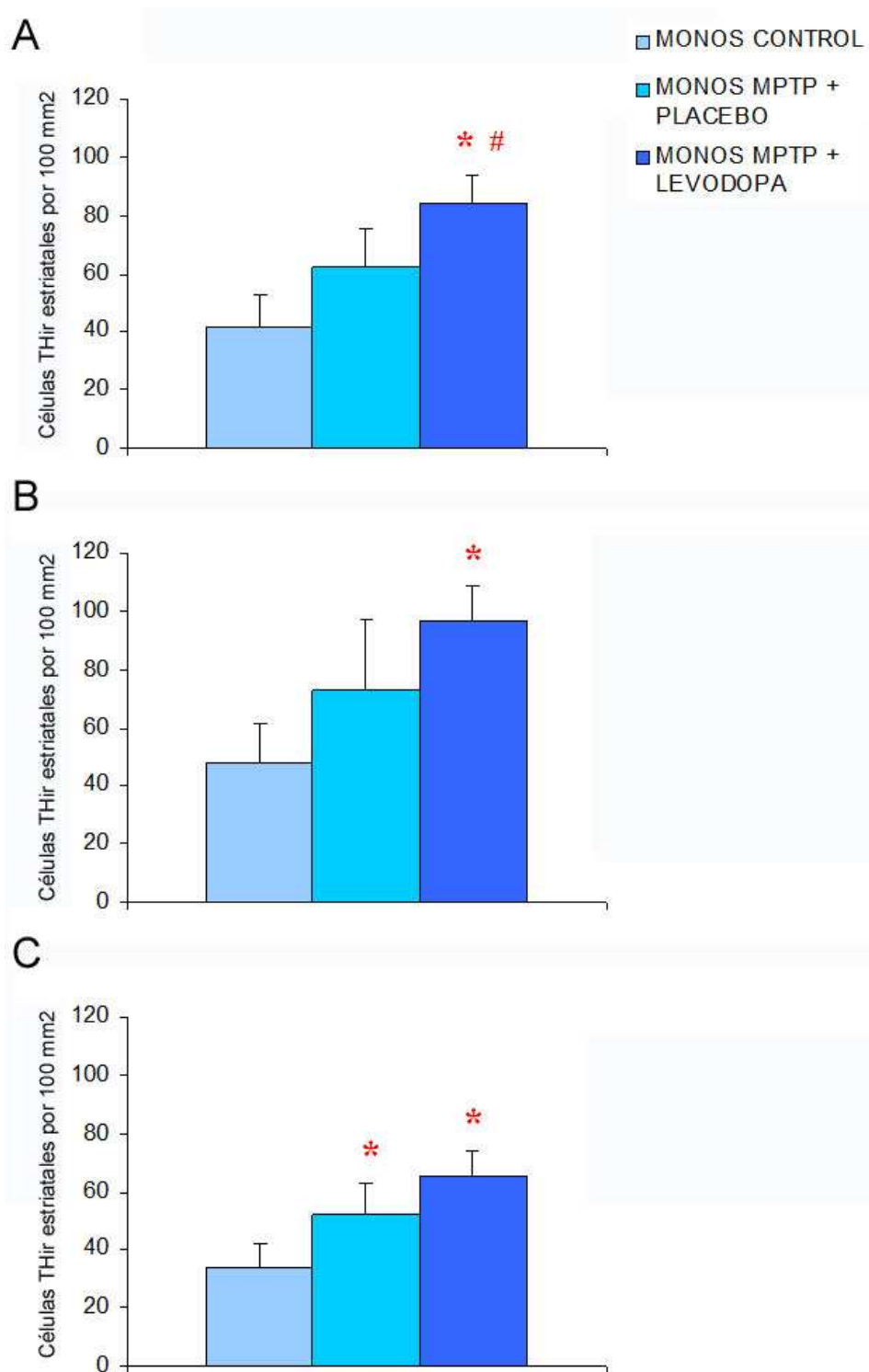


Figura 10. Densidad de células TH-ir en el estriado precomisural (A), región anterior del estriado precomisural (B) y región posterior del estriado precomisural (C) en los distintos grupos de animales estudiados. * $p=0,03$ con respecto al grupo control; # $p=0,04$ con respecto al grupo placebo.

5. Cuantificación de las proteínas dopaminérgicas presinápticas

En los tres grupos de animales se realizó una determinación cuantitativa de las proteínas presinápticas estriatales TH, DAT y AAAD mediante *Western blot*. En todos los grupos de animales las determinaciones se realizaron de forma independiente en el caudado, putamen anterior y putamen posterior. La cantidad de proteína obtenida se expresó en unidades arbitrarias de escaneado, aunque para facilitar su comparación se procedió a calcular la cantidad de proteína de cada uno de los grupos experimentales con respecto al grupo control (Tabla 10). Los datos se expresan como porcentaje de variación con respecto al grupo control.

5.1. Cuantificación de la TH

La administración de MPTP indujo una reducción significativa de los niveles de TH en el caudado y putamen anterior ($40,8 \pm 10,9\%$ y $47,5 \pm 20,6\%$, respectivamente; $p=0,03$). En el putamen posterior los niveles de TH no mostraron diferencias significativas con respecto a los controles, aunque presentaron un ligero incremento ($143,3 \pm 52,5\%$). Al comparar la cantidad de proteína TH entre las distintas regiones del estriado de estos animales se observó que los niveles de TH más elevados correspondían al putamen posterior y fueron significativamente superiores a los del putamen anterior y caudado ($p=0,02$). En el grupo tratado con levodopa, los niveles de TH fueron menores que los de los animales control en todas las áreas analizadas (caudado: $43,2 \pm 19,7\%$; putamen anterior: $59,2 \pm 11,24\%$ y putamen posterior: $32,1 \pm 24,7\%$), alcanzando significación estadística solamente en el putamen anterior y posterior ($p=0,03$) y con una tendencia a disminuir en el caudado ($p=0,07$) (Figura 11). En este grupo, la disminución de TH estriatal fue similar en todas las regiones analizadas sin que se objetivaran diferencias significativas entre ellas.

Por último se compararon los niveles de TH estriatal de los animales tratados con placebo con los del grupo que recibió levodopa. La única diferencia significativa que encontramos fue en los niveles de TH del putamen posterior que fueron significativamente menores en el grupo que recibió levodopa que en los tratados con placebo ($p=0,02$) (Figura 11).

Tabla 10. Cuantificación de las proteínas dopaminérgicas presinápticas en los distintos grupos de animales de experimentación

	TH Cau	TH PutA	TH PutP	DAT Cau	DAT PutA	DAT PutP	AAAD Cau	AAAD PutA	AAAD PutP
Grupo control	1,968±0,552	1,634±0,073	6,268±1,130	2,084±0,131	1,697±0,403	7,553±1,467	0,765±0,405	0,926±0,392	3,800±0,993
Grupo MPTP + placebo	0,804±0,248* (40,8±10,9)	0,777±0,390* (47,5±20,6)	8,984±3,801# (143,3±52,5)	0,828±0,327* (39,7±13,6)	0,911±0,177* (45,8±19,9)	2,433±1,827* (32,2±20,9)	0,799±0,289 (104,5±32,7)	0,867±0,198 (93,6±18,5)	6,508±3,286 (171,2±74,8)
Grupo MPTP + levodopa	0,851±0,448 (43,2±19,7)	0,967±0,212* (59,2±11,24)	2,015±1,794* (32,1±24,7)	0,619±0,136* (29,7±5,6)	0,799±0,241* (57±10,8)	2,511±2,451* (33,2±28,1)	1,242±0,555 (162,4±62,8)	1,632±1,282 (176±119,8)	2,377±2,467 (62,5±56,2)

La cantidad de proteína se expresa en unidades arbitrarias de escaneado. Entre paréntesis aparece el porcentaje de las distintas proteínas con respecto al grupo control. Los datos se muestran como media ± desviación estándar. AAAD: aminoácido aromático decarboxilasa; Cau: caudado; DAT: transportador de dopamina; PutA: putamen anterior; PutP: putamen posterior; TH: tirosina hidroxilasa. * p=0,03 con respecto al grupo control; # p=0,02 con respecto al grupo tratado con levodopa.

En el grupo placebo se observó que los niveles de proteína TH eran significativamente superiores (p=0,02) en el putamen posterior que en el putamen anterior y el caudado.

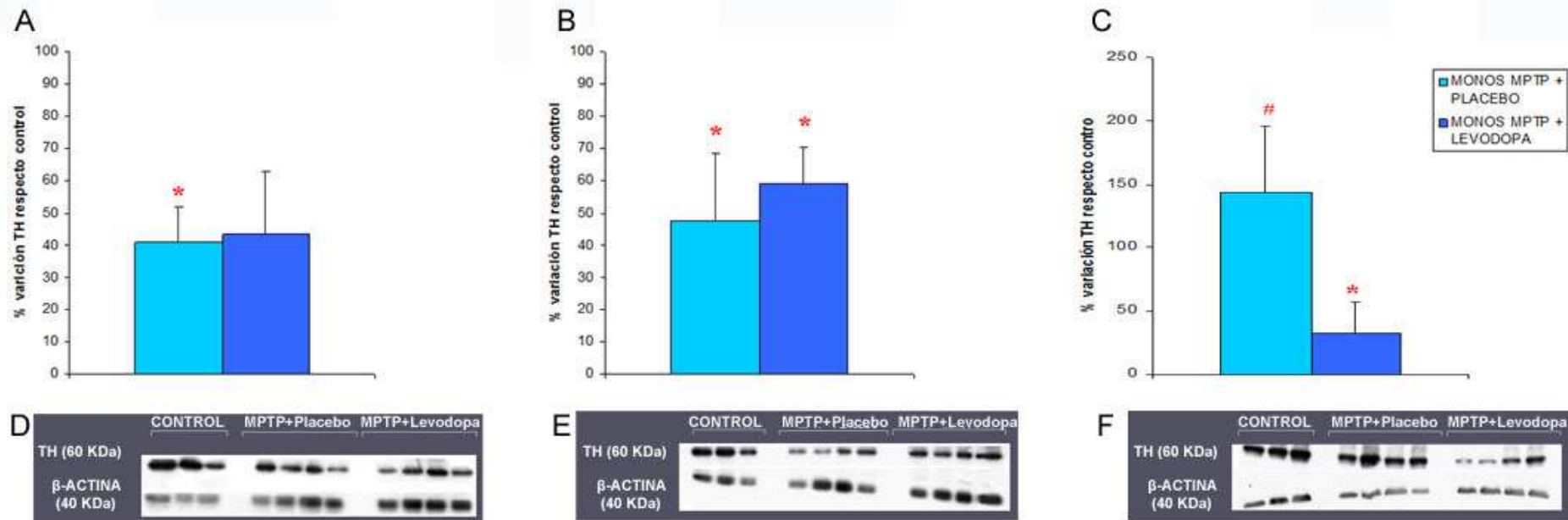


Figura 11. Porcentaje de variación con respecto a los controles de la proteína tirosina hidroxilasa (TH) en el caudado (A), putamen anterior (B) y putamen posterior (C) de los grupos placebo y levodopa con respecto al grupo control. Película de *Western blot* que muestra la banda de TH en caudado (D), putamen anterior (E) y putamen posterior (F). * $p=0,03$ con respecto al grupo control; # $p=0,02$ con respecto al grupo tratado con levodopa.

5.2. Cuantificación del DAT

Los niveles de DAT se redujeron de forma significativa en todas las áreas estriatales de los dos grupos de animales. Con respecto a los animales control, en el grupo tratado con placebo los niveles de DAT se redujeron significativamente ($p=0,03$) en todas las áreas estudiadas (caudado: $39,7\pm 13,6\%$; putamen anterior: $45,8\pm 19,9\%$; putamen posterior: $32,2\pm 20,9\%$). No se objetivaron diferencias significativas al comparar los niveles de DAT en las tres regiones estriatales estudiadas, lo que indica que el MPTP induce una disminución homogénea de DAT sin que exista un patrón rostrocaudal. En el grupo tratado con levodopa, los niveles de DAT fueron significativamente inferiores ($p=0,03$) a los de los animales control en las tres regiones estudiadas, con una reducción de $29,7\pm 5,6\%$ en el caudado, $57\pm 10,8\%$ en el putamen anterior y $33,2\pm 28,1\%$ en el putamen posterior. Al igual que en los animales tratados con placebo, la reducción de los niveles de DAT fue similar en las tres regiones estriatales estudiadas. Tampoco se encontraron diferencias significativas cuando se compararon los niveles de DAT estriatal de los animales tratados con levodopa y los obtenidos en el grupo tratado con placebo (Figura 12).

5.3 Cuantificación de la AAAD

Los valores de AAAD determinados en el estriado de los dos grupos de animales mostraron una tendencia a aumentar, pero en ningún caso alcanzaron significación estadística con respecto a los valores control. En los animales tratados con placebo el porcentaje de variación de la AAAD con respecto a los controles fue de $104,5\pm 32,7\%$ en el caudado, del $93,6\pm 18,5\%$ en el putamen anterior y del $171,2\pm 74,8\%$ en el putamen posterior. En el grupo tratado con levodopa, el porcentaje de variación de los niveles de AAAD con respecto a los controles fue de $162,4\pm 62,8\%$ en el caudado, del $176\pm 119,8\%$ en el putamen anterior y del $62,5\pm 56,2\%$ en el putamen posterior. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los valores de AAAD de los animales tratados con placebo y los obtenidos en el grupo tratado con levodopa. Tampoco se observaron diferencias significativas cuando se compararon en cada grupo los niveles de AAAD de las distintas áreas estriatales (Figura 13).

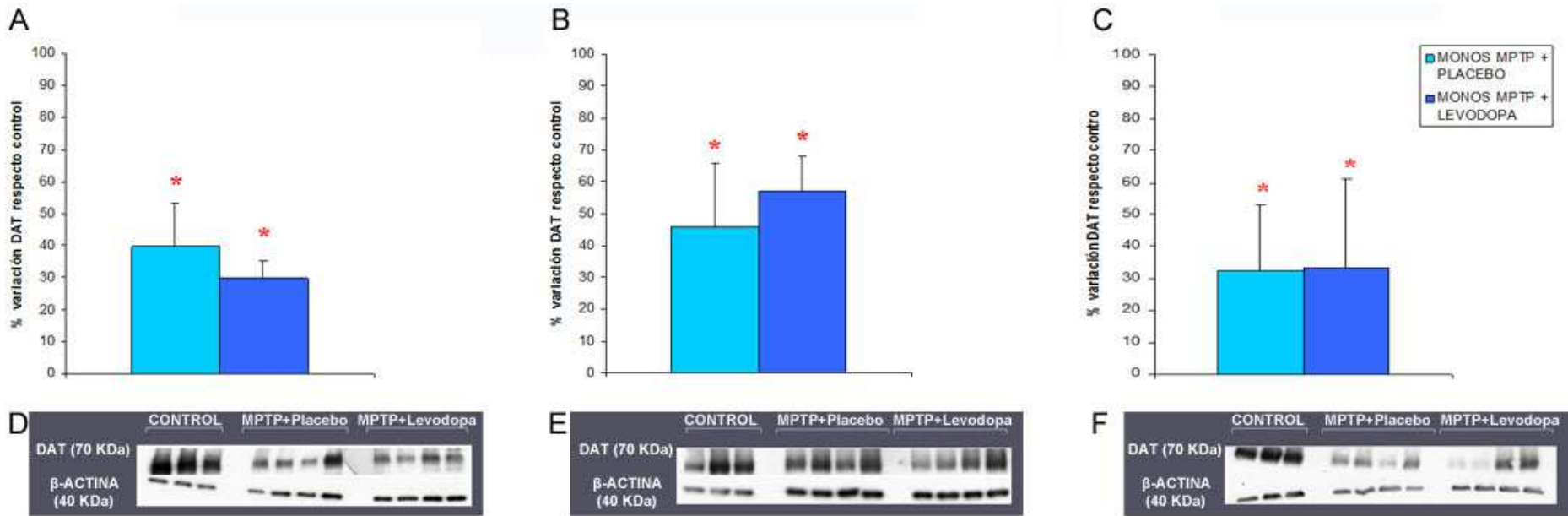


Figura 12. Porcentaje de variación con respecto a los controles del transportador de dopamina (DAT) en el caudado (A), putamen anterior (B) y putamen posterior (C) de los grupos placebo y levodopa con respecto al grupo control. Película del *Western blot* que muestra la banda de DAT del caudado (D), putamen anterior y putamen posterior (F). * $p=0,03$ con respecto al grupo control.

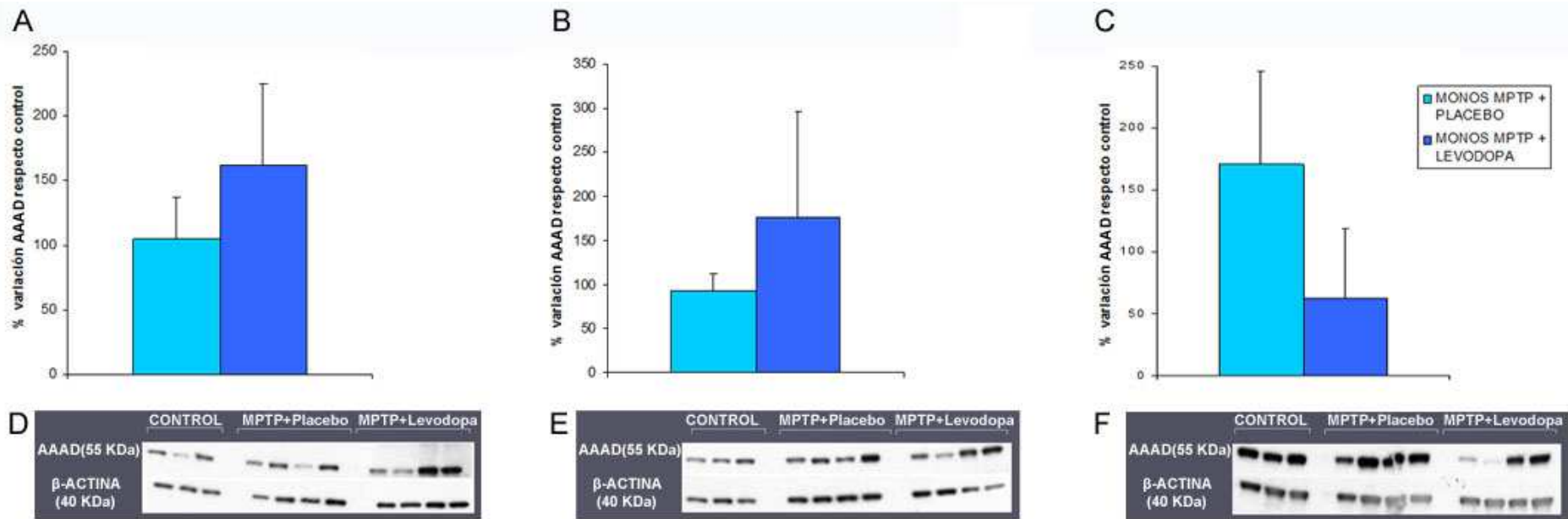


Figura 13. Porcentaje de variación de la enzima aminoácido aromático decarboxilasa (AAAD) en el caudado (A), putamen anterior (B) y putamen posterior (C) de los grupos placebo y levodopa con respecto al grupo control. Película del *Western blot* en la que se observa la banda de AAAD del caudado (D), putamen anterior (E) y putamen posterior (F).

En **resumen**, podemos concluir que la administración de la MPTP a macacos no modifica los niveles estriatales de AAAD en ninguna de las estructuras analizadas. Resulta interesante destacar que los niveles de AAAD en los animales que recibieron levodopa durante 11 meses fueron también similares a los del grupo control y a los del grupo placebo. Sin embargo, los niveles estriatales de DAT disminuyeron de forma similar en ambos grupos de animales y en todas las regiones estriatales analizadas. Finalmente los niveles estriatales de TH mostraron un patrón diferente. En los animales tratados con placebo los niveles de esta proteína se redujeron en el caudado y el putamen anterior mientras que en los animales del grupo tratado con levodopa, la reducción TH tuvo lugar en el putamen anterior y en el putamen posterior. Resulta interesante resaltar que en el grupo placebo los niveles de TH en el putamen posterior fueron significativamente superiores a los del grupo tratado con levodopa. Estos hallazgos podrían ser debidos a: 1) una modulación a la baja de la expresión de TH ejercida por la levodopa o b) que el incremento de TH del putamen posterior inducido por la MPTP es un mecanismo de compensación que desaparece al instaurar tratamiento farmacológico dopaminérgico.

6. Correlaciones entre los resultados de neuroimagen y los hallazgos *post-mortem*

Las correlaciones se realizaron utilizando un test de correlación bivariada no paramétrico (coeficiente de Spearman) que nos permitió establecer si existía algún tipo de asociación entre los hallazgos *post-mortem* y los datos de los estudios de neuroimagen.

6.1. Correlaciones entre los datos de neuroimagen y los datos histológicos

El análisis de correlación mostró una asociación positiva entre el número de neuronas dopaminérgicas supervivientes en la SNpc y el valor de la ki estriatal ($p=0,03$; $r= 0,810$), del caudado ($p=0,04$; $r= 0,810$) y del putamen posterior ($p=0,004$; $r= 0,881$). Se objetivó además una correlación positiva entre la constante de captación de ^{18}F -fluorodopa en el caudado del PET realizado a los 6 meses de

interrumpido el tratamiento con placebo y levodopa y la densidad de las células TH-ir del estriado precomisural anterior ($p=0,028$; $r=0,762$) (Figura 14).

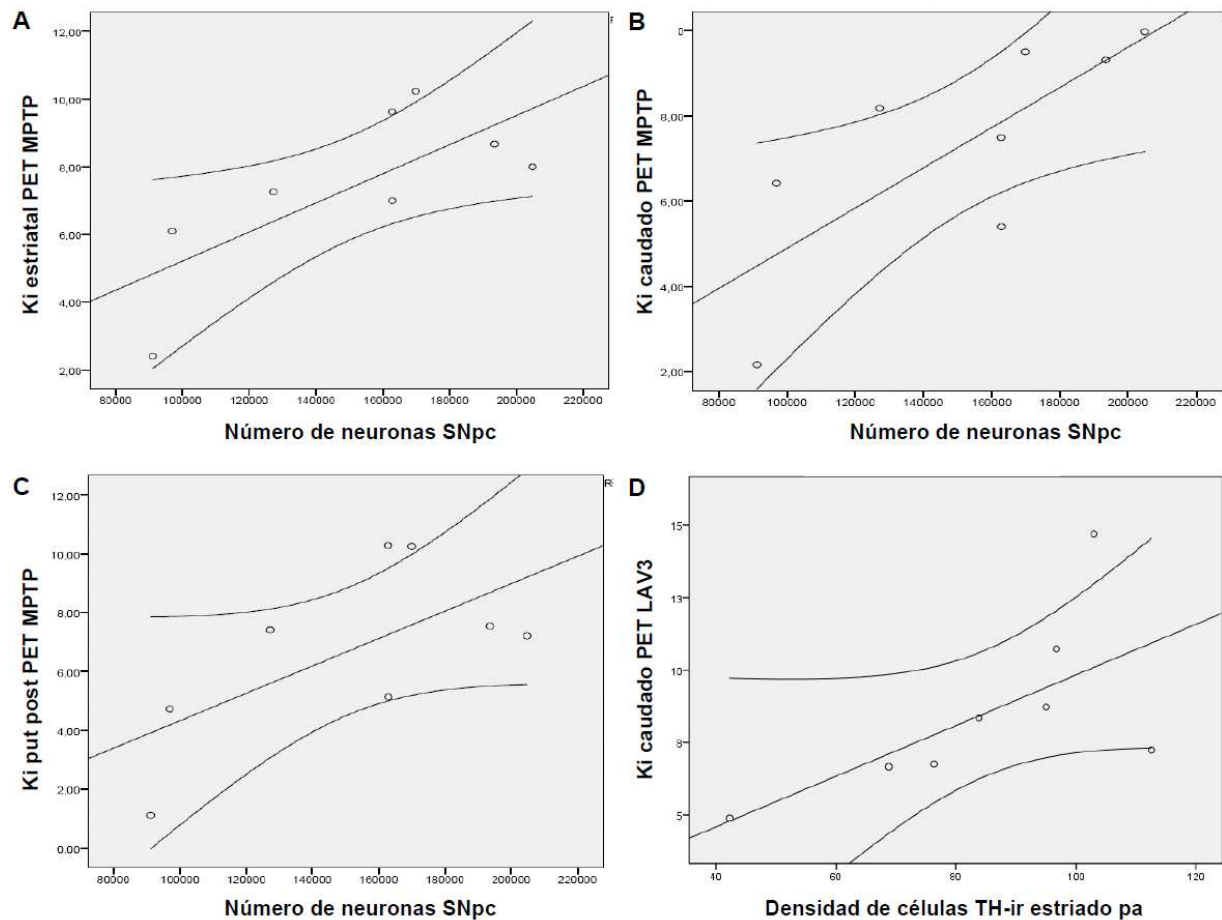


Figura 14. Gráficas que muestran las correlaciones entre los datos de neuroimagen y los histológicos. Se muestra una asociación positiva entre el número de neuronas dopaminérgicas supervivientes en la SNpc y el valor de la ki del PET tras la administración de MPTP en el estriado (A), caudado (B) y el putamen posterior (C). En la gráfica (D) se muestra la correlación positiva entre la ki del caudado del PET de lavado 3 y la densidad de las células TH-ir del estriado precomisural anterior.

LAV3: lavado 3; pa: precomisural anterior; SNpc: sustancia negra pars compacta; TH-ir: tirosina hidroxilasa inmunorreactiva.

6.2. Correlaciones entre los datos histológicos

La densidad de células TH-ir del estriado precomisural anterior se correlacionó con la disminución de la proteína TH del caudado ($p=0,026$; $r=-0,664$), mientras que la densidad de células TH-ir del estriado precomisural posterior correlacionó con la disminución de la cantidad de proteína TH del putamen anterior ($p=0,032$; $r=-0,645$). Es decir, a mayor disminución de TH estriatal, mayor número de células TH-ir en el

estriado precomisural. Por otro lado, se encontró una correlación positiva entre el número de neuronas dopaminérgicas de la SNpc y los niveles de DAT en el putamen anterior ($p=0,001$; $r=0,845$) y de TH en el caudado ($p=0,008$; $r=0,745$) y el putamen anterior ($p=0,021$; $r=0,682$). Por último, la cantidad de proteína TH del caudado se correlacionó positivamente con los niveles de DAT en el putamen anterior ($p=0,01$; $r=0,736$), mientras que la cantidad de TH en el putamen anterior correlaciona con el nivel de DAT en el caudado ($p=0,002$; $r=0,818$) y el putamen anterior ($p=0,023$; $r=0,673$) (Figura 15).

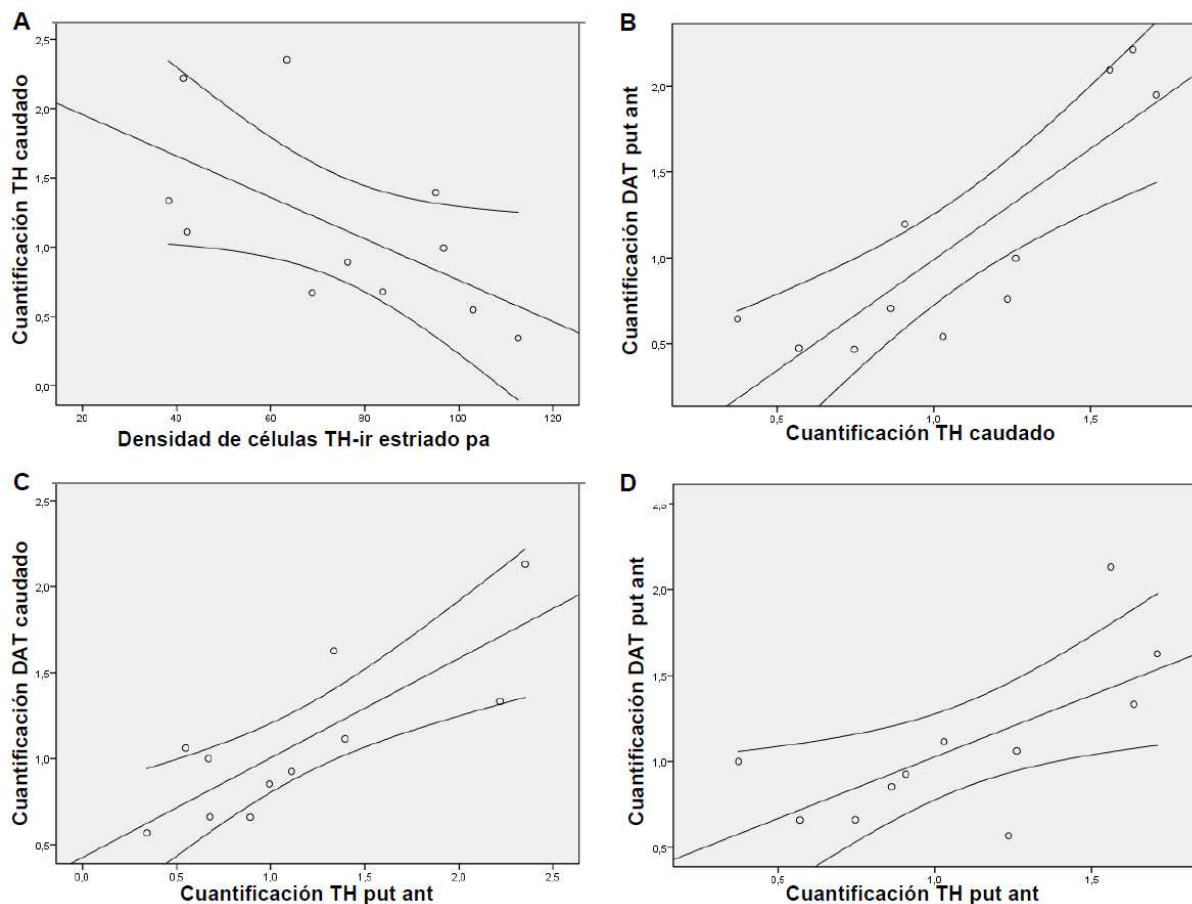


Figura 15. Gráficas que muestran las correlaciones entre los datos los histológicos. La gráfica (A) muestra una correlación negativa entre la densidad de células TH-ir del estriado precomisural anterior con la cantidad de proteína TH del caudado. La cantidad de proteína TH del caudado se correlacionó positivamente con los niveles de DAT en el putamen anterior (B), mientras que la cantidad de TH en el putamen anterior correlaciona con el nivel de DAT en el caudado (C) y el putamen anterior (D).
Ant: anterior; DAT; transportador de dopamina; pa: precomisural anterior; put: putamen; TH: tirosina hidroxilasa; TH-ir: tirosina hidroxilasa inmunorreactiva.

Discusión

En las dos últimas décadas ha habido un gran interés por conocer la utilidad de las técnicas de neuroimagen funcional en la evaluación de la actividad funcional del sistema dopaminérgico nigroestriado y su potencial aplicación como marcador biológico de la progresión de la EP [227;229]. De hecho, estas pruebas se han utilizado en diferentes ensayos clínicos para valorar el impacto de determinados compuestos sobre la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc [301;303;304;314]. No obstante, todos los ensayos clínicos realizados han utilizado fármacos con un efecto sintomático sobre la enfermedad y un efecto farmacológico directo sobre la actividad funcional de la vía dopaminérgica nigroestriada, tanto sobre la actividad DOPA-decarboxilasa (DDC) de la enzima AAAD como sobre el DAT, por lo que los resultados obtenidos han sido ampliamente cuestionados.

En el presente trabajo de tesis doctoral, se ha investigado el efecto que el tratamiento crónico con levodopa ejerce sobre la captación estriatal de ^{18}F -fluorodopa, en un modelo de EP inducido por MPTP en el macaco. Este modelo tiene la ventaja de ser un modelo no progresivo de degeneración dopaminérgica nigroestriada, por lo que los cambios de captación que observamos sólo pueden ser debidos al tratamiento, pero nunca a modificaciones en la progresión de la enfermedad. Por otra parte, los datos obtenidos en los estudios de neuroimagen funcional se han comparado con los resultados histológicos y bioquímicos *post-mortem* obtenidos en estos animales.

1. Discusión de la metodología

1.1. Modelos animales de la EP y escalas para la evaluación del parkinsonismo

Como ya se ha detallado en el apartado de la Introducción, la administración de la MPTP a monos produce un síndrome parkinsoniano que puede ser considerado actualmente como el mejor modelo experimental de la EP. Este modelo animal no sólo reproduce las lesiones neuropatológicas clásicas de la EP (pérdida celular dopaminérgica en la SNpc y depleción de dopamina en el estriado), sino que también induce los síntomas cardinales de la EP [21;98]. Sin embargo, a pesar de la gran similitud entre este modelo animal y la EP, existen una serie de limitaciones que deben tenerse en cuenta cuando se utiliza este modelo. En primer lugar, este modelo experimental es consecuencia de la acción de una neurotoxina, hecho que

no es extrapolable a la EP idiopática [315]. En segundo lugar, aunque la administración de la MPTP a monos reproduce la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc de la EP, cuando se administra de forma aguda, la denervación dopaminérgica inducida es de igual magnitud en el caudado y el putamen, patrón que es distinto al que se observa en la EP. Sin embargo, cuando la MPTP se administra de forma crónica se produce una mayor pérdida de terminales dopaminérgicas en el putamen que en el caudado, asemejándose así al patrón descrito en la EP [94]. En tercer lugar, existe una gran diferencia interindividual en la respuesta de cada animal a protocolos similares de administración de la neurotoxina [213;316]. De hecho, algunos animales pueden presentar una recuperación motora espontánea mientras que otros desarrollan un síndrome parkinsoniano severo con dosis similares de MPTP [213;214;317]. En cuarto lugar, y quizás la diferencia más importante entre las dos entidades, es el carácter progresivo de la EP mientras en el caso de parkinsonismo inducido por la MPTP la lesión nigroestriada no progresa [109]. Por último, excepto en raras ocasiones, la EP es una enfermedad asociada al envejecimiento, mientras que la mayoría de los experimentos con macacos parkinsonianos se llevan a cabo en animales jóvenes y, aunque el modelo del MPTP en el macaco es un modelo tóxico, es conocido que la sensibilidad de las neuronas dopaminérgicas a la degeneración por la MPTP es diferente en los macacos añosos que en los jóvenes [318-321]. Sin embargo, en la actualidad no es posible llevar a cabo investigaciones como las presentadas en este trabajo con macacos viejos.

En este trabajo de investigación se ha utilizado un patrón crónico de administración de la MPTP a dosis bajas y repetidas. De esta forma, los animales presentaron un síndrome parkinsoniano leve, como lo demuestran sus escalas de incapacidad motora que en ninguno de los casos superó el valor de 8. Esta pauta de administración tiene ventajas pero también algunos inconvenientes. La mayor ventaja de este protocolo de administración es que induce una pérdida moderada de neuronas dopaminérgicas en la SNpc, lo que permite evaluar sin dificultad los cambios que el tratamiento con placebo o levodopa pueden inducir en la captación estriatal de ^{18}F -fluorodopa. Además, los animales desarrollan un síndrome parkinsoniano muy leve, lo que garantiza que puedan alimentarse por ellos mismos sin necesitar tratamiento dopaminérgico durante la fase de inducción del

parkinsonismo. Una ventaja adicional es que este modelo podría considerarse como una fase inicial de la EP, y es precisamente en estos sujetos donde se podrían utilizar las técnicas de neuroimagen para medir la progresión de la enfermedad. Por último, la no progresión del modelo de parkinsonismo inducido por la MPTP frente a la EP permite evaluar de forma exclusiva el efecto de una terapia sobre diferentes marcadores de imagen o bioquímicos relacionados con la actividad funcional de la vía nigroestriada.

En el presente estudio, el grado de parkinsonismo inducido por la MPTP en los animales, se evaluó utilizando una escala de incapacidad motora elaborada por nuestro grupo, e incluye prácticamente los mismos parámetros que los contenidos en la UPDRS motora que se utiliza en la evaluación de los pacientes con EP. Esta escala valora los principales síntomas del parkinsonismo (bradicinesia, rigidez y temblor) y algunos de los signos conductuales característicos que se observan en estos animales tras la degeneración nigroestriada inducida por la MPTP (alimentación, actividad espontánea) [322]. La escala motora utilizada en este estudio ha sido validada en trabajos anteriores de nuestro grupo [309] y, aunque con diferencias en alguno de los parámetros, su estructura es la adecuada para la evaluación del parkinsonismo en el modelo experimental de EP en monos, según se describe en un estudio comparativo de varias escalas de incapacidad motora utilizadas en el modelo de parkinsonismo inducido por la MPTP [323].

1.2. Estudios de imagen

La PET con ^{18}F -fluorodopa es ampliamente utilizada en la práctica clínica como una exploración de apoyo en el diagnóstico de la EP y en el diagnóstico diferencial con otras entidades como el temblor esencial o el parkinsonismo farmacológico [230]. Esta técnica está siendo utilizada, también, en estudios experimentales con monos parkinsonianos para valorar cómo tiene lugar la denervación nigroestriada y los posibles mecanismos de compensación (Tabla del Anexo) [187;233;324-332]. El PET con ^{18}F -fluorodopa fue la primera técnica de neuroimagen desarrollada para estudiar *in vivo* la integridad y funcionalidad de la vía dopaminérgica nigroestriada. Sin embargo, la captación estriatal de ^{18}F -fluorodopa puede verse modificada por varios factores que deben ser controlados. En primer lugar, este trazador puede ser

metabolizado por la AAAD periférica tras ser administrado por vía endovenosa. Para evitarlo es preciso administrar un inhibidor de esta enzima (por ejemplo, la carbidopa) previamente al estudio. Posteriormente, la ^{18}F -fluorodopa atraviesa la barrera hematoencefálica y por la acción del sistema transportador de aminoácidos llega al interior de las neuronas. Este transportador es saturable y su actividad disminuye si están presentes en el medio otros aminoácidos neutros, por lo que se recomienda evitar dietas ricas en proteínas antes de la realización de los estudios. Posteriormente, en el interior de la neurona dopaminérgica, la ^{18}F -fluorodopa es transformada en ^{18}F -fluorodopamina por la acción de la AAAD central y almacenada en la terminal presináptica. Por lo tanto, otros puntos donde puede verse alterada la captación estriatal de este radiotrazador es a través de modificaciones en la actividad de la enzima AAAD central y en su almacenamiento en las vesículas de la terminal presináptica. De hecho, la activación de los receptores dopaminérgicos D_2 presinápticos disminuye la liberación de dopamina de las vesículas sinápticas, por lo que se recomienda evitar la administración de fármacos dopaminérgicos 12 horas antes de la realización del estudio de PET [306;307]. Por último, tras ser liberada al espacio sináptico la ^{18}F -fluorodopamina es metabolizada por la acción de las enzimas MAO y COMT [231]. Por tanto, si controlamos todas las variables exógenas que puedan modificar la síntesis y liberación de ^{18}F -fluorodopamina, la captación de ^{18}F -fluorodopa estriatal es, fundamentalmente, un indicador de la actividad de la enzima AAAD central.

Los estudios histopatológicos en pacientes con EP y en macacos parkinsonianos han demostrado que la constante de captación de la ^{18}F -fluorodopa (k_i) obtenida durante las dos primeras horas tras la administración de esta sustancia se correlaciona linealmente con los niveles de dopamina estriatal y con el número de neuronas dopaminérgicas de la SNpc [232;233]. Sin embargo, en el caso de monos asintomáticos tratados con MPTP, la k_i se correlaciona con los niveles de dopamina estriatal, pero no con el número de neuronas dopaminérgicas de la SNpc [329]. Este hecho, parece estar relacionado con el aumento de la actividad de la AAAD en las terminales dopaminérgicas estriatales, que existiría en los estadios iniciales de la EP, para poder mantener constantes los niveles de dopamina [199-201].

En este trabajo se planteó la realización de la PET con el radiotrazador ^{18}F -fluorodopa por su disponibilidad en nuestro centro y por ser uno de los trazadores que se han utilizado en los estudios de neuroprotección en pacientes con EP [222]. En efecto, esta técnica ha sido aplicada en ensayos clínicos en EP para establecer el posible efecto neuroprotector o neurotóxico de diferentes fármacos sobre las neuronas dopaminérgicas de la SNpc [303] y como marcador biológico de la progresión de la enfermedad con resultados poco convincentes, ya que algunos autores consideran que los cambios en la captación de ^{18}F -fluorodopa que se observan en pacientes tratados con fármacos con actividad dopaminérgica, podría ser meramente el resultado de un efecto modulador del fármaco utilizado sobre la actividad de la AAD. Este trabajo se ha diseñado con la finalidad de poder determinar el efecto que la administración crónica de levodopa ejerce sobre la actividad DDC de la AAD evaluada *in vivo* mediante PET y su posible reversibilidad tras un periodo de lavado farmacológico de seis meses.

Una de las grandes ventajas que tiene la PET sobre la SPECT es que es una técnica de neuroimagen funcional cuantitativa, es decir, podemos obtener valores exactos de una constante. Sin embargo, al igual que en otras pruebas de Medicina Nuclear, la limitada resolución espacial de los tomógrafos y la presencia de áreas de baja captación del radiotrazador dificulta la delimitación del volumen de interés en una región anatómica concreta. Por este motivo, suele existir variabilidad intra- e inter-observador en el análisis cuantitativo de las imágenes paramétricas. Para corregir esta variabilidad se ha utilizado una plantilla de imágenes de resonancia magnética de los animales incluidos en el estudio que normaliza espacialmente las imágenes de la PET suma y define los volúmenes de interés que se aplican posteriormente a las imágenes normalizadas y paramétricas [310].

1.3. Tamaño de la muestra y pruebas estadísticas

En la mayor parte de los estudios experimentales con primates no humanos intoxicados con la MPTP se considera suficiente la presencia de 4 animales por grupo. Sin embargo, para el análisis de las diferentes variables el número de animales por cada grupo resulta reducido. Por esta razón para el análisis se han utilizado tests estadísticos no paramétricos.

2. Discusión de los resultados

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación indican que la administración crónica de levodopa a monos parkinsonianos induce un incremento de la actividad de la enzima AAAD con respecto a los animales que reciben placebo, que alcanza significación estadística al cabo de 3 meses de interrumpir el tratamiento y persiste a los 6 meses. Esos resultados contrastan con la existencia de un número similar de neuronas dopaminérgicas de la SNpc que sobrevivieron al efecto tóxico del MPTP en ambos grupos de animales, independientemente del tratamiento que hubieran recibido. Un hallazgo interesante de este trabajo es el hecho de que el tratamiento crónico con levodopa incrementara el número de neuronas dopaminérgicas estriatales que induce la denervación dopaminérgica.

Por otro lado, hemos demostrado que dosis bajas y repetidas de MPTP, como las utilizadas en este estudio, disminuyen la cantidad de DAT estriatal, mientras que los niveles de AAAD no se modifican. Los niveles de la proteína TH también disminuyeron en el caudado y el putamen anterior con respecto a los animales control, pero no así en el putamen posterior. En estos animales, la administración crónica de levodopa no modificó los niveles estriatales de las proteínas AAAD y DAT, pero disminuyó la cantidad de TH en el putamen posterior con respecto al grupo tratado con placebo, lo que indica que la levodopa modifica la expresión de esta proteína dopaminérgica presináptica específicamente en esta región del estriado.

2.1. Actividad motora de los animales y efecto de la MPTP en la captación estriatal de ¹⁸F-fluorodopa

La administración sistémica de MPTP a los animales produjo un cuadro parkinsoniano leve, que fue similar en los dos grupos experimentales, por lo que puede decirse que en cuanto a la incapacidad motora inducida por la MPTP ambos grupos experimentales eran similares. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los dos grupos experimentales en la constante de captación de ¹⁸F-fluorodopa (ki) estriatal del PET basal ni en la disminución de la ki en respuesta a

la administración de la MPTP. En ambos grupos de animales, la reducción de la ki estriatal fue similar en el caudado que en el putamen, hallazgo que difiere de los resultados encontrados en pacientes con EP, en los que existe una mayor reducción de la ki en el putamen posterior que en el caudado. Estas diferencias claramente reflejan las diferencias existentes en el patrón de degeneración neuronal inducido por la MPTP con respecto a la EP, como ha sido repetidamente descrito en estudios bioquímicos *post-mortem* [94;96;333]. Sin embargo, llama la atención la gran variabilidad interindividual en la disminución de la captación de ^{18}F -fluorodopa estriatal que presentaron los animales (entre el 4,5 y el 62% con respecto al estudio de PET basal) en respuesta a una misma pauta de administración de la MPTP, hallazgo que resulta llamativo si tenemos en cuenta que la disminución del número de neuronas dopaminérgicas de la SNpc por la MPTP fue muy similar en todos los animales (ver más adelante). Una explicación para estos hallazgos podría estar en la puesta en marcha de mecanismos de compensación de diferente magnitud a nivel estriatal que generalmente aparecen en situaciones de pérdida neuronal dopaminérgica leve-moderada.

La administración de levodopa produjo un incremento de la actividad motora espontánea y una reducción en las escalas de incapacidad en todos los animales. Únicamente uno de ellos (M5) desarrolló discinesias orolinguales y en las extremidades inferiores de leve intensidad. Curiosamente, este animal, fue el que presentó mayor disminución de captación de ^{18}F -fluorodopa estriatal (62% con respecto al estudio basal) tras la administración de MPTP. Este hallazgo apoya la teoría que implica el grado de denervación nigroestriada en el desarrollo de las discinesias [104;334;335]. Sin embargo, está en desacuerdo con la experiencia de otros grupos de investigadores que han descrito movimientos involuntarios en primates no humanos intactos tras la administración de dosis altas de levodopa [336;337]. En nuestro estudio las dosis de levodopa utilizadas (30 mg/kg/día) fueron relativamente bajas con respecto a otros trabajos, por lo que no podemos excluir la posibilidad de que el resto de animales hubieran desarrollado discinesias si hubiéramos utilizado dosis mayores de levodopa.

2.2. La levodopa aumenta la actividad de la AAAD medida en el PET con ¹⁸F-fluorodopa

Aunque en ninguno de los grupos se observaron diferencias significativas entre la ki del PET MPTP y la de los PET post-tratamiento, los animales tratados con levodopa mostraron un incremento de la captación estriatal de ¹⁸F-fluorodopa con respecto al grupo placebo que alcanzó significación estadística a los 3 y 6 meses de haber interrumpido el tratamiento. Numerosos estudios han demostrado que la captación estriatal de ¹⁸F-fluorodopa que se observa en el PET es un indicador de la actividad DDC de la AAAD, que transforma la ¹⁸F-fluorodopa en ¹⁸F-fluorodopamina, por lo tanto, nuestros hallazgos indican que la levodopa induce un incremento de la actividad de la AAAD que, curiosamente, alcanza significación estadística a los 3 y 6 meses de haber interrumpido el tratamiento farmacológico. La actividad de la enzima AAAD puede experimentar varias modificaciones en respuesta a estímulos dopaminérgicos. Por ejemplo, en el estriado de roedores sanos se ha comprobado que la administración aguda o crónica de fármacos antagonistas de los receptores dopaminérgicos D₁ y D₂ produce un incremento de su actividad enzimática rápida y transitoria (de minutos) [338-341], que se sigue de una inducción más tardía de la síntesis de la enzima (de horas), demostrada por un incremento de su RNAm en el mesencéfalo y de sus niveles en el estriado [338;339]. Cuando la administración de estos fármacos se realiza de forma crónica, la inducción de la síntesis de la AAAD se prolonga todavía más en el tiempo (en días) [340]. Al contrario de lo que sucede con los antagonistas de receptores dopaminérgicos, la administración aguda o crónica de levodopa o de agonistas de receptores dopaminérgicos D₂, como la bromocriptina, disminuye la actividad de la AAAD en el estriado de ratones sanos [338;341]. En el momento actual, no disponemos de estudios que hayan valorado en roedores parkinsonianos la influencia de fármacos dopaminérgicos sobre la actividad AAAD estriatal. Por otra parte, determinados fármacos no dopaminérgicos como los antagonistas serotoninérgicos, glutamatérgicos o colinérgicos son capaces de incrementar la actividad de la AAAD [341;342].

Nuestros resultados indican que en el estriado de animales con una lesión nigroestriada moderada y estable la administración de levodopa durante aproximadamente 1 año produce un incremento de la actividad AAAD objetivada en

el estudio de PET con ^{18}F -fluorodopa realizado después de haber interrumpido el tratamiento con levodopa, pero adquiere mayor relevancia en el periodo de lavado farmacológico (3 y 6 meses de lavado). Sin embargo, los estudios de PET con ^{18}F -fluorodopa realizados al finalizar el tratamiento con levodopa o placebo, no mostraron diferencias significativas en la captación estriatal de este radiotrazador. Éste fue un hallazgo inesperado, ya que si la levodopa ejerce un efecto modulador en la actividad de la AAAD debería ser mayor durante el tiempo que dura la exposición al fármaco y no cuando éste se interrumpe. No resulta fácil encontrar una explicación para estos hallazgos. Por un lado, los estudios disponibles en sujetos con EP indican que el tratamiento con levodopa podría modular a la baja la actividad de la AAAD y la unión al DAT, lo que queda reflejado en la menor captación estriatal de ^{18}F -fluorodopa y de unión al DAT en los sujetos que recibieron levodopa con respecto a los que recibieron ropinirol o pramipexol, respectivamente [301;303]. Sin embargo, los PET con ^{18}F -fluorodopa realizados en nuestros animales mientras estaban recibiendo el tratamiento farmacológico fueron similares en ambos grupos, independientemente del tratamiento aplicado. Una explicación para estos resultados podría ser el tiempo de tratamiento y la dosis administrada, que fue mayor en los pacientes con EP que en nuestros animales (2 años frente a 1 año), así como el diferente grado de parkinsonismo de los pacientes con EP (moderada) y de nuestros animales (leves) y es posible que la modulación de la actividad que experimenta la AAAD sea dependiente de la duración del tratamiento farmacológico, de la dosis utilizada y del grado de lesión nigroestriada. En efecto, en pacientes con EP de menos de 5 años de evolución, Torstenson y colaboradores han demostrado que la captación putaminal de ^{11}C -DOPA, un radiotrazador que al igual que la ^{18}F -fluorodopa es sustrato de la AAAD, disminuye cuando se les administra levodopa por vía endovenosa 20-35 minutos antes de la realización de la PET. Sin embargo, la actividad AAAD aumenta si la levodopa se administraba a pacientes con una EP avanzada [343]. Esta modificación tan rápida de la actividad de la AAAD (a los 20 minutos de haber comenzado la infusión endovenosa de levodopa) parece ser debida a cambios en la actividad cinética de la enzima y no a modificaciones de su transcripción y/o síntesis, y depende del grado de lesión nigroestriada. Curiosamente estos cambios en la actividad de la AAAD no se observan cuando la levodopa se administra de forma aguda por vía oral [344]. Es decir, el mayor incremento de la

actividad AAAD se observa tras la administración endovenosa de levodopa a sujetos con una denervación nigroestriada severa, mientras que la administración oral de levodopa a sujetos con EP no produce cambios significativos en su actividad. Estos hallazgos sugieren que la actividad de la enzima AAAD es dependiente del tono dopaminérgico estriatal, ya sea endógeno (dependiente de la integridad del sistema nigroestriado) o exógeno (dependiente de los niveles de levodopa que llegan al estriado procedentes del torrente circulatorio).

El grado de parkinsonismo también podría explicar la discrepancia de nuestros resultados con los publicados en la literatura. En nuestro estudio los animales presentaban un parkinsonismo más leve que los pacientes del estudio REAL-PET que tenían una EP moderada (UPDRS 17-19), y como se ha mencionado previamente el grado de denervación estriatal puede tener un impacto diferente sobre la actividad de la AAAD. Por otro lado, hay que tener en cuenta que el modelo de parkinsonismo inducido por MPTP no es progresivo, a diferencia de la EP en la que existe una pérdida progresiva de terminales dopaminérgicas nigroestriadas que podría enmascarar un hipotético efecto activador de la AAAD en respuesta al tratamiento crónico con levodopa. Finalmente, es importante señalar que las neuronas setoninérgicas expresan AAAD, y algunos autores han sugerido que en ellas podría tener lugar el paso de levodopa a dopamina [345]. A diferencia de lo que ocurre en la EP, estas proyecciones serotoninérgicas estriatales no sólo no disminuyen sino que se incrementan en el modelo de parkinsonismo por MPTP como mecanismo de compensación [346] y podría explicar el incremento de la actividad AAAD observada en nuestros animales. En cualquier caso, nuestros hallazgos tienen una gran relevancia ya que muestran puramente las variaciones en la captación de ^{18}F -fluorodopa estriatal que induce el tratamiento crónico con levodopa en un estriado denervado.

Más sorprendente todavía resulta el hecho de que exista un incremento de la actividad AAAD 6 meses después de haber suspendido el tratamiento con levodopa. No existen estudios similares en humanos con los que podamos comparar nuestros resultados, ya que en todos los estudios el periodo de lavado farmacológico es inexistente o de sólo 2 semanas, por lo que no podemos excluir que este mismo

fenómeno pueda ocurrir en pacientes con EP tras un periodo de lavado farmacológico prolongado. El incremento de la actividad AAAD 6 meses después de la interrupción del fármaco podría deberse a una inducción de la síntesis de la proteína, mas que a una activación de la cinética enzimática, ya que normalmente ésta es una respuesta rápida y de corta duración y podría ocurrir tanto en los cuerpos neuronales como en las terminales dopaminérgicas nigroestriatales o en cualquier tipo de población celular o terminal estriatal que exprese AAAD, entre las que cabría mencionar las terminales/neuronas serotoninérgicas, las células dopaminérgicas del estriado o incluso algunas células gliales [345;347-350]. El incremento mantenido de la actividad AAAD inducido por la administración de levodopa, podría tener implicaciones funcionales en los pacientes con EP tratados con levodopa. Por ejemplo, podría inducir una formación más rápida de dopamina a partir de la levodopa exógena la cual a su vez sería liberada al espacio sináptico. Esta liberación rápida de dopamina desde la terminal presináptica ha sido demostrada, mediante estudios de PET con ¹¹C-raclopride, que tiene lugar en pacientes fluctuaciones motoras y discinesias [351].

2.3. La levodopa no tiene efecto sobre la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc

El número de neuronas dopaminérgicas de la SNpc de los animales tratados con levodopa fue similar al de los animales tratados con placebo, lo que indica que la levodopa no ejerce un efecto tóxico ni neuroprotector sobre esta población celular. En efecto, en los dos grupos de animales la pérdida de neuronas dopaminérgicas estimada mediante métodos de estereología con respecto a un grupo control fue de un 40% con muy poca variabilidad interindividual, lo que indica que la levodopa a las dosis utilizadas en este trabajo carece de efecto sobre la población neuronal dopaminérgica superviviente a la acción tóxica del MPTP. Estos datos confirman la hipótesis de que los cambios observados en la actividad de la AAAD en el PET con ¹⁸F-fluorodopa en los animales que recibieron levodopa pueden ser el resultado de una modulación de la actividad de la AAAD en el estriado y no se deben a un cambio en el número de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc. Aunque no disponemos de un estudio de cuantificación de las terminales TH estriatales, los niveles de proteína TH en el estriado medidos por Western blot (ver más adelante) mostraron

valores similares en los dos grupos de animales, lo que confirma que la mayor actividad AAAD no es debida a un mayor número de terminales nigroestriadas. Por tanto, nuestros resultados indican que puede existir una disociación entre el número de neuronas dopaminérgicas de la SNpc y la captación de ^{18}F -fluorodopa estriatal, ya que a igual número de neuronas dopaminérgicas en la SNpc, no siempre existe un mismo valor de captación de este trazador en el estriado. Este hecho cuestiona la validez de esta técnica en el desarrollo de estudios de neuroprotección cuando se utilizan fármacos con actividad dopaminérgica.

Aunque nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la levodopa carece de efecto tóxico, estudios *in vivo* han aportado datos contradictorios. Algunos autores han observado que el tratamiento con levodopa disminuye la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en roedores con una lesión unilateral de la vía nigroestriada [296;297]. Blunt y colaboradores demostraron que la administración de levodopa durante 27 semanas a ratas con una lesión nigroestriada unilateral completa reducía de forma significativa el número de neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral, sin que se afectara el número de neuronas dopaminérgicas de la SNpc del lado intacto. Sin embargo, estos autores no pueden establecer realmente si la levodopa produce la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc del lado lesionado, ya que la pérdida celular antes de iniciar el tratamiento farmacológico es mayor del 90% [296]. Jeon y colaboradores administraron distintas dosis de levodopa a ratas con una lesión nigroestriada extensa (mayor del 90%) y observaron que únicamente en los animales expuestos a dosis elevadas de este fármaco (100 mg/kg/día) había una disminución significativa del número de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas [297]. Aunque estos estudios indican un posible efecto neurotóxico de la levodopa hay que tener en cuenta que la mayoría de los estudios publicados han establecido el efecto tóxico de la levodopa basándose en la cuantificación de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, pero ninguno de ellos ha realizado estudios de muerte neuronal (por ejemplo, activación de caspasas, etc). Por tanto, un menor número de neuronas TH-ir no necesariamente indica que haya existido muerte celular, y podría deberse a una inhibición de la expresión de la TH producida por el tratamiento crónico con levodopa, más que a una acción tóxica del fármaco. En efecto, Datla y colaboradores demostraron una disminución del número

de células TH-ir en la SNpc de ratas hemiparkinsonianas tratadas con levodopa durante 6-12 semanas. Sin embargo, el número de neuronas dopaminérgicas se incrementó de forma significativa cuando se prolongó el tiempo de tratamiento con levodopa a 24 semanas, indicando que el aumento de la inmunorreactividad a la TH podría ser consecuencia de una recuperación funcional de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc dañadas por la neurotoxina o de un efecto neuroprotector inducido por la exposición a la levodopa [299]. Por otra parte, son muy pocos los estudios que han mostrado un efecto neurotrófico de la levodopa *in vivo*. Murer y colaboradores han demostrado que la levodopa mejora la recuperación funcional de las neuronas dopaminérgicas previamente dañadas o incluso que ejerce un efecto neurotrófico sobre las terminales nigroestriadas todavía funcionantes [298;299]. Sin embargo, hay que señalar que el estudio de Murer no ha sido replicado por otros autores, los animales utilizados fueron hembras con una lesión parcial de la vía nigroestriada (del 40-50%), las dosis de levodopa fueron de 300 mg/kg y el tiempo de tratamiento de 6 meses, diseño que difiere enormemente del resto de estudios publicados. En la misma línea, Shin y colaboradores han demostrado que los ratones a los que se les administró MPTP y posteriormente levodopa (200 mg/kg) durante 4 semanas, presentaron un mayor número de células TH-ir con núcleos teñidos con Nissl que los animales tratados únicamente con MPTP, hallazgos que se correlacionaron con una disminución en la expresión de determinados marcadores de apoptosis y un aumento de marcadores de supervivencia celular [300]. Muy posiblemente, esta gran variabilidad de resultados con respecto al efecto neurotóxico/neurotrófico de la levodopa se deba a la utilización de diferentes modelos de EP, dosis, tiempo de administración de los fármacos y en último término a distintos métodos de análisis histológico. En cualquier caso, nuestros resultados claramente indican que la administración crónica de levodopa no modifica la supervivencia de las células dopaminérgicas de la SNpc previamente expuestas a la MPTP, ni tampoco ejerce un efecto trófico.

2.4. La levodopa induce un aumento de las neuronas dopaminérgicas del estriado

Un hallazgo inesperado de este estudio es el aumento de la población de neuronas dopaminérgicas estriatales en aquellos animales a los que se les

administró MPTP y posteriormente fueron tratados de forma prolongada con levodopa, con respecto a los monos control y los del grupo placebo. Así mismo, observamos un aumento en el número de estas células en la región posterior del estriado precomisural en el grupo tratado con placebo con respecto a los animales del grupo control.

El hallazgo y la caracterización de las células TH-ir estriatales han sido realizados hace relativamente poco tiempo. Estas células fueron descritas por Dubach y colaboradores en el caudado y en el putamen precomisural de los primates [352] y la mayor parte de ellas son neuronas bipolares de pequeño tamaño no espinosas [204]. Además de la enzima TH, expresan otros marcadores de neuronas dopaminérgicas como el DAT, la AAAD y, hasta la mitad de ellas expresan el VMAT2 [210]. El número de estas interneuronas dopaminérgicas estriatales aumenta tras la denervación nigroestriada y se ha sugerido que su incremento podía ser un mecanismo de compensación en respuesta a la reducción de los niveles de dopamina estriatal [204]. Nuestros resultados, mostrando un incremento de células TH-ir en la región posterior del estriado precomisural de los animales tratados con MPTP y placebo con respecto a los animales intactos, están de acuerdo con los estudios previos de nuestro laboratorio y de otros investigadores. Sin embargo, el incremento del número de neuronas TH-ir en el estriado de los animales tratados con levodopa 6 meses después de haber interrumpido el tratamiento son opuestos a los publicados previamente por el grupo de Parent, quienes observaron que la administración prolongada de levodopa a macacos parkinsonianos o a pacientes con EP normaliza el número de estas neuronas dopaminérgicas [207;211]. Esta aparente discrepancia de resultados puede responder a varias causas. El estudio de Huot y colaboradores fue realizado en macacos cynomolgus hembras a las que se les extrajeron los ovarios previamente a la administración de MPTP y, es sabido, que los estrógenos tienen una influencia positiva sobre la supervivencia celular dopaminérgica. En segundo lugar, los animales del estudio de Huot fueron tratados con levodopa durante 4 semanas a una dosis de 100 mg/día y el sacrificio fue realizado al día siguiente de haber administrado la última dosis de levodopa [211], diseño de estudio que claramente difiere del que se ha seguido en nuestro trabajo, en el que se realizó un tratamiento más prolongado y el sacrificio de los animales se

realizó a los 6 meses de la última dosis de levodopa. Por ello, no podemos excluir la posibilidad de que el número de neuronas dopaminérgicas disminuya durante el tratamiento con levodopa y vuelva de nuevo a incrementarse al suspender el tratamiento farmacológico como podría haber ocurrido en nuestros animales, que fueron sacrificados a los 6 meses de haber interrumpido el tratamiento. Aunque en este estudio no se ha realizado una caracterización fenotípica de las neuronas TH-ir del estriado, prácticamente la totalidad de estas neuronas expresan AAAD, y en consecuencia, el incremento del número de células TH-ir estriatales de nuestros animales a los 6 meses de interrumpir el tratamiento concuerda con el incremento de actividad de AAAD observada en los estudios de PET. Del mismo modo, la menor actividad AAAD observada durante el tratamiento con levodopa podría indicar una regulación a la baja de esta población celular. No obstante, queda por determinar el fenotipo de las neuronas TH-ir del estriado de los animales tratados con levodopa, y comprobar si es similar al descrito en primates no tratados con levodopa o si por el contrario tienen el fenotipo de las neuronas TH-ir estriatales descritas en ratones tratados con MPTP y posteriormente con levodopa, en los que estas células expresan los marcadores de células estriatales de proyección [353].

¿Cuál es el mecanismo por el que la exposición crónica a la levodopa aumenta el número de estas neuronas TH-ir estriatales? El origen de las células dopaminérgicas estriatales es motivo de continuo debate y se han propuesto dos teorías. Para una de ellas, estas células se originarían a partir de células madre neurales “silentes” que residirían en el estriado, y para la otra, son el resultado de un cambio fenotípico de las interneuronas gabaérgicas presentes en el estriado [204;206]. La primera hipótesis se basa en que estas células no contienen lipofucsina, pigmento asociado al envejecimiento, y en que hasta un 30% de ellas expresan el marcador de neuronas inmaduras Tuj1 [354]. Sin embargo, la mayoría de los investigadores sugiere que las células TH-ir resultan de un cambio en el fenotipo de una cierta población de interneuronas del estriado [355]. Sin embargo, el hecho de que la densidad estriatal de estas neuronas aumente en respuesta a la administración de factores tróficos en el estriado [208-210], como el GDNF, con capacidad de inducir la formación de nuevas neuronas en el cerebro adulto, apoya la hipótesis de que estas células TH-ir se originen por activación de una neurogénesis

estriatal endógena. El aumento de las neuronas dopaminérgicas estriatales observado a los 6 meses de haber interrumpido el tratamiento con levodopa, claramente indica que la levodopa favorece la aparición de estas neuronas. Carvey y colaboradores han demostrado que el extracto estriatal de pacientes con EP en tratamiento crónico con levodopa estimulaba el crecimiento y la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas en cultivos mesencefálicos de embriones de rata, y este hecho se ha relacionado con el mayor número de neuronas TH-ir en el estriado de los pacientes parkinsonianos con respecto a los sujetos control [356]. Además, estudios en ratones parkinsonianos han demostrado que la administración de levodopa induce la expresión del gen del factor neurotrófico pleiotrofina en el estriado [357], cuyo receptor se encuentra en las interneuronas gabaérgicas estriatales [358], pudiendo actuar de forma similar al GDNF.

Estudios de nuestro grupo y otros han demostrado que esta población de neuronas TH-ir estriatal dispone de la maquinaria enzimática necesaria para sintetizar, liberar y recaptar dopamina [210]. Por lo tanto, se podría suponer que son neuronas funcionantes que podrían tener un papel importante en la compensación del déficit de dopamina que se produce como consecuencia de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y, así, retrasar la aparición de los síntomas parkinsonianos [215]. Por otro lado, estas neuronas podrían ser las responsables del incremento de la captación de ^{18}F -fluorodopa estriatal que se observa durante el periodo de lavado farmacológico, ya que su incremento va en paralelo con el aumento de la ki, como se demuestra por la correlación existente entre la ki y el número de células TH-ir en el caudado de los animales. Este aumento de la ki no se ha podido relacionar con una mejoría clínica de los animales tratados con levodopa al final del estudio con respecto a su estado tras la administración de MPTP, ya que todos los animales presentaron un parkinsonismo muy leve. No obstante, sería de interés poder valorarlo en monos con un parkinsonismo moderado o grave. De hecho, el aumento de las células TH-ir estriatales se ha relacionado con la recuperación motora de monos parkinsonianos tras la realización de un implante de agregados celulares del glomus carotídeo [210]. Si este hallazgo lo extrapolamos a los pacientes con EP, podríamos hipotetizar que la ausencia de un deterioro motor al

cabo de dos semanas de interrumpir la levodopa [304], puede ser consecuencia del incremento del número de células TH-ir que aparece al interrumpir el tratamiento.

2.5. Modificación de los marcadores dopaminérgicos presinápticos

En la última parte del trabajo se realizó la cuantificación de las proteínas dopaminérgicas presinápticas TH, AADC y DAT mediante Western blot con la finalidad de poder correlacionar los hallazgos de neuroimagen realizados *in vivo* con las determinaciones bioquímicas *post-mortem* que valoran la funcionalidad de la vía nigroestriada.

En este trabajo hemos estudiado las variaciones de tres marcadores presinápticos dopaminérgicos, dos de los cuales, la AADC y el DAT, son utilizados en los estudios de neuroimagen funcional para valorar la integridad de la vía nigroestriada en pacientes con EP. La ventaja que supone valorar varios marcadores en un mismo estudio es que permite objetivar si los cambios que se producen afectan por igual a cada uno de ellos o, si por el contrario, muestran una diferente sensibilidad a la neurotoxina MPTP. En nuestro estudio, la denervación nigroestriada produjo cambios muy diferentes en los distintos marcadores dopaminérgicos presinápticos. Hemos podido comprobar que la administración de MPTP a macacos no modifica los niveles estriatales de AADC en ninguna de las estructuras analizadas. Sin embargo, los niveles estriatales de DAT disminuyeron de forma similar en todas las regiones analizadas. Finalmente los niveles estriatales de TH mostraron un patrón diferente. En los animales tratados con placebo los niveles de esta proteína se redujeron en el caudado y el putamen anterior, mientras que fueron similares al grupo control en el putamen posterior.

Existen numerosas evidencias que han demostrado que la denervación dopaminérgica estriatal produce una disminución de las proteínas dopaminérgicas presinápticas, determinadas por distintos métodos de análisis histológico (neuroquímicos [359], inmunoautorradiografía de receptores [185;360] o inmunohistoquímica [189;298]) y por estudios de neuroimagen funcional. No obstante, aunque los estudios histológicos muestran una reducción de los marcadores dopaminérgicos presinápticos en respuesta a la denervación estriatal,

existen diferencias entre ellos a la hora de establecer si la reducción de los marcadores es similar o, por el contrario, muestran una distinta sensibilidad a la neurotoxina administrada. Por ejemplo, Tillerson y colaboradores observaron una reducción similar de DAT, VMAT2 y TH en el estriado de ratones tratados con MPTP mediante la utilización de inmunohistoquímica [359]. Sin embargo, estos autores realizaron la cuantificación de las proteínas en todo el estriado y no por regiones dentro de éste. Por otra parte, algunos investigadores objetivan una diferente disminución de los marcadores dopaminérgicos en relación con la lesión del sistema dopaminérgico. En este sentido, uno de los estudios recientes más relevantes es el de Stephenson y colaboradores, que valoraron la pérdida de los diversos marcadores dopaminérgicos presinápticos (TH, DAT, AAD y VMAT2) en monos intoxicados con MPTP y su modulación tras la administración de levodopa. Para ello, establecieron tres grupos de primates, uno de animales control, y los otros dos a los que se les administró MPTP por vía subcutánea (dosis acumulada total de 12,9-15,9 mg/kg). Los monos parkinsonianos, tras un periodo de estabilización, fueron tratados con levodopa o placebo durante 8 semanas. Los autores objetivaron mediante inmunohistoquímica que había una disminución de todos los marcadores dopaminérgicos en los monos tratados con MPTP y placebo. No obstante, el efecto fue distinto en cada uno de ellos, siendo la reducción más importante para la TH, seguido del VMAT2, el DAT y por último, la AAD. En este estudio, la magnitud de la disminución de las distintas proteínas fue similar en el putamen y el caudado de los animales. Por último, también existen diversos estudios bioquímicos en cerebros de pacientes con EP que muestran una reducción de los marcadores dopaminérgicos con respecto a individuos sanos [167;183;185]. Sin embargo, estos resultados deben interpretarse con cautela ya que la mayor parte de los pacientes tomaban medicación dopaminérgica previamente a su fallecimiento y esto podría modificar la expresión de los marcadores. Por lo tanto, los resultados de nuestro trabajo presentan ciertas similitudes y algunas discrepancias con los publicados en la literatura. En el presente estudio, la pauta de MPTP que administramos a los macacos produce una disminución del DAT en todas las regiones del estriado, en consonancia con los estudios comentados. El DAT, comparado con las otras proteínas analizadas, es la que mejor correlación tiene con el número de neuronas dopaminérgicas presentes en la SNpc, lo que podría explicarse por tener una

expresión alta en las terminales nigroestriadas y por tanto es un buen marcador de la degeneración nigroestriada. Por otro lado, la cantidad de la enzima AAAD no se modifica tras la administración de MPTP, manteniéndose en rangos similares a los de los monos control. Sin embargo, en otros estudios histológicos en modelos animales de la EP sí se observa una disminución de la cantidad de este marcador en el estriado. Esta diferencia con otros trabajos se justifica por la diferente pauta de MPTP administrada. En otros estudios, como el de Stephenson y colaboradores, la cantidad de MPTP administrada fue más elevada y produjo un síndrome parkinsoniano moderado-grave, mientras que en nuestro trabajo los animales de experimentación desarrollaron un parkinsonismo leve. En este trabajo, la ausencia de disminución de los niveles de AAAD parece ser consecuencia de un mecanismo de compensación para mantener estables los niveles de dopamina estriatal. Algunos estudios de neuroimagen funcional realizados para valorar la integridad de la vía dopaminérgica en pacientes con EP también han mostrado diferencias en la pérdida de los distintos marcadores dopaminérgicos que sugieren que, efectivamente, en los estadios iniciales de la EP se produce una regulación al alza de la actividad de la AAAD y a la baja del DAT [199;200;202;246]. Este hecho pone de manifiesto la importancia que tiene la enzima AAAD en la homeostasis de la dopamina estriatal y como mecanismo de compensación para retrasar la aparición de los síntomas parkinsonianos en la llamada fase presintomática de la EP. Por otro lado, la TH parece afectarse de distinta forma en las diferentes regiones del estriado en respuesta a la administración de MPTP. La cantidad de TH en el caudado y el putamen anterior disminuye, paralelamente a la DAT, no sucede así en el putamen posterior, donde permanece en niveles similares al grupo control. Este dato representa una novedad en la literatura, pero no es sencillo de explicar. El relativo aumento de la TH en el putamen posterior podría responder a un mecanismo de compensación como consecuencia del aumento de la expresión de esta proteína en las terminales dopaminérgicas residuales, y menos probablemente, por germinación de terminales dopaminérgicas presinápticas, ya que no se produjo un aumento de los otros marcadores dopaminérgicos. El hecho de que este mecanismo compensatorio se produzca únicamente en el putamen posterior, se podría deber a que esta porción del estriado es la que más se afecta por la MPTP, y por lo tanto, se produce este aumento relativo de la TH con respecto al resto del estriado. Otra

posible explicación podría ser que el putamen posterior, al estar más implicado en el control motor, requiere de esta forma de compensación para minimizar el impacto clínico de la neurotoxina.

En este estudio tenía una particular importancia la cuantificación de los marcadores presinápticos tras la administración de levodopa para poder establecer un posible efecto modulador a largo plazo de este fármaco antiparkinsoniano sobre estas proteínas y correlacionarlo con los hallazgos de la PET. Nuestros resultados muestran que no se produjo una modificación a largo plazo de la cantidad estriatal de AADC ni del DAT por la exposición crónica a la levodopa. No obstante, la exposición a este fármaco indujo una disminución de la cantidad de TH en el putamen posterior con respecto al grupo placebo. En la literatura científica no hay muchos datos sobre el efecto del tratamiento crónico con levodopa sobre los marcadores dopaminérgicos presinápticos. Murer y colaboradores desarrollaron un estudio experimental en el que valoraron el efecto del tratamiento con levodopa durante 6 meses en ratones con una lesión nigroestriada inducida por 6-OHDA. Estos autores cuantificaron el número de neuronas dopaminérgicas en la SNpc y el área tegmental ventral, las fibras TH-ir estriatales y la expresión de TH, DAT y VMAT2, tanto en mesencéfalo como en el estriado, de los ratones tratados y no tratados con levodopa. Se objetivó un aumento de la densidad de fibras TH-ir estriatales y de la expresión estriatal de TH, DAT y VMAT2, cuantificado mediante inmunoautorradiografía, en ratas con una lesión nigroestriada moderada y tratadas con levodopa, con respecto a las no tratadas con este fármaco. Sin embargo, no hubo diferencias en el número de somas de neuronas dopaminérgicas entre ambos grupos de ratas. Estos resultados fueron interpretados como que el tratamiento con levodopa promueve la recuperación de la inervación estriatal en las ratas con una lesión parcial de la vía nigroestriada como consecuencia de la aparición de nuevas prolongaciones nigroestriatales [298]. Sin embargo, se obvia el posible efecto modulador de la levodopa sobre los marcadores dopaminérgicos presinápticos. El estudio de Stephenson y colaboradores, comentado anteriormente, además de valorar el efecto de la MPTP sobre los marcadores dopaminérgicos TH, AADC, DAT y VMAT2, también analizó el efecto del tratamiento con levodopa sobre éstos. En este trabajo, los animales fueron sacrificados a las tres horas de haber administrado

la última dosis de levodopa. Los autores evidenciaron un aumento de la expresión de la AAAD y el VMAT2 en el caudado de los macacos tratados con levodopa con respecto a los monos parkinsonianos tratados con placebo [189]. En nuestro estudio, no observamos variaciones a largo plazo en la cantidad de proteína AAAD o en el DAT por la exposición crónica a la levodopa, aunque no podemos descartar que existan durante la fase de tratamiento. En nuestro trabajo, los animales fueron sacrificados 6 meses después de haber suspendido la levodopa, y quizás por esto, no se observan cambios que puedan estar en relación con la modificación que este fármaco puede producir a corto plazo. Como hemos comentado, la cantidad de AAAD en las distintas regiones del estriado no varía con respecto a los animales del grupo placebo, por lo tanto, el aumento de la captación de ¹⁸F-fluorodopa en el putamen anterior de los estudios de PET realizados a los 3 y 6 meses de haber suspendido el tratamiento en el grupo al que se administró levodopa no se puede justificar por un aumento en la síntesis de la AAAD, y por lo tanto, probablemente se debe a un aumento de la actividad enzimática de esta proteína.

Por último, observamos que los niveles de TH del putamen posterior disminuyen con respecto al grupo placebo tras la exposición a la levodopa. De tal forma, que parece que la levodopa revierte a largo plazo este mecanismo de compensación dopaminérgico que se produce específicamente en el putamen posterior. Si este hecho se corrobora en nuevos trabajos, indicaría que la exposición a la levodopa puede influir en los mecanismos compensatorios dopaminérgicos que se instauran en el estriado lesionado, y quizás pudieran explicar la aparición de complicaciones motoras en relación con la toma crónica de este fármaco.

Conclusiones

1. La administración de la MPTP a macacos produce una disminución de la ki estriatal evaluada mediante PET con ^{18}F -fluorodopa de igual intensidad en todas las áreas estriatales examinadas. Esta reducción se mantiene estable y con el mismo patrón 18 meses después de haber concluido la administración de la neurotoxina, lo que indica la no progresión y no recuperación de la lesión dopaminérgica inducida por la neurotoxina.
2. La reducción de la captación estriatal de ^{18}F -fluorodopa no se modifica durante el tratamiento con levodopa, pero aumenta significativamente al cabo de 3 y 6 meses de haber interrumpido la administración del fármaco, lo que indica que la levodopa induce un incremento de larga duración de la actividad de la AAAD. Este incremento de actividad AAAD podría tener implicaciones funcionales en la respuesta a largo plazo de los pacientes parkinsonianos a la levodopa ya que provocaría una síntesis y liberación rápida de dopamina al espacio sináptico
3. El tratamiento crónico con levodopa a monos parkinsonianos no modifica la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc previamente expuestas a la MPTP, lo que confirma estudios previos en humanos que han demostrado la ausencia de neurotoxicidad *in vivo* de la levodopa.
4. La administración crónica de levodopa a monos parkinsonianos incrementa el número de neuronas dopaminérgicas estriatales que produce la denervación dopaminérgica. Este incremento es evidente a los 6 meses después de haber interrumpido la administración del fármaco y podría ser responsable del incremento de la captación de ^{18}F -fluorodopa estriatal que se observa en los estudios de PET realizados a los 3 y 6 meses de haber suspendido la levodopa.
5. La denervación nigroestriada inducida por la MPTP produce cambios muy diferentes en los distintos marcadores dopaminérgicos presinápticos. Disminuye los niveles de DAT, mientras que no modifica la expresión de

AAAD en el estriado. Este hecho pone de manifiesto la importancia que tiene la enzima AAAD en la homeostasis de la dopamina estriatal y como mecanismo de compensación para retrasar la aparición de los síntomas parkinsonianos.

6. La denervación dopaminérgica producida por la MPTP en macacos induce cambios en los niveles de TH estriatal que son diferentes en las distintas regiones del estriado, observándose un aumento de la TH en el putamen posterior con respecto a las demás regiones, lo que sugiere la puesta en marcha de mecanismos de compensación que operarían de forma específica en esta región del estriado.
7. La administración crónica de levodopa a los macacos parkinsonianos no modifica la cantidad estriatal de proteína AAAD o DAT. Sin embargo, reduce de forma significativa el incremento de TH del putamen posterior producido por la MPTP, lo que indica que la levodopa podría revertir los mecanismos de compensación que se instauran en el estriado después de una denervación parcial dopaminérgica. El hecho de que estos cambios persistan 6 meses después de haber interrumpido el tratamiento con levodopa, sugiere que pueden ser irreversibles.

Bibliografía

- (1) Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2002; 14(2):223-236.
- (2) Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease. *Lancet* 2004; 363(9423):1783-1793.
- (3) Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 1998; 339(15):1044-1053.
- (4) Schrag A, Schott JM. Epidemiological, clinical, and genetic characteristics of early-onset parkinsonism. *Lancet Neurol* 2006; 5(4):355-363.
- (5) Nussbaum RL, Ellis CE. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2003; 348(14):1356-1364.
- (6) Golbe LI. Risk factors in young-onset Parkinson's disease. *Neurology* 1993; 43(9):1641-1643.
- (7) Inzelberg R, Schechtman E, Paleacu D, Zach L, Bonwitt R, Carasso RL et al. Onset and progression of disease in familial and sporadic Parkinson's disease. *Am J Med Genet A* 2004; 124A(3):255-258.
- (8) Inzelberg R, Schechtman E, Paleacu D. Onset age of Parkinson disease. *Am J Med Genet* 2002; 111(4):459-460.
- (9) de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006; 5(6):525-535.
- (10) Rodriguez-Oroz MC, Jahanshahi M, Krack P, Litvan I, Macias R, Bezard E et al. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. *Lancet Neurol* 2009; 8(12):1128-1139.
- (11) Otsuka M, Ichiya Y, Kuwabara Y, Hosokawa S, Sasaki M, Yoshida T et al. Differences in the reduced 18F-Dopa uptakes of the caudate and the putamen in Parkinson's disease: correlations with the three main symptoms. *J Neurol Sci* 1996; 136(1-2):169-173.
- (12) Doder M, Rabiner EA, Turjanski N, Lees AJ, Brooks DJ. Tremor in Parkinson's disease and serotonergic dysfunction: an 11C-WAY 100635 PET study. *Neurology* 2003; 60(4):601-605.
- (13) Lees AJ, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease. *Lancet* 2009; 373(9680):2055-2066.
- (14) Tolosa E, Gaig C, Santamaria J, Compta Y. Diagnosis and the premotor phase of Parkinson disease. *Neurology* 2009; 72(7 Suppl):S12-S20.
- (15) Chaudhuri KR, Schapira AH. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol* 2009; 8(5):464-474.

- (16) Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol* 2006; 5(3):235-245.
- (17) Hughes AJ, Daniel SE, Lees AJ. Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease. *Neurology* 2001; 57(8):1497-1499.
- (18) Hughes AJ, Daniel SE, Ben Shlomo Y, Lees AJ. The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain* 2002; 125(Pt 4):861-870.
- (19) Tolosa E, Wenning G, Poewe W. The diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006; 5(1):75-86.
- (20) Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983; 219(4587):979-980.
- (21) Beal MF. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2(5):325-334.
- (22) Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Shrivastava S. A meta-analysis of Parkinson's disease and exposure to pesticides. *Neurotoxicology* 2000; 21(4):435-440.
- (23) Tanner CM, Ross GW, Jewell SA, Hauser RA, Jankovic J, Factor SA et al. Occupation and risk of parkinsonism: a multicenter case-control study. *Arch Neurol* 2009; 66(9):1106-1113.
- (24) Elbaz A, Clavel J, Rathouz PJ, Moisan F, Galanaud JP, Delemotte B et al. Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. *Ann Neurol* 2009; 66(4):494-504.
- (25) Di Monte DA. The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? *Lancet Neurol* 2003; 2(9):531-538.
- (26) Hernan MA, Takkouche B, Caamano-Isorna F, Gestal-Otero JJ. A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2002; 52(3):276-284.
- (27) Payami H, Zareparsis S, James D, Nutt J. Familial aggregation of Parkinson disease: a comparative study of early-onset and late-onset disease. *Arch Neurol* 2002; 59(5):848-850.
- (28) Tanner CM, Ottman R, Goldman SM, Ellenberg J, Chan P, Mayeux R et al. Parkinson disease in twins: an etiologic study. *JAMA* 1999; 281(4):341-346.
- (29) Piccini P, Burn DJ, Ceravolo R, Maraganore D, Brooks DJ. The role of inheritance in sporadic Parkinson's disease: evidence from a longitudinal study of dopaminergic function in twins. *Ann Neurol* 1999; 45(5):577-582.

- (30) Burn DJ, Mark MH, Playford ED, Maraganore DM, Zimmerman TR, Jr., Duvoisin RC et al. Parkinson's disease in twins studied with 18F-dopa and positron emission tomography. *Neurology* 1992; 42(10):1894-1900.
- (31) Laihinen A, Ruottinen H, Rinne JO, Haaparanta M, Bergman J, Solin O et al. Risk for Parkinson's disease: twin studies for the detection of asymptomatic subjects using [18F]6-fluorodopa PET. *J Neurol* 2000; 247 Suppl 2:II110-II113.
- (32) Schiesling C, Kieper N, Seidel K, Kruger R. Review: Familial Parkinson's disease--genetics, clinical phenotype and neuropathology in relation to the common sporadic form of the disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2008; 34(3):255-271.
- (33) Hardy J, Cookson MR, Singleton A. Genes and parkinsonism. *Lancet Neurol* 2003; 2(4):221-228.
- (34) Lwin A, Orvisky E, Goker-Alpan O, LaMarca ME, Sidransky E. Glucocerebrosidase mutations in subjects with parkinsonism. *Mol Genet Metab* 2004; 81(1):70-73.
- (35) Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2009; 361(17):1651-1661.
- (36) Olanow CW, McNaught KS. Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006; 21(11):1806-1823.
- (37) Olanow CW. The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease--2007. *Mov Disord* 2007; 22 Suppl 17:S335-S342.
- (38) Pan T, Kondo S, Le W, Jankovic J. The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease. *Brain* 2008; 131(Pt 8):1969-1978.
- (39) Malkus KA, Tsika E, Ischiropoulos H. Oxidative modifications, mitochondrial dysfunction, and impaired protein degradation in Parkinson's disease: how neurons are lost in the Bermuda triangle. *Mol Neurodegener* 2009; 4:24.
- (40) Long-Smith CM, Sullivan AM, Nolan YM. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2009; 89(3):277-287.
- (41) Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 53 Suppl 3:S26-S36.
- (42) Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A et al. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem* 1989; 52(2):381-389.
- (43) Dexter DT, Holley AE, Flitter WD, Slater TF, Wells FR, Daniel SE et al. Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study. *Mov Disord* 1994; 9(1):92-97.

- (44) Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ, Cairns N, Marsden CD et al. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem* 1997; 69(3):1196-1203.
- (45) Ambani LM, Van Woert MH, Murphy S. Brain peroxidase and catalase in Parkinson disease. *Arch Neurol* 1975; 32(2):114-118.
- (46) Perry TL, Godin DV, Hansen S. Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency? *Neurosci Lett* 1982; 33(3):305-310.
- (47) Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Jenner P, Marsden CD. Glutathione-related enzymes in brain in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1994; 36(3):356-361.
- (48) Schapira AH. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2008; 7(1):97-109.
- (49) Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1989; 1(8649):1269.
- (50) Mann VM, Cooper JM, Krige D, Daniel SE, Schapira AH, Marsden CD. Brain, skeletal muscle and platelet homogenate mitochondrial function in Parkinson's disease. *Brain* 1992; 115(Pt 2):333-342.
- (51) Ayala A, Venero JL, Cano J, Machado A. Mitochondrial toxins and neurodegenerative diseases. *Front Biosci* 2007; 12:986-1007.
- (52) Banerjee R, Starkov AA, Beal MF, Thomas B. Mitochondrial dysfunction in the limelight of Parkinson's disease pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792(7):651-663.
- (53) McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 1988; 38(8):1285-1291.
- (54) Boka G, Anglade P, Wallach D, Javoy-Agid F, Agid Y, Hirsch EC. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1994;172(1-2):151-154.
- (55) Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debre P et al. FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *J Neurosci* 1999; 19(9):3440-3447.
- (56) Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 2000;(60):277-290.

- (57) Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Kogure O, Kuno S et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor in the substantia nigra from control and parkinsonian brains. *Neurosci Lett* 2001; 300(3):179-181.
- (58) McGeer PL, Yasojima K, McGeer EG. Association of interleukin-1 beta polymorphisms with idiopathic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2002; 326(1):67-69.
- (59) Teismann P, Vila M, Choi DK, Tieu K, Wu DC, Jackson-Lewis V et al. COX-2 and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 991:272-277.
- (60) Nagatsu T, Sawada M. Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. *Curr Pharm Des* 2005; 11(8):999-1016.
- (61) Chen H, Jacobs E, Schwarzschild MA, McCullough ML, Calle EE, Thun MJ et al. Nonsteroidal antiinflammatory drug use and the risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2005; 58(6):963-967.
- (62) Chen H, Zhang SM, Hernan MA, Schwarzschild MA, Willett WC, Colditz GA et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Arch Neurol* 2003; 60(8):1059-1064.
- (63) Tansey MG, Goldberg MS. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis* 2010; 37(3):510-518.
- (64) Olney JW, de Gubareff T. Glutamate neurotoxicity and Huntington's chorea. *Nature* 1978; 271(5645):557-559.
- (65) Surmeier DJ. Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2007; 6(10):933-938.
- (66) Beal MF. Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. *Ann Neurol* 1998; 44(3 Suppl 1):S110-S114.
- (67) Turski L, Bressler K, Rettig KJ, Loschmann PA, Wachtel H. Protection of substantia nigra from MPP+ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature* 1991; 349(6308):414-418.
- (68) Chan P, Delanney LE, Irwin I, Langston JW, Di Monte D. MPTP-induced ATP loss in mouse brain. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 648:306-308.
- (69) Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem* 2003; 278(27):25009-25013.
- (70) Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 2003; 426(6968):895-899.

- (71) Kuzuhara S, Mori H, Izumiyama N, Yoshimura M, Ihara Y. Lewy bodies are ubiquitinated. A light and electron microscopic immunocytochemical study. *Acta Neuropathol* 1988; 75(4):345-353.
- (72) Olanow CW, Perl DP, DeMartino GN, McNaught KS. Lewy-body formation is an aggresome-related process: a hypothesis. *Lancet Neurol* 2004; 3(8):496-503.
- (73) Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998; 395(6701):451-452.
- (74) McNaught KS, Jenner P. Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2001;297(3):191-194.
- (75) Furukawa Y, Vigouroux S, Wong H, Guttman M, Rajput AH, Ang L et al. Brain proteasomal function in sporadic Parkinson's disease and related disorders. *Ann Neurol* 2002; 51(6):779-782.
- (76) McNaught KS, Olanow CW. Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 53 Suppl 3:S73-84.
- (77) Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392(6676):605-608.
- (78) Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 2004; 305(5688):1292-1295.
- (79) Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004; 6(4):463-477.
- (80) Yang Q, Mao Z. Parkinson Disease: A Role for Autophagy? *Neuroscientist* 2010; 16(4):335-341.
- (81) Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276(5321):2045-2047.
- (82) Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 1998; 18(2):106-108.
- (83) Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003; 302(5646):841.
- (84) Ramirez A, Heimbach A, Grundemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP et al. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2,

- encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 2006; 38(10):1184-1191.
- (85) Di Fonzo A, Chien HF, Socal M, Giraudo S, Tassorelli C, Iliceto G et al. ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease. *Neurology* 2007; 68(19):1557-1562.
- (86) Capitanio JP, Emborg ME. Contributions of non-human primates to neuroscience research. *Lancet* 2008; 371(9618):1126-1135.
- (87) Dolphin AC, Jenner P, Marsden CD. The relative importance of dopamine and noradrenaline receptor stimulation for the restoration of motor activity in reserpine or alpha-methyl-p-tyrosine pre-treated mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1976; 4(6):661-670.
- (88) Bove J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* 2005; 2(3):484-494.
- (89) Jenner P. Functional models of Parkinson's disease: a valuable tool in the development of novel therapies. *Ann Neurol* 2008; 64 Suppl 2:S16-29.
- (90) Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2000; 3(12):1301-1306.
- (91) Langston JW, Forno LS, Rebert CS, Irwin I. Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Res* 1984; 292(2):390-394.
- (92) Bloem BR, Irwin I, Buruma OJ, Haan J, Roos RA, Tetrad JW et al. The MPTP model: versatile contributions to the treatment of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1990; 97(2-3):273-293.
- (93) Smeyne RJ, Jackson-Lewis V. The MPTP model of Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 2005; 134(1):57-66.
- (94) Perez-Otano I, Oset C, Luquin MR, Herrero MT, Obeso JA, Del Rio J. MPTP-induced parkinsonism in primates: pattern of striatal dopamine loss following acute and chronic administration. *Neurosci Lett* 1994; 175(1-2):121-125.
- (95) Forno LS, Langston JW, Delanney LE, Irwin I, Ricaurte GA. Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Ann Neurol* 1986; 20(4):449-455.
- (96) Pifl C, Schingnitz G, Hornykiewicz O. The neurotoxin MPTP does not reproduce in the rhesus monkey the interregional pattern of striatal dopamine loss typical of human idiopathic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1988; 92(2):228-233.

- (97) Hattori N, Sato S. Animal models of Parkinson's disease: similarities and differences between the disease and models. *Neuropathology* 2007; 27(5):479-483.
- (98) Jenner P. The contribution of the MPTP-treated primate model to the development of new treatment strategies for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2003; 9(3):131-137.
- (99) Halliday G, Herrero MT, Murphy K, McCann H, Ros-Bernal F, Barcia C et al. No Lewy pathology in monkeys with over 10 years of severe MPTP Parkinsonism. *Mov Disord* 2009; 24(10):1519-1523.
- (100) Kowall NW, Hantraye P, Brouillet E, Beal MF, McKee AC, Ferrante RJ. MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons. *Neuroreport* 2000; 11(1):211-213.
- (101) Purisai MG, McCormack AL, Langston WJ, Johnston LC, Di Monte DA. Alpha-synuclein expression in the substantia nigra of MPTP-lesioned non-human primates. *Neurobiol Dis* 2005; 20(3):898-906.
- (102) McCormack AL, Mak SK, Shenasa M, Langston WJ, Forno LS, Di Monte DA. Pathologic modifications of alpha-synuclein in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated squirrel monkeys. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008; 67(8):793-802.
- (103) Forno LS, Langston JW, Delanney LE, Irwin I. An electron microscopic study of MPTP-induced inclusion bodies in an old monkey. *Brain Res* 1988; 448(1):150-157.
- (104) Pearce RK, Jackson M, Smith L, Jenner P, Marsden CD. Chronic L-DOPA administration induces dyskinesias in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Mov Disord* 1995; 10(6):731-740.
- (105) Vingerhoets FJ, Snow BJ, Tetrud JW, Langston JW, Schulzer M, Calne DB. Positron emission tomographic evidence for progression of human MPTP-induced dopaminergic lesions. *Ann Neurol* 1994; 36(5):765-770.
- (106) Langston JW, Forno LS, Tetrud J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol* 1999; 46(4):598-605.
- (107) Brownell AL, Jenkins BG, Elmaleh DR, Deacon TW, Speelman RD, Isacson O. Combined PET/MRS brain studies show dynamic and long-term physiological changes in a primate model of Parkinson disease. *Nat Med* 1998; 4(11):1308-1312.
- (108) McGeer PL, Schwab C, Parent A, Doudet D. Presence of reactive microglia in monkey substantia nigra years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration. *Ann Neurol* 2003; 54(5):599-604.

- (109) Garrido-Gil P, Belzunegui S, San Sebastian W, Izal-Azcarate A, Lopez B, Marcilla I et al. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure fails to produce delayed degeneration of substantia nigra neurons in monkeys. *J Neurosci Res* 2009; 87(2):586-597.
- (110) McNaught KS, Perl DP, Brownell AL, Olanow CW. Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2004; 56(1):149-162.
- (111) McNaught KS, Olanow CW. Proteasome inhibitor-induced model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2006; 60(2):243-247.
- (112) Manning-Bog AB, Reaney SH, Chou VP, Johnston LC, McCormack AL, Johnston J et al. Lack of nigrostriatal pathology in a rat model of proteasome inhibition. *Ann Neurol* 2006; 60(2):256-260.
- (113) Bove J, Zhou C, Jackson-Lewis V, Taylor J, Chu Y, Rideout HJ et al. Proteasome inhibition and Parkinson's disease modeling. *Ann Neurol* 2006; 60(2):260-264.
- (114) Mathur BN, Neely MD, Dyllick-Brenzinger M, Tandon A, Deutch AY. Systemic administration of a proteasome inhibitor does not cause nigrostriatal dopamine degeneration. *Brain Res* 2007; 1168:83-9.
- (115) Kadoguchi N, Kimoto H, Yano R, Kato H, Araki T. Failure of acute administration with proteasome inhibitor to provide a model of Parkinson's disease in mice. *Metab Brain Dis* 2008; 23(2):147-154.
- (116) Fleming SM, Fernagut PO, Chesselet MF. Genetic mouse models of parkinsonism: strengths and limitations. *NeuroRx* 2005; 2(3):495-503.
- (117) Meredith GE, Sonsalla PK, Chesselet MF. Animal models of Parkinson's disease progression. *Acta Neuropathol* 2008; 115(4):385-398.
- (118) Hwang DY, Fleming SM, Ardayfio P, Moran-Gates T, Kim H, Tarazi FI et al. 3,4-dihydroxyphenylalanine reverses the motor deficits in Pitx3-deficient aphakia mice: behavioral characterization of a novel genetic model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2005; 25(8):2132-2137.
- (119) Sonnier L, Le Pen G, Hartmann A, Bizot JC, Trovero F, Krebs MO et al. Progressive loss of dopaminergic neurons in the ventral midbrain of adult mice heterozygote for *Engrailed1*. *J Neurosci* 2007; 27(5):1063-1071.
- (120) Haubenberger D, Reinthaler E, Mueller JC, Pirker W, Katzenschlager R, Froehlich R et al. Association of transcription factor polymorphisms PITX3 and EN1 with Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2009.
- (121) Le W, Conneely OM, He Y, Jankovic J, Appel SH. Reduced Nurr1 expression increases the vulnerability of mesencephalic dopamine neurons to MPTP-induced injury. *J Neurochem* 1999; 73(5):2218-2221.

- (122) Jiang C, Wan X, He Y, Pan T, Jankovic J, Le W. Age-dependent dopaminergic dysfunction in Nurr1 knockout mice. *Exp Neurol* 2005; 191(1):154-162.
- (123) Harvey BK, Wang Y, Hoffer BJ. Transgenic rodent models of Parkinson's disease. *Acta Neurochir Suppl* 2008; 101:89-92.:89-92.
- (124) Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, Singleton AB, Yoshino H, Imai H et al. Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2006; 59(2):298-309.
- (125) Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE et al. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 2000; 25(1):239-252.
- (126) Feany MB, Bender WW. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 2000; 404(6776):394-398.
- (127) Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A et al. Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* 2000; 287(5456):1265-1269.
- (128) Lucking CB, Durr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T et al. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med* 2000; 342(21):1560-1567.
- (129) Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000; 25(3):302-305.
- (130) Goldberg MS, Fleming SM, Palacino JJ, Cepeda C, Lam HA, Bhatnagar A et al. Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J Biol Chem* 2003; 278(44):43628-43635.
- (131) Palacino JJ, Sagi D, Goldberg MS, Krauss S, Motz C, Wacker M et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem* 2004; 279(18):18614-18622.
- (132) Lu XH, Fleming SM, Meurers B, Ackerson LC, Mortazavi F, Lo V et al. Bacterial artificial chromosome transgenic mice expressing a truncated mutant parkin exhibit age-dependent hypokinetic motor deficits, dopaminergic neuron degeneration, and accumulation of proteinase K-resistant alpha-synuclein. *J Neurosci* 2009; 29(7):1962-1976.
- (133) Lo BC, Schneider BL, Bauer M, Sajadi A, Brice A, Iwatsubo T et al. Lentiviral vector delivery of parkin prevents dopaminergic degeneration in an alpha-synuclein rat model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(50):17510-17515.

- (134) Vercammen L, Van der PA, Vaudano E, Gijsbers R, Debyser Z, Van den HC et al. Parkin protects against neurotoxicity in the 6-hydroxydopamine rat model for Parkinson's disease. *Mol Ther* 2006; 14(5):716-723.
- (135) Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003; 299(5604):256-259.
- (136) van Duijn CM, Dekker MC, Bonifati V, Galjaard RJ, Houwing-Duistermaat JJ, Snijders PJ et al. Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. *Am J Hum Genet* 2001; 69(3):629-634.
- (137) Chen L, Cagniard B, Mathews T, Jones S, Koh HC, Ding Y et al. Age-dependent motor deficits and dopaminergic dysfunction in DJ-1 null mice. *J Biol Chem* 2005; 280(22):21418-21426.
- (138) Goldberg MS, Pisani A, Haburcak M, Vortherms TA, Kitada T, Costa C et al. Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. *Neuron* 2005; 45(4):489-496.
- (139) Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004; 304(5674):1158-1160.
- (140) Plun-Favreau H, Hardy J. PINK1 in mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(32):11041-11042.
- (141) Kitada T, Pisani A, Porter DR, Yamaguchi H, Tscherter A, Martella G et al. Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of PINK1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(27):11441-11446.
- (142) Gautier CA, Kitada T, Shen J. Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(32):11364-11369.
- (143) Gispert S, Ricciardi F, Kurz A, Azizov M, Hoepken HH, Becker D et al. Parkinson phenotype in aged PINK1-deficient mice is accompanied by progressive mitochondrial dysfunction in absence of neurodegeneration. *PLoS One* 2009; 4(6):e5777.
- (144) Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, van der BM et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 2004; 44(4):595-600.
- (145) Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004; 44(4):601-607.
- (146) Li Y, Liu W, Oo TF, Wang L, Tang Y, Jackson-Lewis V et al. Mutant LRRK2(R1441G) BAC transgenic mice recapitulate cardinal features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2009; 12(7):826-828.

- (147) Setsuie R, Wang YL, Mochizuki H, Osaka H, Hayakawa H, Ichihara N et al. Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant. *Neurochem Int* 2007; 50(1):119-129.
- (148) Ekstrand MI, Terzioglu M, Galter D, Zhu S, Hofstetter C, Lindqvist E et al. Progressive parkinsonism in mice with respiratory-chain-deficient dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(4):1325-1330.
- (149) Klein C, Lohmann-Hedrich K, Rogaeva E, Schlossmacher MG, Lang AE. Deciphering the role of heterozygous mutations in genes associated with parkinsonism. *Lancet Neurol* 2007; 6(7):652-662.
- (150) Kitada T, Tong Y, Gautier CA, Shen J. Absence of nigral degeneration in aged parkin/DJ-1/PINK1 triple knockout mice. *J Neurochem* 2009; 111(3):696-702.
- (151) Ulusoy A, Bjorklund T, Hermening S, Kirik D. In vivo gene delivery for development of mammalian models for Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2008; 209(1):89-100.
- (152) Terzi D, Zachariou V. Adeno-associated virus-mediated gene delivery approaches for the treatment of CNS disorders. *Biotechnol J* 2008; 3(12):1555-1563.
- (153) Kirik D, Rosenblad C, Burger C, Lundberg C, Johansen TE, Muzyczka N et al. Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. *J Neurosci* 2002; 22(7):2780-2791.
- (154) Lo BC, Ridet JL, Schneider BL, Deglon N, Aebischer P. alpha -Synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(16):10813-10818.
- (155) Kirik D, Annett LE, Burger C, Muzyczka N, Mandel RJ, Bjorklund A. Nigrostriatal alpha-synucleinopathy induced by viral vector-mediated overexpression of human alpha-synuclein: a new primate model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(5):2884-2889.
- (156) Eslamboli A, Romero-Ramos M, Burger C, Bjorklund T, Muzyczka N, Mandel RJ et al. Long-term consequences of human alpha-synuclein overexpression in the primate ventral midbrain. *Brain* 2007; 130(Pt 3):799-815.
- (157) Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 1991; 114(Pt 5):2283-2301.
- (158) Kish SJ, Shannak K, Hornykiewicz O. Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *N Engl J Med* 1988; 318(14):876-880.
- (159) Forno LS. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55(3):259-272.

- (160) Irizarry MC, Growdon W, Gomez-Isla T, Newell K, George JM, Clayton DF et al. Nigral and cortical Lewy bodies and dystrophic nigral neurites in Parkinson's disease and cortical Lewy body disease contain alpha-synuclein immunoreactivity. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57(4):334-337.
- (161) Dickson DW, Braak H, Duda JE, Duyckaerts C, Gasser T, Halliday GM et al. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol* 2009; 8(12):1150-1157.
- (162) Fumimura Y, Ikemura M, Saito Y, Sengoku R, Kanemaru K, Sawabe M et al. Analysis of the adrenal gland is useful for evaluating pathology of the peripheral autonomic nervous system in lewy body disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66(5):354-362.
- (163) Ikemura M, Saito Y, Sengoku R, Sakiyama Y, Hatsuta H, Kanemaru K et al. Lewy body pathology involves cutaneous nerves. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008; 67(10):945-953.
- (164) Orimo S, Uchihara T, Nakamura A, Mori F, Kakita A, Wakabayashi K et al. Axonal alpha-synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease. *Brain* 2008; 131(Pt 3):642-650.
- (165) Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del Tredici K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* 2006;396(1):67-72.
- (166) Wakabayashi K, Tanji K, Mori F, Takahashi H. The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathology* 2007; 27(5):494-506.
- (167) Hornykiewicz O. Biochemical aspects of Parkinson's disease. *Neurology* 1998; 51(2 Suppl 2):S2-S9.
- (168) Agid Y, Cervera P, Hirsch E, Javoy-Agid F, Lehericy S, Raisman R et al. Biochemistry of Parkinson's disease 28 years later: a critical review. *Mov Disord* 1989; 4 Suppl 1:S126-S144.
- (169) Stephens B, Mueller AJ, Shering AF, Hood SH, Taggart P, Arbuthnott GW et al. Evidence of a breakdown of corticostriatal connections in Parkinson's disease. *Neuroscience* 2005; 132(3):741-754.
- (170) Alexander GE, DeLong MR, Strick PL. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* 1986; 9:357-381.
- (171) Seger CA. The basal ganglia in human learning. *Neuroscientist* 2006; 12(4):285-290.

- (172) Seger CA. How do the basal ganglia contribute to categorization? Their roles in generalization, response selection, and learning via feedback. *Neurosci Biobehav Rev* 2008; 32(2):265-278.
- (173) Cepeda C, Buchwald NA, Levine MS. Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(20):9576-9580.
- (174) Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr. et al. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 1990; 250(4986):1429-1432.
- (175) DeLong MR. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 1990; 13(7):281-285.
- (176) Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 1989; 12(10):366-375.
- (177) Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N et al. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 2000; 23(10 Suppl):S8-19.
- (178) Rodriguez-Oroz MC, Obeso JA, Lang AE, Houeto JL, Pollak P, Rehnrona S et al. Bilateral deep brain stimulation in Parkinson's disease: a multicentre study with 4 years follow-up. *Brain* 2005; 128(Pt 10):2240-2249.
- (179) Smith Y, Villalba R. Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: an overview of its anatomical organization in normal and Parkinsonian brains. *Mov Disord* 2008; 23 Suppl 3:S534-S547.
- (180) DeLong MR, Wichmann T. Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol* 2007; 64(1):20-24.
- (181) Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Benitez-Temino B, Blesa FJ, Guridi J, Marin C et al. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2008; 23 Suppl 3:S548-S559.
- (182) Obeso JA, Marin C, Rodriguez-Oroz C, Blesa J, Benitez-Temino B, Mena-Segovia J et al. The basal ganglia in Parkinson's disease: current concepts and unexplained observations. *Ann Neurol* 2008; 64 Suppl 2:S30-S46.
- (183) Nagatsu T, Sawada M. Biochemistry of postmortem brains in Parkinson's disease: historical overview and future prospects. *J Neural Transm Suppl* 2007;(72):113-120.
- (184) Fahn S. The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2008; 23 Suppl 3:S497-S508.
- (185) Wilson JM, Levey AI, Rajput A, Ang L, Guttman M, Shannak K et al. Differential changes in neurochemical markers of striatal dopamine nerve terminals in idiopathic Parkinson's disease. *Neurology* 1996; 47(3):718-726.

- (186) Bezard E, Dovero S, Prunier C, Ravenscroft P, Chalon S, Guilloteau D et al. Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2001; 21(17):6853-6861.
- (187) Doudet DJ, Rosa-Neto P, Munk OL, Ruth TJ, Jivan S, Cumming P. Effect of age on markers for monoaminergic neurons of normal and MPTP-lesioned rhesus monkeys: a multi-tracer PET study. *Neuroimage* 2006; 30(1):26-35.
- (188) Nagai Y, Obayashi S, Ando K, Inaji M, Maeda J, Okauchi T et al. Progressive changes of pre- and post-synaptic dopaminergic biomarkers in conscious MPTP-treated cynomolgus monkeys measured by positron emission tomography. *Synapse* 2007; 61(10):809-819.
- (189) Stephenson DT, Childs MA, Li Q, Carvajal-Gonzalez S, Opsahl A, Tengowski M et al. Differential loss of presynaptic dopaminergic markers in Parkinsonian monkeys. *Cell Transplant* 2007; 16(3):229-244.
- (190) Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24(2):197-211.
- (191) Braak H, Del Tredici K. Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology* 2008; 70(20):1916-1925.
- (192) Hardy J. Expression of normal sequence pathogenic proteins for neurodegenerative disease contributes to disease risk: 'permissive templating' as a general mechanism underlying neurodegeneration. *Biochem Soc Trans* 2005; 33(Pt 4):578-581.
- (193) Lerner A, Bagic A. Olfactory pathogenesis of idiopathic Parkinson disease revisited. *Mov Disord* 2008; 23(8):1076-1084.
- (194) Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med* 2008; 14(5):504-506.
- (195) Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 2008; 14(5):501-503.
- (196) Halliday G, Hely M, Reid W, Morris J. The progression of pathology in longitudinally followed patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2008; 115(4):409-415.
- (197) Zigmond MJ, Abercrombie ED, Berger TW, Grace AA, Stricker EM. Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. *Trends Neurosci* 1990; 13(7):290-296.

- (198) Bezard E, Gross CE, Brotchie JM. Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated. *Trends Neurosci* 2003; 26(4):215-221.
- (199) Tedroff J, Ekesbo A, Rydin E, Langstrom B, Hagberg G. Regulation of dopaminergic activity in early Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1999; 46(3):359-365.
- (200) Lee CS, Samii A, Sossi V, Ruth TJ, Schulzer M, Holden JE et al. In vivo positron emission tomographic evidence for compensatory changes in presynaptic dopaminergic nerve terminals in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2000; 47(4):493-503.
- (201) Adams JR, van Netten H, Schulzer M, Mak E, McKenzie J, Strongosky A et al. PET in LRRK2 mutations: comparison to sporadic Parkinson's disease and evidence for presymptomatic compensation. *Brain* 2005; 128(Pt 12):2777-2785.
- (202) Sossi V, Fuente-Fernandez R, Schulzer M, Troiano AR, Ruth TJ, Stoessl AJ. Dopamine transporter relation to dopamine turnover in Parkinson's disease: a positron emission tomography study. *Ann Neurol* 2007; 62(5):468-474.
- (203) Antonini A, Schwarz J, Oertel WH, Beer HF, Madeja UD, Leenders KL. [¹¹C]raclopride and positron emission tomography in previously untreated patients with Parkinson's disease: Influence of L-dopa and lisuride therapy on striatal dopamine D₂-receptors. *Neurology* 1994; 44(7):1325-1329.
- (204) Betarbet R, Turner R, Chockkan V, DeLong MR, Allers KA, Walters J et al. Dopaminergic neurons intrinsic to the primate striatum. *J Neurosci* 1997; 17(17):6761-6768.
- (205) Porritt MJ, Batchelor PE, Hughes AJ, Kalnins R, Donnan GA, Howells DW. New dopaminergic neurons in Parkinson's disease striatum. *Lancet* 2000; 356(9223):44-45.
- (206) Huot P, Parent A. Dopaminergic neurons intrinsic to the striatum. *J Neurochem* 2007; 101(6):1441-1447.
- (207) Huot P, Levesque M, Parent A. The fate of striatal dopaminergic neurons in Parkinson's disease and Huntington's chorea. *Brain* 2007; 130(Pt 1):222-232.
- (208) Palfi S, Leventhal L, Chu Y, Ma SY, Emborg M, Bakay R et al. Lentivirally delivered glial cell line-derived neurotrophic factor increases the number of striatal dopaminergic neurons in primate models of nigrostriatal degeneration. *J Neurosci* 2002; 22(12):4942-4954.
- (209) Kishima H, Poyot T, Bloch J, Dauguet J, Conde F, Dolle F et al. Encapsulated GDNF-producing C2C12 cells for Parkinson's disease: a pre-clinical study in chronic MPTP-treated baboons. *Neurobiol Dis* 2004; 16(2):428-439.

- (210) San Sebastian W, Guillen J, Manrique M, Belzunegui S, Ciordia E, Izal-Azcarate A et al. Modification of the number and phenotype of striatal dopaminergic cells by carotid body graft. *Brain* 2007; 130(Pt 5):1306-1316.
- (211) Huot P, Levesque M, Morissette M, Calon F, Dridi M, Di Paolo T et al. L-Dopa treatment abolishes the numerical increase in striatal dopaminergic neurons in parkinsonian monkeys. *J Chem Neuroanat* 2008; 35(1):77-84.
- (212) Hansen JT, Sakai K, Greenamyre JT, Moran S. Sprouting of dopaminergic fibers from spared mesencephalic dopamine neurons in the unilateral partial lesioned rat. *Brain Res* 1995; 670(2):197-204.
- (213) Elsworth JD, Taylor JR, Sladek JR, Jr., Collier TJ, Redmond DE, Jr., Roth RH. Striatal dopaminergic correlates of stable parkinsonism and degree of recovery in old-world primates one year after MPTP treatment. *Neuroscience* 2000; 95(2):399-408.
- (214) Mounayar S, Boulet S, Tande D, Jan C, Pessiglione M, Hirsch EC et al. A new model to study compensatory mechanisms in MPTP-treated monkeys exhibiting recovery. *Brain* 2007; 130(Pt 11):2898-2914.
- (215) Brotchie J, Fitzer-Attas C. Mechanisms compensating for dopamine loss in early Parkinson disease. *Neurology* 2009; 72(7 Suppl):S32-S38.
- (216) Bezard E, Ravenscroft P, Gross CE, Crossman AR, Brotchie JM. Upregulation of striatal preproenkephalin gene expression occurs before the appearance of parkinsonian signs in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine monkeys. *Neurobiol Dis* 2001; 8(2):343-350.
- (217) Maneuf YP, Mitchell IJ, Crossman AR, Brotchie JM. On the role of enkephalin cotransmission in the GABAergic striatal efferents to the globus pallidus. *Exp Neurol* 1994; 125(1):65-71.
- (218) Bezard E, Boraud T, Bioulac B, Gross CE. Involvement of the subthalamic nucleus in glutamatergic compensatory mechanisms. *Eur J Neurosci* 1999; 11(6):2167-2170.
- (219) Vila M, Perier C, Feger J, Yelnik J, Faucheux B, Ruberg M et al. Evolution of changes in neuronal activity in the subthalamic nucleus of rats with unilateral lesion of the substantia nigra assessed by metabolic and electrophysiological measurements. *Eur J Neurosci* 2000; 12(1):337-344.
- (220) Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Lanciego JL, Rodriguez DM. How does Parkinson's disease begin? The role of compensatory mechanisms. *Trends Neurosci* 2004; 27(3):125-127.
- (221) Whone AL, Moore RY, Piccini PP, Brooks DJ. Plasticity of the nigropallidal pathway in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 53(2):206-213.
- (222) Maetzler W, Liepelt I, Berg D. Progression of Parkinson's disease in the clinical phase: potential markers. *Lancet Neurol* 2009; 8(12):1158-1171.

- (223) Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 1967; 17(5):427-442.
- (224) Marttila RJ, Rinne UK. Disability and progression in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 1977; 56(2):159-169.
- (225) Emre M. Dementia associated with Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2003; 2(4):229-237.
- (226) Harrison MB, Wylie SA, Frysinger RC, Patrie JT, Huss DS, Currie LJ et al. UPDRS activity of daily living score as a marker of Parkinson's disease progression. *Mov Disord* 2009; 24(2):224-230.
- (227) Marek K, Jennings D, Tamagnan G, Seibyl J. Biomarkers for Parkinson's disease: tools to assess Parkinson's disease onset and progression. *Ann Neurol* 2008; 64 Suppl 2:S111-21.:S111-S121.
- (228) Stoessl AJ. Positron emission tomography in premotor Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2007; 13 Suppl 3:S421-S424.
- (229) Pavese N, Brooks DJ. Imaging neurodegeneration in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792(7):722-729.
- (230) Piccini P, Whone A. Functional brain imaging in the differential diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2004; 3(5):284-290.
- (231) Kumakura Y, Cumming P. PET studies of cerebral levodopa metabolism: a review of clinical findings and modeling approaches. *Neuroscientist* 2009; 15(6):635-650.
- (232) Snow BJ, Tooyama I, McGeer EG, Yamada T, Calne DB, Takahashi H et al. Human positron emission tomographic [18F]fluorodopa studies correlate with dopamine cell counts and levels. *Ann Neurol* 1993; 34(3):324-330.
- (233) Pate BD, Kawamata T, Yamada T, McGeer EG, Hewitt KA, Snow BJ et al. Correlation of striatal fluorodopa uptake in the MPTP monkey with dopaminergic indices. *Ann Neurol* 1993; 34(3):331-338.
- (234) Nahmias C, Garnett ES, Firnau G, Lang A. Striatal dopamine distribution in parkinsonian patients during life. *J Neurol Sci* 1985; 69(3):223-230.
- (235) Brooks DJ, Ibanez V, Sawle GV, Quinn N, Lees AJ, Mathias CJ et al. Differing patterns of striatal 18F-dopa uptake in Parkinson's disease, multiple system atrophy, and progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* 1990; 28(4):547-555.
- (236) Silveira-Moriyama L, Schwingenschuh P, O'Donnell A, Schneider SA, Mir P, Carrillo F et al. Olfaction in patients with suspected parkinsonism and scans without evidence of dopaminergic deficit (SWEDDs). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009; 80(7):744-748.

- (237) Schneider SA, Edwards MJ, Mir P, Cordivari C, Hooker J, Dickson J et al. Patients with adult-onset dystonic tremor resembling parkinsonian tremor have scans without evidence of dopaminergic deficit (SWEDDs). *Mov Disord* 2007; 22(15):2210-2215.
- (238) Morrish PK, Sawle GV, Brooks DJ. An [18F]dopa-PET and clinical study of the rate of progression in Parkinson's disease. *Brain* 1996; 119(Pt 2):585-591.
- (239) Fuente-Fernandez R, Pal PK, Vingerhoets FJ, Kishore A, Schulzer M, Mak EK et al. Evidence for impaired presynaptic dopamine function in parkinsonian patients with motor fluctuations. *J Neural Transm* 2000; 107(1):49-57.
- (240) Vingerhoets FJ, Snow BJ, Lee CS, Schulzer M, Mak E, Calne DB. Longitudinal fluorodopa positron emission tomographic studies of the evolution of idiopathic parkinsonism. *Ann Neurol* 1994; 36(5):759-764.
- (241) Morrish PK, Rakshi JS, Bailey DL, Sawle GV, Brooks DJ. Measuring the rate of progression and estimating the preclinical period of Parkinson's disease with [18F]dopa PET. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64(3):314-319.
- (242) Nurmi E, Ruottinen HM, Bergman J, Haaparanta M, Solin O, Sonninen P et al. Rate of progression in Parkinson's disease: a 6-[18F]fluoro-L-dopa PET study. *Mov Disord* 2001; 16(4):608-615.
- (243) Hilker R, Schweitzer K, Coburger S, Ghaemi M, Weisenbach S, Jacobs AH et al. Nonlinear progression of Parkinson disease as determined by serial positron emission tomographic imaging of striatal fluorodopa F 18 activity. *Arch Neurol* 2005; 62(3):378-382.
- (244) Bruck A, Aalto S, Nurmi E, Vahlberg T, Bergman J, Rinne JO. Striatal subregional 6-[18F]fluoro-L-dopa uptake in early Parkinson's disease: a two-year follow-up study. *Mov Disord* 2006; 21(7):958-963.
- (245) Bruck A, Aalto S, Rauhala E, Bergman J, Marttila R, Rinne JO. A follow-up study on 6-[18F]fluoro-L-dopa uptake in early Parkinson's disease shows nonlinear progression in the putamen. *Mov Disord* 2009; 24(7):1009-1015.
- (246) Nandhagopal R, Kuramoto L, Schulzer M, Mak E, Cragg J, Lee CS et al. Longitudinal progression of sporadic Parkinson's disease: a multi-tracer positron emission tomography study. *Brain* 2009; 132(Pt 11):2970-2979.
- (247) Marshall V, Grosset D. Role of dopamine transporter imaging in routine clinical practice. *Mov Disord* 2003; 18(12):1415-1423.
- (248) Troiano AR, Schulzer M, Fuente-Fernandez R, Mak E, McKenzie J, Sossi V et al. Dopamine transporter PET in normal aging: dopamine transporter decline and its possible role in preservation of motor function. *Synapse* 2010; 64(2):146-151.

- (249) Frey KA, Koeppe RA, Kilbourn MR, Vander Borcht TM, Albin RL, Gilman S et al. Presynaptic monoaminergic vesicles in Parkinson's disease and normal aging. *Ann Neurol* 1996; 40(6):873-884.
- (250) Lee CS, Schulzer M, Fuente-Fernandez R, Mak E, Kuramoto L, Sossi V et al. Lack of regional selectivity during the progression of Parkinson disease: implications for pathogenesis. *Arch Neurol* 2004; 61(12):1920-1925.
- (251) Kilbourn MR, Frey KA, Vander BT, Sherman PS. Effects of dopaminergic drug treatments on in vivo radioligand binding to brain vesicular monoamine transporters. *Nucl Med Biol* 1996; 23(4):467-471.
- (252) Vander BT, Kilbourn M, Desmond T, Kuhl D, Frey K. The vesicular monoamine transporter is not regulated by dopaminergic drug treatments. *Eur J Pharmacol* 1995; 294(2-3):577-583.
- (253) Fuente-Fernandez R, Sossi V, McCormick S, Schulzer M, Ruth TJ, Stoessl AJ. Visualizing vesicular dopamine dynamics in Parkinson's disease. *Synapse* 2009; 63(8):713-716.
- (254) Brooks DJ, Ibanez V, Sawle GV, Playford ED, Quinn N, Mathias CJ et al. Striatal D2 receptor status in patients with Parkinson's disease, striatonigral degeneration, and progressive supranuclear palsy, measured with 11C-raclopride and positron emission tomography. *Ann Neurol* 1992; 31(2):184-192.
- (255) Sawle GV, Playford ED, Brooks DJ, Quinn N, Frackowiak RS. Asymmetrical pre-synaptic and post-synaptic changes in the striatal dopamine projection in dopa naive parkinsonism. Diagnostic implications of the D2 receptor status. *Brain* 1993; 116(Pt 4):853-867.
- (256) Kaasinen V, Ruottinen HM, Nagren K, Lehtikainen P, Oikonen V, Rinne JO. Upregulation of putaminal dopamine D2 receptors in early Parkinson's disease: a comparative PET study with [11C] raclopride and [11C]N-methylspiperone. *J Nucl Med* 2000; 41(1):65-70.
- (257) Antonini A, Leenders KL, Vontobel P, Maguire RP, Missimer J, Psylla M et al. Complementary PET studies of striatal neuronal function in the differential diagnosis between multiple system atrophy and Parkinson's disease. *Brain* 1997; 120(Pt 12):2187-2195.
- (258) Piccini P, Brooks DJ. New developments of brain imaging for Parkinson's disease and related disorders. *Mov Disord* 2006; 21(12):2035-2041.
- (259) Brooks DJ. Imaging non-dopaminergic function in Parkinson's disease. *Mol Imaging Biol* 2007; 9(4):217-222.
- (260) Remy P, Doder M, Lees A, Turjanski N, Brooks D. Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. *Brain* 2005; 128(Pt 6):1314-1322.

- (261) Brooks DJ. Assessment of Parkinson's disease with imaging. *Parkinsonism Relat Disord* 2007; 13 Suppl 3:S268-S275.
- (262) Kuhl DE, Minoshima S, Fessler JA, Frey KA, Foster NL, Fiebert EP et al. In vivo mapping of cholinergic terminals in normal aging, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1996; 40(3):399-410.
- (263) Bohnen NI, Kaufer DI, Ivanco LS, Lopresti B, Koeppe RA, Davis JG et al. Cortical cholinergic function is more severely affected in parkinsonian dementia than in Alzheimer disease: an in vivo positron emission tomographic study. *Arch Neurol* 2003; 60(12):1745-1748.
- (264) Hilker R, Thomas AV, Klein JC, Weisenbach S, Kalbe E, Burghaus L et al. Dementia in Parkinson disease: functional imaging of cholinergic and dopaminergic pathways. *Neurology* 2005; 65(11):1716-1722.
- (265) Eckert T, Eidelberg D. Neuroimaging and therapeutics in movement disorders. *NeuroRx* 2005; 2(2):361-371.
- (266) Eckert T, Tang C, Eidelberg D. Assessment of the progression of Parkinson's disease: a metabolic network approach. *Lancet Neurol* 2007; 6(10):926-932.
- (267) Ravina B, Eidelberg D, Ahlskog JE, Albin RL, Brooks DJ, Carbon M et al. The role of radiotracer imaging in Parkinson disease. *Neurology* 2005; 64(2):208-215.
- (268) Tang CC, Poston KL, Eckert T, Feigin A, Frucht S, Gudesblatt M et al. Differential diagnosis of parkinsonism: a metabolic imaging study using pattern analysis. *Lancet Neurol* 2010; 9(2):149-158.
- (269) Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R. Modification of Parkinsonism--chronic treatment with L-dopa. *N Engl J Med* 1969; 280(7):337-345.
- (270) Cotzias GC, Van Woert MH, Schiffer LM. Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N Engl J Med* 1967; 276(7):374-379.
- (271) Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med* 1998; 339(16):1130-1143.
- (272) Lewitt PA. Levodopa for the treatment of Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2008; 359(23):2468-2476.
- (273) Antonini A, Tolosa E, Mizuno Y, Yamamoto M, Poewe WH. A reassessment of risks and benefits of dopamine agonists in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2009; 8(10):929-937.
- (274) Olanow CW, Rascol O, Hauser R, Feigin PD, Jankovic J, Lang A et al. A double-blind, delayed-start trial of rasagiline in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2009; 361(13):1268-1278.

- (275) Clarke CE. Neuroprotection and pharmacotherapy for motor symptoms in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2004; 3(8):466-474.
- (276) Schapira AH. Present and future drug treatment for Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76(11):1472-1478.
- (277) Olanow CW, Stern MB, Sethi K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). *Neurology* 2009; 72(21 Suppl 4):S1-136.
- (278) Cohen G. Monoamine oxidase, hydrogen peroxide, and Parkinson's disease. *Adv Neurol* 1987; 45:119-125.
- (279) Fahn S, Cohen G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol* 1992; 32(6):804-812.
- (280) Fahn S. Is levodopa toxic? *Neurology* 1996; 47(6 Suppl 3):S184-S195.
- (281) Ahlskog JE. Beating a dead horse: dopamine and Parkinson disease. *Neurology* 2007; 69(17):1701-1711.
- (282) Schapira AH. The clinical relevance of levodopa toxicity in the treatment of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2008; 23 Suppl 3:S515-S520.
- (283) Michel PP, Hefti F. Toxicity of 6-hydroxydopamine and dopamine for dopaminergic neurons in culture. *J Neurosci Res* 1990; 26(4):428-435.
- (284) Tanaka M, Sotomatsu A, Kanai H, Hirai S. Dopa and dopamine cause cultured neuronal death in the presence of iron. *J Neurol Sci* 1991; 101(2):198-203.
- (285) Mena MA, Pardo B, Casarejos MJ, Fahn S, Garcia dY. Neurotoxicity of levodopa on catecholamine-rich neurons. *Mov Disord* 1992; 7(1):23-31.
- (286) Cheng N, Maeda T, Kume T, Kaneko S, Kochiyama H, Akaike A et al. Differential neurotoxicity induced by L-DOPA and dopamine in cultured striatal neurons. *Brain Res* 1996; 743(1-2):278-283.
- (287) Ziv I, Zilkha-Falb R, Offen D, Shirvan A, Barzilai A, Melamed E. Levodopa induces apoptosis in cultured neuronal cells--a possible accelerator of nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease? *Mov Disord* 1997; 12(1):17-23.
- (288) Mosharov EV, Larsen KE, Kanter E, Phillips KA, Wilson K, Schmitz Y et al. Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and alpha-synuclein causes selective death of substantia nigra neurons. *Neuron* 2009; 62(2):218-229.
- (289) Mytilineou C, Han SK, Cohen G. Toxic and protective effects of L-dopa on mesencephalic cell cultures. *J Neurochem* 1993; 61(4):1470-1478.

- (290) Han SK, Mytilineou C, Cohen G. L-DOPA up-regulates glutathione and protects mesencephalic cultures against oxidative stress. *J Neurochem* 1996; 66(2):501-510.
- (291) Mena MA, Davila V, Sulzer D. Neurotrophic effects of L-DOPA in postnatal midbrain dopamine neuron/cortical astrocyte cocultures. *J Neurochem* 1997; 69(4):1398-1408.
- (292) Clement MV, Long LH, Ramalingam J, Halliwell B. The cytotoxicity of dopamine may be an artefact of cell culture. *J Neurochem* 2002; 81(3):414-421.
- (293) Maharaj H, Sukhdev MD, Scheepers M, Mokokong R, Daya S. L-DOPA administration enhances 6-hydroxydopamine generation. *Brain Res* 2005; 1063(2):180-186.
- (294) Perry TL, Yong VW, Ito M, Foulks JG, Wall RA, Godin DV et al. Nigrostriatal dopaminergic neurons remain undamaged in rats given high doses of L-DOPA and carbidopa chronically. *J Neurochem* 1984; 43(4):990-993.
- (295) Lyras L, Zeng BY, McKenzie G, Pearce RK, Halliwell B, Jenner P. Chronic high dose L-DOPA alone or in combination with the COMT inhibitor entacapone does not increase oxidative damage or impair the function of the nigro-striatal pathway in normal cynomolgus monkeys. *J Neural Transm* 2002; 109(1):53-67.
- (296) Blunt SB, Jenner P, Marsden CD. Suppressive effect of L-dopa on dopamine cells remaining in the ventral tegmental area of rats previously exposed to the neurotoxin 6-hydroxydopamine. *Mov Disord* 1993; 8(2):129-133.
- (297) Jeon MY, Lee WY, Kang HY, Chung EJ. The effects of L-3,4-dihydroxyphenylalanine and dopamine agonists on dopamine neurons in the progressive hemiparkinsonian rat models. *Neurol Res* 2007; 29(3):289-295.
- (298) Murer MG, Dziewczapolski G, Menalled LB, Garcia MC, Agid Y, Gershanik O et al. Chronic levodopa is not toxic for remaining dopamine neurons, but instead promotes their recovery, in rats with moderate nigrostriatal lesions. *Ann Neurol* 1998; 43(5):561-575.
- (299) 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; 16(3):424-434.
- (300) Shin JY, Park HJ, Ahn YH, Lee PH. Neuroprotective effect of L-dopa on dopaminergic neurons is comparable to pramipexol in MPTP-treated animal model of Parkinson's disease: a direct comparison study. *J Neurochem* 2009; 111(4):1042-1050.
- (301) Dopamine transporter brain imaging to assess the effects of pramipexole vs levodopa on Parkinson disease progression. *JAMA* 2002; 287(13):1653-1661.

- (302) Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: A randomized controlled trial. Parkinson Study Group. JAMA 2000; 284(15):1931-1938.
- (303) Whone AL, Watts RL, Stoessl AJ, Davis M, Reske S, Nahmias C et al. Slower progression of Parkinson's disease with ropinirole versus levodopa: The REAL-PET study. Ann Neurol 2003; 54(1):93-101.
- (304) Fahn S, Oakes D, Shoulson I, Kieburtz K, Rudolph A, Lang A et al. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. N Engl J Med 2004; 351(24):2498-2508.
- (305) Fahn S. Does levodopa slow or hasten the rate of progression of Parkinson's disease? J Neurol 2005; 252 Suppl 4:IV37-IV42.
- (306) Ahlskog JE. Slowing Parkinson's disease progression: recent dopamine agonist trials. Neurology 2003; 60(3):381-389.
- (307) Fuente-Fernandez R, Schulzer M, Mak E, Sossi V. Trials of neuroprotective therapies for Parkinson's disease: Problems and limitations. Parkinsonism Relat Disord 2010; 16(6):365-369.
- (308) Biju G, Fuente-Fernandez R. Dopaminergic function and progression of Parkinson's disease: PET findings. Parkinsonism Relat Disord 2009; 15 Suppl 4:S38-40.
- (309) Luquin MR, Montoro RJ, Guillen J, Saldise L, Insausti R, Del Rio J et al. Recovery of chronic parkinsonian monkeys by autotransplants of carotid body cell aggregates into putamen. Neuron 1999; 22(4):743-750.
- (310) Collantes M, Prieto E, Penuelas I, Blesa J, Juri C, Marti-Climent JM et al. New MRI, 18F-DOPA and 11C-(+)-alpha-dihydrotetrabenazine templates for Macaca fascicularis neuroimaging: advantages to improve PET quantification. Neuroimage 2009; 47(2):533-539.
- (311) Patlak CS, Blasberg RG, Fenstermacher JD. Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data. J Cereb Blood Flow Metab 1983; 3(1):1-7.
- (312) Gispert JD, Pascau J, Reig S, Martinez-Lazaro R, Molina V, Garcia-Barreno P et al. Influence of the normalization template on the outcome of statistical parametric mapping of PET scans. Neuroimage 2003; 19(3):601-612.
- (313) Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. APMIS 1988; 96(10):857-881.
- (314) Rakshi JS, Pavese N, Uema T, Ito K, Morrish PK, Bailey DL et al. A comparison of the progression of early Parkinson's disease in patients started

- on ropinirole or L-dopa: an 18F-dopa PET study. *J Neural Transm* 2002; 109(12):1433-1443.
- (315) Tanner CM, Langston JW. Do environmental toxins cause Parkinson's disease? A critical review. *Neurology* 1990; 40(10 Suppl 3):17-30.
- (316) Eidelberg E, Brooks BA, Morgan WW, Walden JG, Kokemoor RH. Variability and functional recovery in the N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of parkinsonism in monkeys. *Neuroscience* 1986; 18(4):817-822.
- (317) Kurlan R, Kim MH, Gash DM. The time course and magnitude of spontaneous recovery of parkinsonism produced by intracarotid administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine to monkeys. *Ann Neurol* 1991; 29(6):677-679.
- (318) Collier TJ, Lipton J, Daley BF, Palfi S, Chu Y, Sortwell C et al. Aging-related changes in the nigrostriatal dopamine system and the response to MPTP in nonhuman primates: diminished compensatory mechanisms as a prelude to parkinsonism. *Neurobiol Dis* 2007; 26(1):56-65.
- (319) McCormack AL, Di Monte DA, Delfani K, Irwin I, Delaney LE, Langston WJ et al. Aging of the nigrostriatal system in the squirrel monkey. *J Comp Neurol* 2004; 471(4):387-395.
- (320) Ovadia A, Zhang Z, Gash DM. Increased susceptibility to MPTP toxicity in middle-aged rhesus monkeys. *Neurobiol Aging* 1995; 16(6):931-937.
- (321) Rose S, Nomoto M, Jackson EA, Gibb WR, Jaehnig P, Jenner P et al. Age-related effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine treatment of common marmosets. *Eur J Pharmacol* 1993; 230(2):177-185.
- (322) Perez-Otano I, Herrero MT, Oset C, De Ceballos ML, Luquin MR, Obeso JA et al. Extensive loss of brain dopamine and serotonin induced by chronic administration of MPTP in the marmoset. *Brain Res* 1991; 567(1):127-132.
- (323) Imbert C, Bezard E, Guitraud S, Boraud T, Gross CE. Comparison of eight clinical rating scales used for the assessment of MPTP-induced parkinsonism in the Macaque monkey. *J Neurosci Methods* 2000; 96(1):71-76.
- (324) Guttman M, Yong VW, Kim SU, Calne DB, Martin WR, Adam MJ et al. Asymptomatic striatal dopamine depletion: PET scans in unilateral MPTP monkeys. *Synapse* 1988; 2(5):469-473.
- (325) Doudet DJ, Miyake H, Finn RT, McLellan CA, Aigner TG, Wan RQ et al. 6-18F-L-dopa imaging of the dopamine neostriatal system in normal and clinically normal MPTP-treated rhesus monkeys. *Exp Brain Res* 1989; 78(1):69-80.
- (326) Schneider JS, Lidsky TI, Hawks T, Mazziotta JC, Hoffman JM. Differential recovery of volitional motor function, lateralized cognitive function, dopamine agonist-induced rotation and dopaminergic parameters in monkeys made

- hemi-parkinsonian by intracarotid MPTP infusion. *Brain Res* 1995;672(1-2):112-117.
- (327) Melega WP, Raleigh MJ, Stout DB, DeSalles AA, Cherry SR, Blurton-Jones M et al. Longitudinal behavioral and 6-[18F]fluoro-L-DOPA-PET assessment in MPTP-hemiparkinsonian monkeys. *Exp Neurol* 1996; 141(2):318-329.
- (328) Doudet DJ, Chan GL, Holden JE, McGeer EG, Aigner TA, Wyatt RJ et al. 6-[18F]Fluoro-L-DOPA PET studies of the turnover of dopamine in MPTP-induced parkinsonism in monkeys. *Synapse* 1998; 29(3):225-232.
- (329) Yee RE, Irwin I, Milonas C, Stout DB, Huang SC, Shoghi-Jadid K et al. Novel observations with FDOPA-PET imaging after early nigrostriatal damage. *Mov Disord* 2001; 16(5):838-848.
- (330) Yee RE, Huang SC, Stout DB, Irwin I, Shoghi-Jadid K, Togasaki DM et al. Nigrostriatal reduction of aromatic L-amino acid decarboxylase activity in MPTP-treated squirrel monkeys: in vivo and in vitro investigations. *J Neurochem* 2000; 74(3):1147-1157.
- (331) Poyot T, Conde F, Gregoire MC, Frouin V, Coulon C, Fuseau C et al. Anatomic and biochemical correlates of the dopamine transporter ligand 11C-PE2I in normal and parkinsonian primates: comparison with 6-[18F]fluoro-L-dopa. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21(7):782-792.
- (332) Blesa J, Juri C, Collantes M, Penuelas I, Prieto E, Iglesias E et al. Progression of dopaminergic depletion in a model of MPTP-induced Parkinsonism in non-human primates. An (18)F-DOPA and (11)C-DTBZ PET study. *Neurobiol Dis* 2010; 38(3):456-463.
- (333) Snow BJ, Vingerhoets FJ, Langston JW, Tetrud JW, Sossi V, Calne DB. Pattern of dopaminergic loss in the striatum of humans with MPTP induced parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 68(3):313-316.
- (334) Schneider JS. Levodopa-induced dyskinesias in parkinsonian monkeys: relationship to extent of nigrostriatal damage. *Pharmacol Biochem Behav* 1989; 34(1):193-196.
- (335) Di Monte DA, McCormack A, Petzinger G, Janson AM, Quik M, Langston WJ. Relationship among nigrostriatal denervation, parkinsonism, and dyskinesias in the MPTP primate model. *Mov Disord* 2000; 15(3):459-466.
- (336) Pearce RK, Heikkila M, Linden IB, Jenner P. L-dopa induces dyskinesia in normal monkeys: behavioural and pharmacokinetic observations. *Psychopharmacology (Berl)* 2001; 156(4):402-409.
- (337) Togasaki DM, Tan L, Protell P, Di Monte DA, Quik M, Langston JW. Levodopa induces dyskinesias in normal squirrel monkeys. *Ann Neurol* 2001; 50(2):254-257.

- (338) Hadjiconstantinou M, Wemlinger TA, Sylvia CP, Hubble JP, Neff NH. Aromatic L-amino acid decarboxylase activity of mouse striatum is modulated via dopamine receptors. *J Neurochem* 1993; 60(6):2175-2180.
- (339) Cho S, Neff NH, Hadjiconstantinou M. Regulation of tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase by dopaminergic drugs. *Eur J Pharmacol* 1997; 323(2-3):149-157.
- (340) Cho S, Duchemin AM, Neff NH, Hadjiconstantinou M. Tyrosine hydroxylase, aromatic L-amino acid decarboxylase and dopamine metabolism after chronic treatment with dopaminergic drugs. *Brain Res* 1999; 830(2):237-245.
- (341) Hadjiconstantinou M, Neff NH. Enhancing aromatic L-amino acid decarboxylase activity: implications for L-DOPA treatment in Parkinson's disease. *CNS Neurosci Ther* 2008; 14(4):340-351.
- (342) Fisher A, Starr MS. Opposite effects of glutamate antagonists and antiparkinsonian drugs on the activities of DOPA decarboxylase and 5-HTP decarboxylase in the rat brain. *Brain Res* 2000; 868(2):268-274.
- (343) Torstenson R, Hartvig P, Langstrom B, Westerberg G, Tedroff J. Differential effects of levodopa on dopaminergic function in early and advanced Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1997; 41(3):334-340.
- (344) Ceravolo R, Piccini P, Bailey DL, Jorga KM, Bryson H, Brooks DJ. 18F-dopa PET evidence that tolcapone acts as a central COMT inhibitor in Parkinson's disease. *Synapse* 2002; 43(3):201-207.
- (345) Lopez A, Munoz A, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. Mechanisms of the effects of exogenous levodopa on the dopamine-denervated striatum. *Neuroscience* 2001; 103(3):639-651.
- (346) Gaspar P, Febvret A, Colombo J. Serotonergic sprouting in primate MTP-induced hemiparkinsonism. *Exp Brain Res* 1993; 96(1):100-106.
- (347) Melamed E, Hefti F, Wurtman RJ. Nonaminergic striatal neurons convert exogenous L-dopa to dopamine in parkinsonism. *Ann Neurol* 1980; 8(6):558-563.
- (348) Melamed E, Hefti F, Pettibone DJ, Liebman J, Wurtman RJ. Aromatic L-amino acid decarboxylase in rat corpus striatum: implications for action of L-dopa in parkinsonism. *Neurology* 1981; 31(6):651-655.
- (349) Melamed E, Hefti F, Liebman J, Schlosberg AJ, Wurtman RJ. Serotonergic neurones are not involved in action of L-dopa in Parkinson's disease. *Nature* 1980; 283(5749):772-774.
- (350) Ugrumov MV. Non-dopaminergic neurons partly expressing dopaminergic phenotype: distribution in the brain, development and functional significance. *J Chem Neuroanat* 2009; 38(4):241-256.

- (351) Fuente-Fernandez R, Sossi V, Huang Z, Furtado S, Lu JQ, Calne DB et al. Levodopa-induced changes in synaptic dopamine levels increase with progression of Parkinson's disease: implications for dyskinesias. *Brain* 2004; 127(Pt 12):2747-2754.
- (352) Dubach M, Schmidt R, Kunkel D, Bowden DM, Martin R, German DC. Primate neostriatal neurons containing tyrosine hydroxylase: immunohistochemical evidence. *Neurosci Lett* 1987; 75(2):205-210.
- (353) Darmopil S, Muneton-Gomez VC, De Ceballos ML, Bernson M, Moratalla R. Tyrosine hydroxylase cells appearing in the mouse striatum after dopamine denervation are likely to be projection neurones regulated by L-DOPA. *Eur J Neurosci* 2008; 27(3):580-592.
- (354) Cossette M, Levesque D, Parent A. Neurochemical characterization of dopaminergic neurons in human striatum. *Parkinsonism Relat Disord* 2005; 11(5):277-286.
- (355) Tande D, Hoglinger G, Debeir T, Freundlieb N, Hirsch EC, Francois C. New striatal dopamine neurons in MPTP-treated macaques result from a phenotypic shift and not neurogenesis. *Brain* 2006; 129(Pt 5):1194-1200.
- (356) Carvey PM, Ptak LR, Nath ST, Sierens DK, Mufson EJ, Goetz CG et al. Striatal extracts from patients with Parkinson's disease promote dopamine neuron growth in mesencephalic cultures. *Exp Neurol* 1993; 120(1):149-152.
- (357) Ferrario JE, Taravini IR, Mourlevat S, Stefano A, Delfino MA, Raisman-Vozari R et al. Differential gene expression induced by chronic levodopa treatment in the striatum of rats with lesions of the nigrostriatal system. *J Neurochem* 2004; 90(6):1348-1358.
- (358) Ferrario JE, Rojas-Mayorquin AE, Saldana-Ortega M, Salum C, Gomes MZ, Hunot S et al. Pleiotrophin receptor RPTP-zeta/beta expression is up-regulated by L-DOPA in striatal medium spiny neurons of parkinsonian rats. *J Neurochem* 2008; 107(2):443-452.
- (359) Tillerson JL, Caudle WM, Reveron ME, Miller GW. Detection of behavioral impairments correlated to neurochemical deficits in mice treated with moderate doses of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Exp Neurol* 2002; 178(1):80-90.
- (360) Chen MK, Kuwabara H, Zhou Y, Adams RJ, Brasic JR, McGlothan JL et al. VMAT2 and dopamine neuron loss in a primate model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2008; 105(1):78-90.
- (361) Jordan S, Eberling JL, Bankiewicz KS, Rosenberg D, Coxson PG, VanBrocklin HF et al. 6-[18F]fluoro-L-m-tyrosine: metabolism, positron emission tomography kinetics, and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine lesions in primates. *Brain Res* 1997; 750(1-2):264-276.

- (362) Eberling JL, Jagust WJ, Taylor S, Bringas J, Pivrotto P, VanBrocklin HF et al. A novel MPTP primate model of Parkinson's disease: neurochemical and clinical changes. *Brain Res* 1998; 805(1-2):259-262.
- (363) Eberling JL, Bankiewicz KS, O'Neil JP, Jagust WJ. PET 6-[F]fluoro-L-m-tyrosine Studies of Dopaminergic Function in Human and Nonhuman Primates. *Front Hum Neurosci* 2007; 1:9.
- (364) Eberling JL, Bankiewicz KS, Jordan S, VanBrocklin HF, Jagust WJ. PET studies of functional compensation in a primate model of Parkinson's disease. *Neuroreport* 1997; 8(12):2727-2733.
- (365) Eberling JL, Pivrotto P, Bringas J, Bankiewicz KS. Tremor is associated with PET measures of nigrostriatal dopamine function in MPTP-lesioned monkeys. *Exp Neurol* 2000; 165(2):342-346.
- (366) Hantraye P, Brownell AL, Elmaleh D, Spealman RD, Wullner U, Brownell GL et al. Dopamine fiber detection by [11C]-CFT and PET in a primate model of parkinsonism. *Neuroreport* 1992; 3(3):265-268.
- (367) Wullner U, Pakzaban P, Brownell AL, Hantraye P, Burns L, Shoup T et al. Dopamine terminal loss and onset of motor symptoms in MPTP-treated monkeys: a positron emission tomography study with 11C-CFT. *Exp Neurol* 1994; 126(2):305-309.
- (368) Brownell AL, Jenkins BG, Elmaleh DR, Deacon TW, Spealman RD, Isacson O. Combined PET/MRS brain studies show dynamic and long-term physiological changes in a primate model of Parkinson disease. *Nat Med* 1998; 4(11):1308-1312.
- (369) Brownell AL, Canales K, Chen YI, Jenkins BG, Owen C, Livni E et al. Mapping of brain function after MPTP-induced neurotoxicity in a primate Parkinson's disease model. *Neuroimage* 2003; 20(2):1064-1075.
- (370) Doudet DJ, Holden JE, Jivan S, McGeer E, Wyatt RJ. In vivo PET studies of the dopamine D2 receptors in rhesus monkeys with long-term MPTP-induced parkinsonism. *Synapse* 2000; 38(2):105-113.
- (371) Chefer SI, Kimes AS, Matochik JA, Horti AG, Kurian V, Shumway D et al. Estimation of D2-like receptor occupancy by dopamine in the putamen of hemiparkinsonian Monkeys. *Neuropsychopharmacology* 2008; 33(2):270-278.
- (372) Doudet DJ, Jivan S, Ruth TJ, Holden JE. Density and affinity of the dopamine D2 receptors in aged symptomatic and asymptomatic MPTP-treated monkeys: PET studies with [11C]raclopride. *Synapse* 2002; 44(3):198-202.
- (373) Doudet DJ, Jivan S, Ruth TJ, Wyatt RJ. In vivo PET studies of the dopamine D1 receptors in rhesus monkeys with long-term MPTP-induced Parkinsonism. *Synapse* 2002; 44(2):111-115.

- (374) Chen MK, Kuwabara H, Zhou Y, Adams RJ, Brasic JR, McGlothan JL et al. VMAT2 and dopamine neuron loss in a primate model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2008; 105(1):78-90.

Tabla: Estudios de PET para la valoración de la función dopaminérgica realizados en el modelo del primate no humano intoxicado con MPTP

Estudio	Técnica	Marcador	Resultados
(324)(325)	PET ¹⁸ F-fluorodopa	AAAC	Disminución de la captación estriatal de ¹⁸ F-fluorodopa en monos asintomáticos tratados con MPTP. Mayor afectación del putamen que del caudado.
(233)	PET ¹⁸ F-fluorodopa	AAAC	Correlación entre la captación de ¹⁸ F-fluorodopa estriatal y el número y tamaño de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc, así como con los niveles de dopamina en el estriado de los macacos tratados con MPTP.
(326)	PET ¹⁸ F-fluorodopa	AAAC	No hay cambios en la captación de ¹⁸ F-fluorodopa estriatal en monos con un hemiparkinsonismo inducido por MPTP tras la presencia de recuperación motora espontánea.
(327)	PET ¹⁸ F-fluorodopa	AAAC	La captación estriatal de ¹⁸ F-fluorodopa no cambia en monos con un hemiparkinsonismo inducido por MPTP después de 11 meses de aplicada la neurotoxina.
(328)	PET ¹⁸ F-fluorodopa	AAAC	Aumento del recambio de dopamina en monos tratados con MPTP con respecto a los monos control. Dentro de los monos intoxicados, el recambio es mayor en los sintomáticos que en los asintomáticos.
(330)	PET ¹⁸ F-fluorodopa	AAAC	Correlación significativa entre la actividad de la DDC estriatal <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> en monos tratados con diferentes dosis de MPTP. No obstante, la actividad de la DDC <i>in vivo</i> es diez veces mayor que la valorada mediante el estudio de PET con ¹⁸ F-fluorodopa.
(329)	PET ¹⁸ F-fluorodopa	AAAC	En monos asintomáticos tratados con MPTP, la constante de captación de ¹⁸ F-fluorodopa (ki) se correlaciona con los niveles de dopamina estriatal, pero no con el número de neuronas dopaminérgicas de la SNpc. En los monos tratados con dosis menores no hay variaciones significativas del ki antes y después de la administración de MPTP, aunque existe degeneración nigroestriada.
(361-363)	PET ¹⁸ F-FMT	AAAC	Relación entre la captación de ¹⁸ F-FMT estriatal y la degeneración estriatal en monos tratados con MPTP.
(364)	PET ¹⁸ F-FMT	AAAC	En monos tratados con MPTP unilateralmente por vía intra-carotídea se produce una disminución de la captación del ¹⁸ F-FMT en el putamen ipsilateral, mientras en la SN del mismo lado se produce un aumento en las primeras semanas tras la infusión para retornar a los niveles previos al tratamiento a la 6-7 semanas.
(365)	PET ¹⁸ F-FMT	AAAC	La asimetría y severidad del temblor, así como los niveles de dopamina estriatal se correlacionan con la captación estriatal de ¹⁸ F-FMT en monos hemiparkinsonianos.
(366)	PET ¹¹ C-CFT	DAT	Los monos con un parkinsonismo grave mostraron una reducción de la unión estriatal del ¹¹ C-CFT del 94%, mientras que los animales asintomáticos tuvieron una reducción del 66%.
(367)	PET ¹¹ C-CFT	DAT	En monos tratados con MPTP los síntomas parkinsonianos comenzaron coincidiendo con una disminución del 70% en la unión del ¹¹ C-CFT con respecto al estudio basal.

Tabla: Estudios de PET para la valoración de la función dopaminérgica realizados en el modelo del primate no humano intoxicado con MPTP (Continuación)

Estudio	Técnica	Marcador	Resultados
(368)	PET ¹¹ C-CFT	DAT	En monos a los que se les administra una pauta crónica de MPTP, la captación estriatal de ¹¹ C-CFT disminuye a los 5-8 meses de terminado el tratamiento, permaneciendo estable posteriormente.
(331)	PET ¹¹ C-PE2I PET ¹⁸ F-fluorodopa	DAT AAAC	La captación estriatal de ¹¹ C-PE2I se correlaciona con la unión <i>in vitro</i> de este marcador, la captación de ¹⁸ F-fluorodopa estriatal y el número de neuronas dopaminérgicas del SNpc.
(369)	PET ¹¹ C-CFT PET ¹¹ C-raclopride	DAT Receptor D2	En los monos asintomáticos intoxicados con MPTP se produjo una disminución de la unión al DAT en el estriado del 60-65%. No hubo cambios en la unión del ¹¹ C-raclopride a los receptores D2.
(370;371)	PET ¹¹ C-raclopride	Receptor D2	Aumento de la unión del ¹¹ C-raclopride en el putamen de monos parkinsonianos, indicando una regulación al alza del receptor D2. Este aumento se mantiene en monos intoxicados con MPTP sin tratamiento dopaminérgico valorados 10 años tras la administración de la neurotoxina. No hay cambios en los monos asintomáticos tratados con MPTP.
(372)	PET ¹¹ C-raclopride	Receptor D2	El aumento de la unión del ¹¹ C-raclopride en el estriado de los monos parkinsonianos está mediado por un incremento en el número de receptores D2 y no por el aumento de la afinidad de éstos por el radiotrazador.
(373)	PET ¹¹ C-SCH23390	Receptor D1	Disminución de la unión del ¹¹ C-SCH23390 en el estriado de monos intoxicados con MPTP sintomáticos o asintomáticos, indicando una regulación a la baja del receptor D1.
(187)	PET ¹⁸ F-fluorodopa PET ¹¹ C-DTBZ PET ¹¹ C-metifenidato	AAAC VMAT2 DAT	En monos tratados con MPTP por vía sistémica la reducción de la unión a DAT en el estriado ventral fue mayor (-75%) que la disminución de la unión a VMAT2 o la captación de ¹⁸ F-fluorodopa (-65%). Este dato sugiere que existe una regulación a la baja del DAT tras la degeneración nigroestriatal.
(188)	PET ¹¹ C-PE2I PET ¹¹ C-levodopa PET ¹¹ C-raclopride	DAT AAAC Receptor D2	En monos tratados con MPTP el temblor comenzó coincidiendo con una disminución del 85% en la unión del ¹¹ C-PE2I y una disminución del 66% de la Ki de ¹¹ C-levodopa con respecto al estudio basal. No cambios en la unión del ¹¹ C-raclopride.
(374)	PET ¹¹ C-DTBZ PET ¹¹ C-CFT PET ¹¹ C-raclopride	VMAT2 DAT Receptor D2	En monos tratados con dosis crecientes de MPTP por vía sistémica se objetiva que el primer evento es la reducción de la unión del ¹¹ C-DTBZ, antes que se evidencien cambios en la unión al DAT. No hubo cambios en la unión del ¹¹ C-raclopride a los receptores D2 a lo largo del estudio.