

Mecanismes de neurodegeneració i neuroprotecció en models de parkinsonisme en rata

Blanca Cutillas Arroyo

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (**www.tdx.cat**) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (**www.tdx.cat**) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (**www.tdx.cat**) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



MECANISMES DE NEURODEGENERACIÓ I NEUROPROTECCIÓ EN MODELS DE PARKINSONISME EN RATA





Programa de doctorat de BIOMEDICINA Bieni 1999-2001

MECANISMES DE NEURODEGENERACIÓ I NEUROPROTECCIÓ EN MODELS DE PARKINSONISME EN RATA

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Santiago Ambrosio Viale a la Unitat de Bioquímica del Departament de Ciències Fisiològiques II de la Universitat de Barcelona

Blanca Cutillas Arroyo - Dr. Santiago Ambrosio Viale

Memòria presentada per Blanca Cutillas Arroyo Per a optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

A les meves imprescindibles amigues i Companyes, perquè sé que compto amb la seva Comprensió, recolzament, humor i alegria, Cada dia que passa creix el seu valor per a mi.

A tots els estimadíssims meus: Benjamín i Lili, Pedro, Barcelós i Villas, Als meus dos meravellosos fills Bernat i Lluc Al Xavier, el meu company de camí/ns.

Índex de continguts

| Presentació | 13 | | | |
|--|----|--|--|--|
| Capítol 1 - Introducció i Objetius | 17 | | | |
| La dopamina en el sistema nerviós central | 17 | | | |
| Els ganglis basals, rol, components i interconnexions | 20 | | | |
| Substància negra i vies dopaminèrgiques | 22 | | | |
| • L'estriat, centre de processament dels ganglis basals | 24 | | | |
| • Distribució regional de la dopamina i altres marcadors dopaminèrgics | 27 | | | |
| Metabolisme de la dopamina | 28 | | | |
| Autooxidació de la dopamina i formació de la neuromelanina | | | | |
| Receptors dopaminèrgics | 31 | | | |
| Desenvolupament i diferenciació de les vies dopaminèrgiques | 32 | | | |
| Activitat elèctrica de les neurones dopaminèrgiques | 34 | | | |
| La dopamina en la gratificació, l'addicció i l'aprenentatge | 37 | | | |
| Malalties relacionades amb la dopamina | 40 | | | |
| Parkinsonismes i malaltia de Parkinson idiopàtica o esporàdica (PD) | 41 | | | |
| • Epidemiologia de la PD | 42 | | | |
| • Clínica i diagnòstic de la PD | 42 | | | |
| • Aspectes neuropatològics i bioquímics de la PD | 45 | | | |
| • Tractament farmacològic de la PD | 48 | | | |
| • Tractament Quirúrgic de la PD | 50 | | | |
| • Etiologia de la PD: tòxic ambiental i genètica | 52 | | | |
| • Hipòtesis etiopatogèniques de la PD | 57 | | | |
| a) L'estrès oxidatiu | 57 | | | |
| b) La disfunció mitocondrial i el dèficit de ATP | 60 | | | |
| c) La inflamació crònica | 61 | | | |
| d) L'exitotoxicitat | 62 | | | |
| e) L'estrès proteolític | 62 | | | |
| f) Patògen neuròtrop | 64 | | | |
| g) Apoptosi | 64 | | | |
| Models animals experimentals de la malaltia de Parkinson | 65 | | | |
| • Models amb 6-OHDA | 66 | | | |
| • Models amb MPTP i MPP ⁺ | 67 | | | |

| • Nous models animals | 69 |
|--|----|
| Objectius | 71 |
| Capítol 2 Metodologia | |
| Animals i tractaments | 72 |
| Neurotovinos | |
| • MDD+ | |
| • 6-OHDA | 73 |
| Anestesia | |
| Tests comportamentals | |
| Test rotacional induït farmacològicament | |
| Estudi d'activitat motora | |
| Tècniques quirírgiques | |
| Lesió estereotàctica | |
| • Obtenció de teixit mesencefàlic embrionari i preparació de CFM | |
| • Microdiàlisi intracerebral in vivo. | |
| • Material i fabricació de la cànula | |
| Perfusió transcardíaca de solució fixadora i obtenció de teixits | |
| • Obtenció de teixit fresc per a determinacions bioquímiques | |
| Tècniques histològiques | |
| Parafinació de teixits cerebrals fitxats amb PFA | |
| • Tinció de Hematoxilina-Eosina | |
| • Tinció de Fluoro-Jade | |
| Tècniques Immunològiques | |
| Marcatge immunohistològic anti-tirosina-hidroxilasa | |
| Altres marcatges immunohistològics | |
| • Tinció de TUNEL | |
| Microscòpia electrònica | |
| Determinacions Bioquímiques | |
| • Determinació de catecolamines per HPLC | |
| • Determinació de GABA | |
| Citometria de limfòcits | |
| Experiments amb talls graixuts d'estriat (slices) | |
| • Preparació i incubació de talls gruixuts de teixit (slices | |
| • Detecció de l'activitat tirosina hidroxilasa | |
| • Determinació de l'activitat glutamina sintasa | |
| • Detecció de Malondialdehid | |

| • Determinació de dopamina | 89 |
|--|-------|
| • Determinació de NO | 89 |
| Experiments amb mitocondris | 89 |
| • Obtenció dels mitocondris | 89 |
| • Incubació dels mitocondris | 90 |
| • Estudi de l'activitat metabòlica per microcalorimetria | 90 |
| • Determinació del consum d'oxigen | 90 |
| • Mesura de la viabilitat mitocondrial | 91 |
| • Citometria mitocondrial | 91 |
| • Mesura del potencial de membrana mitocondrial | 91 |
| • Mesura del canvi de la grandària mitocondrial | 91 |
| • Mesura de l'activitat NADH-DH | 92 |
| • Mesura de l'activitat glutamat deshidrogenasa | 92 |
| • Producció de dopamina oxidada espontàniament | 92 |
| Experiments amb α -sinucleïna in vitro | 92 |
| • Producció de dopamina oxidada | 92 |
| • Incubacions i determinació in vitro de α-sinucleïna | 92 |
| Anàlisi estadístic | 93 |
| Capítol 3 - Resultats | 95 |
| 1. Posta a punt: mesura de la dopamina estriatal | 95 |
| 2. Lesió a substància negra amb 6-OHDA i amb MPP ⁺ | 96 |
| 3. Implantació de CFM en animals lesionats a SN amb 6-OHDA | 98 |
| 3.1.Caracterització funcional de les CFMs en distints medis de suspensió | 5 98 |
| 3.2. Ús de neurotrofines per augmentar la supervivència de les CFMs | . 100 |
| 3.3. Implantació de fibroblasts transfectats | . 101 |
| 4. Lesions al nucli estriat amb 6-OHDA i MPP ⁺ | . 102 |
| 4.1. Contingut de dopamina i els seus metabòlits | . 102 |
| 4.2. Contingut de GABA | . 103 |
| 4.3. Activitat Motora en lesions bilaterals | . 103 |
| 5. Microdiàlisi cerebral intraestriatal in vivo | . 104 |
| 5.1. Efecte del MPP ⁺ administrat a través de la cànula de microdiàlisi | . 104 |
| 5.2. Nivells extracel·lulars de dopamina | . 105 |
| 6. Lesió retrògrada de la SN per la 6-OHDA o l' MPP⁺ administrats a estriat | . 106 |
| 7. Protecció de la lesió retrògrada de la SN per zVAD i per PF-9601N | . 107 |
| 8. Implantació de CFM en animals lesionats amb MPP ⁺ a l'estriat. | |
| Efecte sobre els nivells de DA estriatal | . 109 |

| 9. Repercussions de la lesió central amb l' MPP+ o 6-OHDA |
|--|
| sobre l'activació limfocitària perifèrica110 |
| 10. Mecanismes de la lesió produïda pel MPP ⁺ |
| observada en talls gruixuts d'estriat111 |
| 10.1. Depleció dopaminèrgica i selectivitat de la lesió111 |
| 10.2. Producció de radicals lliures i NO112 |
| 10.3. Protecció de la lesió per inhibidors de la NOS113 |
| 11. Mecanisme de la lesió pel MPP ⁺ estudiada en mitocondris114 |
| 11.1. Citometria de suspensions mitocondrials114 |
| 11.2. Estudi de la funcionalitat metabòlica dels mitocondris: |
| dissipació de calor i viabilitat115 |
| 11.3. Mesura del potencial mitocondrial 116 |
| 11.4. Estudi de l'activitat del complex I de la cadena respiratòria |
| mitocondrial sota l'efecte del MPP+ i la dopamina 116 |
| 11.5. Distints efectes del MPP+ segons distintes concentracions 118 |
| 11.6. Mesura del consum d'oxigen dels mitocondris exposats a MPP ⁺ |
| i dopamina oxidada119 |
| 12. Lesió de la via nigroestriatal amb DA in vivo |
| 12.1 Oxidació de la DA in vitro, efecte de l' MPP ⁺ 120 |
| 12.2. Estudi histològic de la lesió amb DA a la substància negra 120 |
| 12.3. Estudi bioquímic i test rotacional de la lesió amb DA in vivo 121 |
| 12.4. Signes d'autofagia en la lesió produïda per la DA in vivo 122 |
| 12.5. Estudi de l'expressió de α -sinucleïna en la lesió per DA in vivo 123 |
| 12.6. Estudi d'incubació de α -sinucleïna i DA in vitro |
| Capítol 4 - Discussió |
| |
| Conclusions |
| Capítol 5: Bibliografia, annexes i altres |
| publicacions143 |
| Annexes – Publicacions |
| Abreviatures |

Presentació

Diuen que a la tercera va la vençuda i en aquest cas tindran raó...

Quan em vaig incorporar al grup de Neuroquímica del Dr Ambrosio, cap el 1995, em movia més la necessitat de completar i complementar la meva jornada laboral com a professora de Bioquímica a l'ensenyament d'infermeria de la UB, que no la de fer RECERCA.

En aquell moment acabava la baixa maternal pel meu segon fill i tenia clares les prioritats: em sentiria totalment realitzada, en el àmbit acadèmic, si un cop enllestida la tasca docent podia participar en els experiments que es portaven a terme en el grup, sempre que en general em fos possible arribar a temps a la sortida de les escoles.

En aquests termes varem plantejar la meva participació en el grup i així varem anar fent fins que cap l'any 2002 vaig haver de decidir entre ser una "superwoman" sobrepassada per les autoexigències o ser una persona amb temps per viure. S'ha de dir que aquesta decisió coincidia amb canvis en el currículum de Infermeria i en les matèries per mi impartides que m'exigien, de nou, més dedicació per a la preparació de classes i material docent. Aquesta va ser la primera fase, eminentment experimental d'aquest treball que no va veure la llum en forma de tesi.

A estones, però, vaig anar realitzant experiments puntuals i revisant alguns dels temes que havíem anat tocant i cap allà el 2006 vaig posar-m'hi de nou, per haver de reconèixer, uns mesos després, que la tasca era massa àrdua! A més a més, em mancava la necessària motivació, doncs quelcom de ben extraordinari succeïa amb el meu currículum i és que la Universitat em reconeixia dos trams de recerca pels treballs signats, a pesar de no haver enllestit el doctorat! Aquest va ser el primer intent fallit de donar cos a la tesi

Un altre canvi en la tasca docent, en relació al pla d'estudis de l'ensenyament d' Infermeria va propiciar, ara fa dos anys, el replantejar-me de nou la elaboració d'aquest treball que s'ha de considerar ja com un compendi retrospectiu de recerca, però que finalment veu la llum.

El producte d'aquestes tres etapes cronològiques, la primera més de fer i les darreres més de llegir, pensar i escriure és el que ara presento.

Per a modelar alguns aspectes bioquímics i anatomopatològics de la malaltia de Parkinson en la rata, hem començant utilitzant la neurotoxina MPP⁺, de relativament recent aparició i la més veterana 6-OHDA i hem acabat emprant el propi neurotransmissor de les neurones que degeneren, la dopamina, intentant esbrinar els seus mecanismes de lesió. L'estudi s'ha iniciat en el animal in vivo, ha continuat en talls gruixuts de teixit ex vivo i ha acabat en mitocondris in vitro. Hem volgut reproduir resultats d'altres grups però amb abordatges experimentals més senzills i econòmics, al nostre abast. Hem volgut aplicar el nostre model animal per a estudis comparatius amb la malaltia humana...Confesso que aquesta amplitud d'aspectes ha estat el més enriquidor i al mateix temps el més aclaparador a l'hora de recollir-ho tot en un únic treball.

Per a la introducció he partit d'uns 50 articles de revisió actualitzats, amb la voluntat d'adquirir una visió panoràmica de la malaltia de Parkinson: les hipòtesis etiopatogèniques, les manifestacions clíniques, els trets anatomopatològics i bioquímics, així com dels models animals que s'utilitzen per a reproduir-la. En aquests articles he trobat les referències bibliogràfiques per aprofundir en els aspectes més directament relacionats amb els experiments realitzats.

Per als resultats, que s'han de contemplar dins el marc de la participació en projectes dels nostre grup i d'altres que utilitzaven aquests models animals d'experimentació, hem triat aquells en els que he participat directament, treballs que en alguns casos han estat els preliminars per altres treballs de doctorat del grup. Pràcticament tots els resultats que presentem han estat publicats, com article, en revistes internacionals, aquí queden recollits en l'apartat d'annexes, raó per la qual en la introducció general no consten alguns conceptes introductoris que apareixen en cadascun d'ells.

En tots aquests anys, he participat en una cadena de transmissió de coneixements i inquietuds amb investigadors sèniors i joves doctorands, no sols del grup de Neuroquímica, sinó d'altres del propi departament de Ciències Fisiològiques II, de la Facultat de Medicina del campus de Bellvitge i de institucions alienes, com la UAB o el CSIC. Donat el temps transcorregut i el volum de persones relacionades, m'és impossible aquí reconèixer-les i agrair-les nominalment pel que m'han aportar científica i personalment. Es per això que vull concentrar i personalitzar el meu sincer agraïment a tots, en el Dr. Ambrosio, per facilitar-me la col·laboració amb grups i persones que han enriquit i complementat la nostra feina, quan encara aquest esperit col·laboratiu no era una prioritat institucional en la recerca. I agraïment per mostrar-me la perseverança en la recerca, inclús en les circumstancies econòmiques menys propicies.

Y a Claudio Bado, maquillador d'aquest treball, moltes gràcies.

Acabo aquesta presentació amb un íntim sentiment de felicitat per tancar una tasca pendent i un altre de curiositat il·lusionada pel que em reserva la nova etapa acadèmica que ara s'inicia.

Capítol 1: Introducció i Objectius

La dopamina en el sistema nerviós central

La recerca biomèdica dels últims 50 anys en patologies d'elevada prevalença com la malaltia de Parkinson (PD), l'esquizofrènia, la depressió, les addiccions i el síndrome d'hiperactivitat per dèficit de l'atenció, ha implicat en totes elles el neurotransmissor dopamina (DA) i les neurones dopaminèrgiques de la regió mesencefàlica del sistema nerviós central (SNC), al mateix temps que ha desvetllat moltes de les seves funcions reguladores sobre el desenvolupament i l'execució de les accions motores, l'estat d'ànim, la cognició, l'atenció i la motivació (Bloom, 2010).

Inicialment, els estudis bioquímics sobre la DA (vegeu la taula 1) es realitzaren sobre mostres de teixit cerebral obtingudes sense considerar els possibles circuits neuronals on intervenia aquest neurotransmissor i les altres catecolamines centrals, norepinefrina (NA) i epinefrina (A), fet que retardà la visió íntegra d'aquestes vies, el seu abast i les seves connexions, però desvetllà, mica en mica, el metabolisme dels neurotransmissors monoaminèrgics (catecolamines i serotonina), així com l'acció de molts fàrmacs psicòtrops.

Amb les tècniques histofluorescents amb formaldehid dels anys 60 s'identificaren 12 grups de neurones catecolaminèrgiques al SNC de la rata (etiquetades de A1-A12 segons l'esquema clàssic de Dahlström i Fuxe, 1964), tres dels quals eren dopaminèrgics, els grups A8, A9 i A10.

Amb les tècniques immunohistoquímiques anti-tirosina-hidroxilasa, s'identificaren els primers circuits dopaminèrgiques implicats en el control del moviment i algunes projeccions al bulb olfactori i a l'estriat ventral. Més tard, gràcies a nous mètodes neuroanatòmics òptics i immunohistoquímics per a enzims de síntesi, receptors i transportadors, s'amplià el mapa del sistema dopaminèrgic amb projeccions al còrtex, retina, cèl·lules ciliades coclears i còrtex prefrontal (aquestes principalment en primats) (Moore 2003).

Recentment, els estudis d'expressió gènica en neurona individual i la caracterització electrofisiològica de les neurones dopaminèrgiques amb el soma al mesencèfal mostren diferències notables entre les que projecten a l'estriat dorsal o ventral i les que innerven el còrtex prefrontal, diferencies en relació al patró d'activitat elèctrica, al recanvi dopaminèrgic, a la dependència de la L-tirosina extracel·lular, a l'efecte d'agonistes i antagonistes dopaminèrgics i fàrmacs antipsicòtics (Moore, 2003), diferencies també respecte de la seva plasticitat i vulnerabilitat a la neurodegeneració (Liss i Roeper, 2008).

Taula 1. Fites en la recerca sobre la dopamina i la malaltia de Parkinson.

| any | conceptes bàsics sobre la dopamina al cervell referencia |
|---------|---|
| 1817 | El doctor Parkinson descriu el quadre de paràlisi |
| 1021 | agitant que portara el seu nom |
| 1921 | Les lesions anatomiques cerebrals especifiques de la malaltia |
| 1021 | de Parkinson (PD) es localitzen a la substancia negra del mesencetal |
| 1921 | Es proposa i demostra experimentalment la naturalesa química de la transmissio |
| 10// | sinaptica amb l'acetilcolina, primer neurotransmissor descobertLoewi, 1921 |
| 1946 | Es descobreix el paper central de la norepinefrina en la neurotransmissió |
| 10/- | del sistema nerviós simpáticVon Euler, 1946 |
| 1947 | Primeres experiències de cirurgia estereotàctica en humans |
| | pel tractament de PD |
| 1957 | La Dopamina (DA) és troba al cervell dels mamífersCarlsson,1957; Montagu, 1957 |
| 1958 | El precursor de la DA, L-dopa, pot restaurar els nivells de DA |
| | i l'activitat motora dels animals lesionats amb l'alcaloide reserpina, |
| | es proposa la dopamina com neurotransmissor central, la seva funció |
| | en el control motor extrapiramidal i el seu dèficit com a causa |
| | del parkinsonisme |
| 1959 | La màxima concentració de DA cerebral es troba a l'estriatBertler,1959; Sano,1959 |
| 1960 | Els malalts de Parkinson presenten nivells molt reduïts |
| | de DA estriatalEhringer, 1960 |
| 1961 | Primers intents d'alleugerir els símptomes de la PD amb L-dopaBirkmayer, 1961 |
| 1962/4 | Es localitzen i identifiquen les neurones dopaminèrgiques centrals |
| | per tècniques histofluorescents |
| 1967/9 | S'estableix la teràpia substitutiva de la PD amb L-dopaCotzias, 1967-9 |
| 1978 | Es proposa l'estrès oxidatiu com a possible mecanisme etiopatogènic de la |
| | neurodegeneració dopaminèrgica en la PDGraham, 1978 |
| 1981 | Es proposa el paper modulador de la dopamina en els ganglis basals, controlant |
| | tant els impulsos corticals cap el nucli caudat-putamen, com l'activitat de les |
| | interneurones i neurones de projecció de la regióKitai,1981 |
| 1983 | S'amplia l'estudi morfomètric de les neurones dopaminèrgiques |
| | en malalties neurològiques i psiquiàtriques |
| 1990/96 | S'identifiquen els primers gens PARK relacionats amb la |
| | neurodegeneració dopaminèrgica |
| 1998 | S'identifiquen alguns gens del desenvolupament de les nDAm Ve. 1998: Goridis 2002 |
| 2000 | S'aconsegueix convertir in vitro stem cells en neurones dopaminèrgiques |
| 2000 | o aconseguent convertir in vito stem cens en neurones dopanniergiques |

Tradicionalment, les neurones dopaminèrgiques s'han caracteritzat per sintetitzar i metabolitzar la DA, gràcies a que expressen els corresponents enzims de síntesi i degradació i les proteïnes transportadores, que han estat i són molt emprades com a marcadors moleculars essencials per a la seva identificació, principalment els enzims tirosina-hidroxilasa (TH) i decarboxilasa d'aminoàcids aromàtics (AADC), el transportador vesicular de monoamines (VMAT2) o el transportador de DA (DAT) (vegeu la figura 8).

El 90% de les neurones dopaminèrgiques centrals tenen el soma situat al mesencèfal ventral, en tres grups neuronals: la part compacta de la substància negra (SNc, o àrea A9), l'àrea tegmental ventral (VTA o àrea A10) i el nucli retrorrubral (RRF o àrea A8), són les denominades mesodiencefaliques (Björklund i Lindvall, 1984) o mesencefaliques (nDAm) (vegeu la figura 1a i b). Tot i que es tracta d'un nombre reduït de neurones, les nDAm emeten projeccions topogràficament molt organitzades que abasten pràcticament tot el prosencèfal o cervell anterior, incloent el neocòrtex i són la principal font de DA al cervell dels mamífers (Chinta and Andersen, 2005).



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 1. a) Representació esquemàtica dels principals grups neuronals dopaminèrgics en el sistema nerviós central del ratolí en un tall sagital i b) en un tall coronal corresponent a la posició mostrada per la línia vertical en (a), on es destaca la distribució anatòmica de les neurones de la substància negra pars compacta (SNc, grup A9) i les de l'àrea tegmental ventral (VTA, grup A10) que juntament a les del nucli retrorrubral (RRF, grup A8) son les denominades neurones dopaminèrgiques mesodiencefàliques o mesencefàliques (nDAm en el text). Altres grups dopaminèrgics són: les cèl·lules interplexiformes de la retina (grup A17) (no es mostra); les neurones dendrítiques periglomerulars del bulb olfactori (OB)(A16); el grup cel·lular de la zona Incerta del tàlem ventral (A13) (no es mostra); el grup cel·lular de l'hipotàlem (Hyp, A12, A14 i A15) dels quals el grup A12 és el més gran i proveeix les projeccions tuberoinfundibular i tuberohipofisall implicades en la regulació neuroendocrina i el grup cel·lular mesodiencefalic de situació caudal periaqüeductal (A11) (no es mostra) (Smidt i Burbach, 2007). (dreta) Esquema d'un tall sagital medial del cervell humà amb la situació del mesencèfal o cervell mitjà, situat per sota de les estructures diencefaliques (tàlem i hipotàlem) i per sobre del tronc (protuberància i bulb raquidi). Disponible en http://www.afh.bio.br/nervoso/img/Nervos36.jpg El 10% de neurones dopaminèrgiques restant formen petits circuits locals amb origen al telencèfal i diencèfal i projeccions cap al diencèfal i tronc cerebral: són les cèl·lules interplexiformes de la retina (grup A17), les neurones dendrítiques periglomerulars (juxtaglomerulars) dels bulbs olfactoris (grup A16), els grups cel·lulars de l'hipotàlem (àrees A15, A14, A12) dels quals el grup A12 és el més gran i proveeix les projeccions tuberoinfundibular i tuberohipofisal implicades en la regulació neuroendocrina; el grup cel·lular de la zona incerta del tàlem ventral (A13) i el grup cel·lular de situació mesodiencefàlica caudal denominat matèria grisa periaqueductal (A11) (Smidt i Burbach, 2007).

Quant al nombre de nDAm, hi ha una gran variabilitat entre les especies: en primats no humans i humans el nombre decau amb l'envelliment, cosa que no succeeix en els rosegadors (tenen unes 45.000 nDAm). Es calcula que en la 4a dècada de la vida podem tenir unes 590.000 nDAm, xifra que s'ha reduït a unes 350.000, dues dècades més tard (Chinta and Andersen, 2005).

Les nDAm formen part dels circuïts dels **ganglis bassals** (vegeu la figura 2a) que exerceixen un paper central en el control del moviment. En els paràgrafs següents fem un repàs d'aquestes estructures en relació als seus components i connexions.

Els ganglis basals, rol, components i interconnexions

La planificació, direcció i execució dels moviments voluntaris depèn de tres àrees del còrtex frontal: l'àrea motora primària, l'àrea premotora i l'àrea motora suplementària. Les neurones piramidals d'aquestes tres àrees corticals projecten axons a la medul·la espinal on fan sinapsi amb interneurones i neurones motores espinals que finalment acaben innervant els músculs esquelètics, és el denominat sistema piramidal, implicat en els moviments fins de les extremitats.

Hi ha un segon conjunt de projeccions motores descendents que s'originen al tronc de l'encèfal, fonamentalment a la formació reticular i al nucli vestibular i que, com les anteriors, van a fer sinapsi amb les neurones motores espinals de l'asta anterior de la substància grisa medul·lar, aquesta segona via descendent que es coneix com a via extrapiramidal es la responsable del control de l'equilibri i la postura durant l'execució dels moviments voluntaris.

Per iniciar i executar els moviments, el còrtex motor necessita informació integrada sobre la intenció del moviment, la motivació, el context motor, sensitiu i emocional del cos i de l'ambient exterior, informació que li subministren dos sistemes moduladors: els ganglis bassals (GB) i el cerebel (Purves, 2003); l'organització d'ambdós sistemes és similar, amb una regió central de processament que rep aferències massives del còrtex sensitiu secundari i associatiu i des d'on parteixen projeccions cap el tàlem, després de fer sinapsi en distints nuclis de relleu intermediaris. El tàlem, finalment projecta cap a l'escorça motora des d'on s'inicia l'acció motora.

Al cerebel se li atribueix la coordinació harmònica dels moviments continus, sobre tot els guiats per la visió, mentre que els GB modulen fonamentalment la planificació, iniciació i acabament dels moviments complexos i el control adaptatiu de la conducta a través de la interacció de les àrees sensoriomotores, cognitives i emotives del cervell (Graybiel et al., 1994) Els GB són distints nuclis de substancia grisa, subcorticals, bilaterals i profusament interconnectats, la regió central de processament dels quals és el nucli estriat (estriat dorsal o neoestriat) que en els primats es troba subdividit en dos, caudat i putamen, separats per la càpsula interna, feix de substancia blanca format pels axons de la via piramidal, es distingeix el nucli accumbens (estriat ventral), el globus pàl·lid amb la divisió externa o lateral (GPe) i la interna (GPi) (que en rosegadors es denominada nucli entopeduncular – vegeu la figura 2b), tots ells situats a la base anterior de l'encèfal; el nucli subtalàmic (STN) situat en el diencèfal es considera, juntament amb el globus pàl·lid, part del sistema motor extrapiramidal. Per últim, la substància negra (SN) situada en el mesencèfal presenta dues parts ben diferenciades, la compacta (SNc) i la reticulada (SNr) (Jurkowsky and Stacy, 2005).

A continuació, revisem amb especial interès les característiques de l'estriat i de la substància negra per ser dos nuclis sobre els que hem incidint repetidament en aquest treball.



Figura 2a. (esquerra) Esquema d'un tall coronal del cervell humà a nivell de l'estriat (caudat i putamen) (Purves, 2003 pag. 366). (dreta) Esquema d'una visió posterolateral dels dos sistemes cerebrals moduladorsdel moviment, els ganglis basals i el cerebel. Disponible a: http://brainmind.com/BasalGanglia.html



Figura 2b. Esquema d'un tall sagital del cervell de rosegador amb els nuclis dels ganglis basals interconnectats: striatum (nucli estriat que correspon al humà caudat-putamen), GP(Glob pàl·lid que en l'humà correspon al GP extern), EP(nucli entopeduncular que en el humà correspon al GP medial o intern), STN (nucli subtalàmic), SNc (part compacta de la substància negra), SNr (part reticulada de la substancia)(Gerfen, 2010 pag. 16).

Substància negra i vies dopaminèrgiques

En un tall a nivell del mesencèfal, en posició ventral i lateral, la **substància negra** de cada hemisferi apareix com una banda homogènia de color fosc (d'aquí el nom) degut a l'elevat contingut en neuromelanina. Les neurones nigrals es classifiquen segons la mida del soma, la forma de les dendrites, el grau de pigmentació, la connectivitat i l'expressió de distints marcadors moleculars que ajuden a delimitar varies subregions:

a) La zona compacta de la SN (SNc) conté les neurones de tipus I, les més grans i nombroses, riques en DA i neuromelanina, pigment que s'observa a simple vista en el cervell dels primats però no en el dels rosegadors. Dins la SNc es distingeix dos nivells: el nivell dorsal, calbindina positiu i el nivell ventral, calbindina negatiu. Els axons fins, amielínics i varicosos d'aquests dos nivells es dirigeixen cap al putamen posterior (estriat dorsal) considerat l'estriat sensoriomotor i cap el putamen anterior i el nucli caudat que es consideren l'estriat associatiu, formant en conjunt la via nigroestriatal (vegeu la figura 2b i la figura 3), la disrupció de la qual es característica de la malaltia de Parkinson i dels models animals de parkinsonisme. Altres projeccions de la SNc es dirigeixen als dos segments del globus pàl·lid on sembla que modulen les eferències cap el tàlem. Les dendrites d'aquestes neurones dopaminèrgiques es localitzen en part a la zona reticulada.

b) La zona reticulada de la (SNr) menys densa que la compacta, conté les neurones de tipus II, GABAèrgiques, menors que les de tipus I, no pigmentades, reben inputs des del nivell ventral de la SNc, de l'estriat i del STN i projecten principalment cap el tàlem però també cap els denominats estriosomes de l'estriat (que comentem més endavant). La resta són interneurones petites que es marquen amb lipofucsina.



Figura 3. Esquema de la via dopaminèrgica nigroestriatal de la rata, amb els somes agrupats en les àrees A8, A9 i A10 i els axons que formen el feix prosencefàlic medial (mfb) en direcció cap a l'estriat.

Veïna medial de la SN, l'àrea tegmental ventral (VTA) és també l'origen de neurones dopaminèrgiques que juntament amb algunes de la zona dorsomedial i rostral de la SNc projecten a àrees límbiques com el nucli accumbens (o estriat ventral considerat l'estriat límbic), als tubercles olfactoris i en menor proporció al septum, amígdala i hipocamp. Aquesta via és la denominada **via mesolímbica**, que està involucrada en la motivació i la recompensa de les accions motores.

De les mateixes àrees, alguns axons projecten al neocòrtex, especialment al còrtex prefrontal, al còrtex del cingle i entorrinal, formant la que es coneix com via mesocortical. Aquestes dues es solen considerar conjuntament com via mesocorticolímbica (vegeu la figura 4), donada l'homogeneïtat topogràfica dels somes neuronals i la participació d'ambdues en els processos cognitius, la conducta emocional, la motivació i el sistema de recompensa involucrat en l'aprenentatge i el manteniment de les accions motores. La disfunció d'aquesta via s'associa a l'esquizofrènia, les addiccions i els quadres d'hiperactivitat per dèficit de l'atenció (Moore, 2003; Chinta et al. 2005).



Figura 4. Esquema de les vies dopaminèrgiques mesolímbica (esquerra) i mesocortical (dreta) o mesocorticolímbica de la rata, amb els somes situats principalment a l'àrea tegmental ventral (VTA) o àrea A10 i els axons de projecció cap a les àrees límbiques, frontals i hipocamp.

L'estriat, centre de processament dels GB

Excepte en els primats, per la presència de la càpsula interna de substància blanca, l'estriat té macroscòpicament un aspecte homogeni, d'aquí que s'hagi considerat tradicionalment com un sol nucli, tant des d'un punt de vista morfològic com funcional.

Els estudis de desenvolupament postnatal, tanmateix, distingeixen dos compartiments estriatals distints: els estriosomes ("patches") que ocupen el 20% del volum del nucli i la matriu que correspon al 80% restant. Les neurones dels estriosomes són més primerenques i tot d'una expressen receptors d'opiacis-µ, mentre que les de la matriu són més tardanes i expressen calbindina (Gerfen 2010).

L'estriat madur està constituït, en un 10% per interneurones, principalment colinèrgiques i en menor proporció GABAèrgiques (que produeixen somatostatina, parvalbúmina, o calretinina). El 90% restant són neurones GABAèrgiques de projecció, denominades **neurones espinoses mitjanes** de tipus I, les que contenen encefalina (ENK) i de tipus II, les que contenen substància P (SP) i dinorfina (DYN). Totes presenten una elevada densitat d'espines dendrítiques (vegeu la figura 5), sobre les que fan sinapsi distintes aferències intrínseques i extrínseques, de les quals cal destacar les dues primeres, a continuació:

- a) Aferències glutamatèrgiques provinents de tot el neocòrtex (excepte el visual i auditiu primaris), les capes III i V del qual projecten principalment a la matriu estriatal. Altres aferències procedeixen de determinats nuclis del tàlem (parafasciculars, ventromedials i paraventriculars). Els axons glutamatèrgics fan sinapsi a nivell del cap de les espines, exercint en conjunt un rol activador dels circuits estriatals.
- b) Aferències dopaminèrgiques provinents del nivell dorsal de la SNc i de la VTA fan sinapsi amb les neurones de la matriu. Les originades en la SNc ventral es dirigeixen tant a la matriu com als estriosomes. En general, aquestes aferències dopaminèrgiques fan sinapsi en el coll de les espines dendrítiques exercint un paper modulador dels senyals glutamatèrgics (vegeu la figura 5) (Schiffmann et al., 2007).
- c) Aferències GABAèrgiques, des de l'àrea retrorrubral (A8) a la matriu.
- d) Aferències serotoninèrgiques, des dels nuclis del Rafe.

Al seu torn, les neurones espinoses mitjanes de l'estriat dorsal projecten dos tipus d' eferències GABAèrgiques cap a la SNr i el GPi, els dos nuclis de sortida dels GB amb direcció al tàlem:

 Les neurones estriatals de tipus II, dinorfinèrgiques connecten els estriosomes directament amb els nuclis de sortida, constituint la denominada via estriat-nigral directa, en la que s'expressen receptors dopaminèrgics D1 (acoblats a proteïnes Gs, excitadores) (vegeu la figura 6). 2) Les neurones estriatals de tipus I encefalinèrgiques connecten la matriu estriatal amb les neurones GABAèrgiques del GPe que al seu torn fan sinapsi amb les neurones glutamatèrgiques del STN, que fan contacte amb els nuclis de sortida. Aquesta es la denominada via estriat-pal·lidal indirecta on s'expressen receptors dopaminèrgics de tipus D2 (acoblats a proteïnes Gi/o, inhibidores). Les neurones GABAèrgiques del GPe també projecten directament als nuclis de sortida sense fer relleu al STN (vegeu la figura 6) (Gerfen, 2004).



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 5. Esquema de les interaccions glutamatèrgiques corticals (sobre el cap) i dopaminèrgiques nigrals (sobre el coll) amb les espines de les neurones espinones mitjanes de l'estriat de rata. NAc (nucli accumbens o estriat ventral), VP (nucli pàl·lid extern o ventral, VTA (àrea tegmental ventral) (Hyman and Malenka, 2001).

- Segons la teoria central dels trastorns motors de la PD i de la malaltia de Huntington, les vies estriat-nigral directa i estriat-pal·lidal indirecta competeixen funcionalment entre elles per activar o inhibir el moviment:
- a) la via estriat-nigral directa consisteix en dues connexions inhibidores GABAèrgiques consecutives: de l'estriat al GPi i SNr i d'aquests al tàlem, de manera que les aferències excitadores glutamatèrgiques del neocòrtex, a través d'aquesta via desinhibeixen el tàlem, el qual estimulant el còrtex motor a través del seu neurotransmissor, el glutamat, allibera el moviment.
- b) la via estriat-pal·lidal indirecta, en canvi, consta de un pas extra a través del nucli STN glutamatèrgic, el qual estimula els GABAèrgics GPi i SNr, aquests, en inhibir el tàlem, inhibeixen el còrtex motor i frenen el moviment (vegeu la figura 6 i 7) (Graybiel, 2000).

En aquesta complexa xarxa neuronal, la DA té un paper modulador sobre l'activitat de les dues vies, principalment a nivell de l'estriat. Així, en situació fisiològica, la unió de la DA

amb els receptors de tipus D1 (estimuladors i localitzats en la via directa) i D2 (inhibidors i ubicats en la via indirecta) porta a la iniciació i desenvolupament correcte del moviment.

La disfunció dopaminèrgica repercuteix en tot el sistema dels ganglis basals: en models animals i en els malalts de PD, tant a nivell electrofisiològic com metabòlic, s'ha pogut demostrar una hiperactivitat del nucli subtalàmic (STN) que a través dels GPi i SNr, provoca una sobreinhibició del tàlem i d'aquest al còrtex premotor, el que explica la bradicinèsia / acinèsia i justifica els abordatges quirúrgics de la malaltia (Guridi et al., 2004). Així, l'alteració de les vies nigroestriatals implica o bé una prominència inhibitòria de les vies estriat-nigrals que es tradueix en l'enlentiment dels moviments com acabem de comentar o bé un excés d'excitabilitat d'aquestes vies amb l'aparició d'un quadre discinètic amb moviments ràpids, irregulars i incontrolats tipus coreiforme com en la malaltia de Huntington (Ambrosio et al., 1996).



Figura 6. Representació esquemàtica de les interconnexions dels ganglis basals i els principals neuropèptids sintetitzats per les neurones espinoses mitjanes estriatals de projecció. Es senyala la ubicació dels receptors d'adenosina i dopamina. Les fletxes representen les connexions sinàptiques. Globus pàl·lid extern (GPe); globus pàl·lid intern (GPi); substancia negra compacta (SNc); substancia negra reticulada (SNr); nucli sub-talàmic (STN); Encefalina (ENK); Dinorfina (Dyn); Substancia P (SP); receptors dopaminèrgics D1 i D2; receptors de adenosina A2A. (Schiffmann et al., 2007).



Figura 7. Esquema del funcionament ordinari dels ganglis basals en relació a la iniciació i execució dels moviments i funcionament alterat (dreta) pel dèficit de la innervació dopaminèrgica moduladora, que cursa amb una preeminència de la via estriat- pal·lidal indirecta inhibitòria i un enlentiment dels moviments.

Distribució regional de la DA i altres marcadors dopaminèrgics en els ganglis bassals

La DA no es distribueix homogèniament als GB, ni tampoc en el sí de cada nucli, quan s'estudia en cervells humans postmortem:

L' estriat és el nucli més ric en DA, amb 5-7 $\mu g/g$ de teixit, que correspon al 80% de tota la DA cerebral, però mostra un gradient de concentració amb nivells alts al cos de l'estriat i nivells baixos al cap i la cua (en la Fig. 2a dreta s'aprecia la forma de C dels estriats amb el voluminós cap que correspon al putamen i cap del caudat).

La SN és el segon nucli més ric en DA ($0.5 - 0.9 \mu g/g$), amb grans diferencies regionals: la zona compacta, amb $0.9 \mu g/g$, triplica la concentració de la zona reticulada, $0.3 \mu g/g$.

El GPe, amb 0.45 $\mu g/g$, quintuplica la concentració de DA del GPi, 0.07 $\mu g/g$ i al STN és de 0.1-0.2 $\mu g/g$ (Hornykiewicz 2001).

La distribució d'altres marcadors bioquímics propis d'aquestes neurones com TH, DAT, VMAT2, AADC, receptors DA pre i postsinàptics, es equivalent a la de la DA.

En canvi, la distribució de l'àcid homovaníl·lic (HVA), el principal metabòlit dopaminèrgic en el cervell humà (en el de la rata és l'àcid dihidroxifenilacètic - DOPAC), presenta marcades diferencies que probablement reflecteixen diferencies regionals en la síntesi, emmagatzemament, tassa de recaptació i recanvi dopaminèrgic, així, el quocient molar HVA / DA oscil·la al voltant de la unitat a nivell de l'estriat humà (0.1 en el de rata), on la concentració del DAT és màxima; és aproximadament de 3 a la SN, és de 10 al STN i de entre 10 i 50 al GP, on la concentració del DAT és mínima, (Hornykiewicz 2001).

Metabolisme de La dopamina

La dopamina és una catecolamina que es sintetitza majoritàriament a nivell de les terminacions sinàptiques, a partir de l'aminoàcid L-tirosina, per l'acció consecutiva dels enzims TH i AADC que el transformen en L -3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) i DA respectivament (vegeu la figura 8). La DA queda emmagatzemada en vesícules sinàptiques a través del transportador vesicular VMAT2 que realitza un transport antiport acoblat a H+. L'arribada d'un potencial d'acció presinàptic allibera les vesícules plenes de DA a l'espai sinàptic permetent la seva interacció amb receptors específics pre i postsinàptics. Després d'exercir la seva acció, la DA és majoritàriament recaptada i introduïda de nou a les terminacions nervioses pel transportador DAT, aquí serà en part re-vesiculada i en part metabolitzada per la monoaminooxidasa mitocondrial (MAO) a àcid 3,4-dihidroxifenilacètic (DOPAC), un 40% del qual és eliminat i el 60% restant és metabolitzat per la catecol-O-metil-transferasa (COMT), enzim membranal d'acció extracel·lular, a àcid homovaníl·lic (HVA).



Figura 8. A) Esquema de la síntesi dels neurotransmissors catecolaminèrgics, dopamina, noradrenalina i adrenalina (Goridis and Rohrer, 2002). B) Síntesi (1,2,3), emmagatzemament (4,8), secreció (5), interacció amb receptors postsinàptic (6), recaptació (7) i metabolisme (9, 10) de la dopamina (Ben-Jonathan N. i Hnasko R., 2001).



Figura 9. Esquema del catabolisme enzimàtic de la DA pels enzims MAO i COMT que genera els metabòlits DOPAC, 3-MT i HVA.

La mesura del DOPAC pot ser indicativa del grau de metabolització de la DA i la del HVA pot donar idea del seu alliberament, mentre que la suma dels dos metabòlits en relació a la DA dona idea del recanvi dopaminèrgic (vegeu la figura 9) (Caudle, 2008).

En l'envelliment fisiològic, s'ha demostrat un augment del recanvi dopaminèrgic, possiblement per augment de la TH, que resulta en un increment de la concentració de DA i metabòlits en les neurones TH positives de la SNc, sense canvis perceptibles al nucli estriat (Greenwood, 1991).

Autooxidació de la DA i formació de la neuromelanina

Amb l'edat, en regions com la substància negra i el lloc ceruli, es formen polímers a base de catecolamines oxidades que es coneixen com a agregats de neuromelanina (NM) i que són responsables de la pigmentació d'aquests nuclis cerebrals en els humans. En condicions normals, l'activitat de la MAO i l'emmagatzemament de la DA en vesícules acídiques (que estabilitza l'estructura catecol) evita la seva autooxidació. Tanmateix, qualsevol procés que comporti l'augment de la síntesi del neurotransmissor, la saturació de VMAT2 o la baixa expressió de MAO i VMAT2 incrementarà la concentració de dopamina lliure al citosol i la producció de quinones i semiquinones amb un elevat poder oxidant.

El procés pot començar amb la oxidació de la DA i L-DOPA a ortoquinones (DA o-quinona, L-DOPA o-quinona), formes que després d'una reestructuració interna per ciclació de la cadena aminoalquil donen lloc a aminocrom i dopacrom respectivament, aquesta reacció pot ser catalitzada per O_2 , Fe²⁺, peroxinitrits (ONOO⁻ i $^{\circ}NO_2$), citocrom P450 1A2, prostaglandina H sintasa (COX 1 i COX 2), lactoperoxidase, lipoxigenasa, xantina oxidasa, tirosinasa i dopamina b-monooxigenasa i probablement per $O_2^{-\circ}$ i HO[•]. Aquestes catecolquinones són precursores de la neuromelanina cerebral (i de la melanina a la pell) (Graumann et al., 2002) (Kostrzewa et al., 2002).

Aminocrom i dopacrom poden guanyar un electró i donar lloc a formes reduïdes denominades semiquinones (SQ) amb un potencial citotòxic molt superior al de les quinones doncs inicien un cicle redox que s'autopropaga fins l'esgotament total del NADPH o la total depleció de l'oxigen (vegeu la figura 10) (vegeu: hipòtesis etiopatogènics de la PD: estrès oxidatiu).



Figura 10. Formació de la neuromelanina i dels radicals semiquinona a partir de derivats oxidats de la DA (Graumann et al., 2002).

La neuromelanina és un material amorf, fosc, insoluble i d'estructura irregular que s'ha comparat amb la dels àcids húmics (components bàsics de la matèria orgànica del sol). Quan s'ha estudiat la composició de la NM en controls i teixit cerebral postmortem de malalts de PD mitjançant ressonància magnètica nuclear d'alta resolució de l'estat sòlid (indicada per molècules insolubles), es veuen diferencies significatives: en els controls, la NM té el component policatecòlic de la polimerització dels derivats oxidats de la DA que acabem de comentar i un de lipídic, derivat de la cadena isoprenoide del dolicol que s'ha identificat com el component lipídic dels grànuls intactes de NM, en canvi, el pigment extret dels pacients de PD conté una petita proporció de la composició esmentada i sobre tot un component lipoproteic molt resistent a proteases, en el que es detecta la proteïna α -sinucleïna, entre d'altres. Aquesta diferent composició podria ser deguda, en part, a la solubilització del material policatecòlic per l'acció de substàncies oxidants com el peròxid d'hidrogen que rendiria àcids melànics solubles que es descartarien durant el procés d'extracció prèvia a RNM d'alta resolució (vegeu la figura11) (Fasano et al., 2006) (quant a l' α-sinucleïna, vegeu: aspectes neuropatològics de la PD, LB i LN i també la causa genètica de la PD).



Figura 11. Esquema de la possible degradació autocatalítica de la neuromelanina: radicals lliures derivats de l'oxigen (ROS), com el peròxid d'hidrogen, ataquen l'estructura insoluble de la melanina (en gris) produint àcids melànics (en marró) que poden quelar els ions de ferro alliberats i potenciar la formació de més ROS (Fassano et al., 2006).

Receptors dopaminèrgics

De la interacció entre la dopamina i els receptors dopaminèrgics depèn el seu efecte en les distintes àrees cerebrals o perifèriques. En funció de les homologies estructurals i de les propietats farmacològiques i funcionals s'han descrit cinc tipus de receptors dopaminèrgics centrals, agrupats en dues famílies: receptors de tipus D1 (D1 i D5) i receptors de tipus D2 (D2, D3, D4).

- a) Els receptors de la família D1 són majoritàriament postsinàptics i estan acoblats a proteïnes Gs activadores de l'enzim adenilat ciclasa. Els D1 són els de més ampla distribució i densitat a tot el cervell, essent les neurones estriatals espinoses mitjanes de la via nigroestriatal directa les que presenten la major concentració. També s'han trobat a nivell presinàptic en les projeccions glutamatèrgiques de còrtex i tàlem. Els receptors D5 abunden especialment en l'estriat ventral, illes de Calleja, tubercles olfactoris i septum, totes, estructures límbiques.
- b) Els receptors de tipus D2 són acoblats a proteïnes Go/i inhibidores de l'adenilat ciclasa. La distribució regional dels D2 és molt similar als D1 amb algunes diferencies: 1) menor densitat cortical, 2) localització presinàptica en els terminals dopaminèrgics que projecten a l'estriat, 3) localització postsinàptica en les neurones espinoses mitjanes de la via estriat-pal·lidal indirecta, 4) localització en les interneurones colinèrgiques estriatals. Els receptors D3, com els D5, són abundants en les àrees límbiques (Hurley and Jenner, 2006).

Desenvolupament de les vies dopaminèrgiques

Les nDAm s'originen a partir de cèl·lules progenitores embrionàries de la línia mitja ventral del sol del tub neural, al voltant de la flexió cefàlica que correspon al tegmentum. La transformació d'aquestes cèl·lules mare en neurones dopaminèrgiques es produeix al voltant del dia 10,5 (ratolí) i 12 (rata) del període embrionari com a resultat de la interacció del factor morfogènic local Shh (Sonic hedgehog) amb el també morfogen FGF8 (factor de creixement de fibroblasts 8) expressat en l'adjacent centre organitzador de l'istme (ISO). Shh provoca la desinhibició de la proteïna transmembrana, smoothened (SMO), que al seu torn indueix l'activació o desinhibició d'una sèrie de gens involucrats en el desenvolupament i manteniment postmitòtic de les nDAm.

Tot i que encara s'han d'identificar els factors de transcripció que són específicament expressats per les cèl·lules progenitores dopaminèrgiques proliferants, ja s'han caracteritzat alguns dels que intervenen en el desenvolupament postmitòtic d'aquestes: LMX1b és un factor activador de la diferenciació de les nDAm, en activar l'expressió de Msx1, amb el producte del qual coopera per activar Ngn2. El factor NGN2 activa les cèl·lules progenitores que expressen SOX2 i que més tard es desenvolupen en neurones postmitòtiques NURR positives i possiblement en nDAm TH positives.

NURR1 és imprescindible per l'expressió del gen de la TH, VMAT2, DAT, i el receptor tirosina quinasa RET. Els gens En1 i En2 poden intervenir tant en la generació i/o diferenciació com en el manteniment de les nDAm.

Pitx3 sembla ser exclusiu de les neurones dopaminèrgiques de la via nigroestriatal, doncs els ratolins nadons que en són deficients conserven totes les neurones dopaminèrgiques de la VTA i de l'àrea retrorrubral, però mostren una manca total de les de la SN. Pitx3 és necessari per a la diferenciació de les terminacions dopaminèrgiques i pel manteniment de les nDAm. En el ratolí, Pitx3 s'expressa des del dia 11 de la fase embrionaria fins a l'edat adulta (vegeu la figura 12). Els nivells de mRNA de Pitx3 al mesencèfal estan disminuïts en els ratolins KO per Lmx1b, en la rata parkinsoniana per 6-OHDA i en els malalts de PD (Nunes 2003) (Sillitoe 2008).



Figura 12. Factors implicats en el desenvolupament embrionari de les neurones dopaminèrgiques mesencefàliques. (Goridis C and Rohrer H, 2002)

En general, s'accepta el principi que durant la embriogènesi del SNC hi ha una producció neuronal excessiva, per esdevenir-se més tard un procés natural de mort cel·lular que determina el nombre final de cada població neuronal a l'adult. La supervivència en la correcta connexió dependrà de la capacitat de cada neurona per establir contacte amb el teixit diana en captar el factor tròfic rellevant i portar-lo al soma per transport retrògrad (Clarke, 1985).

S'han descrit dos períodes de mort cel·lular natural per apoptosi en la SN de ratolins i rates, el primer, entre 3 dies abans i 8 dies després del naixement i el segon al voltant del dia 15 postnatal. GDNF (Factor neurotròfic derivat de glia) es un factor tròfic que assoleix elevats nivells d'expressió al voltant del segon dia postnatal en les neurones espinoses mitjanes de l'estriat (Cho et al., 2003), així com succeeix en la SNc amb el seu receptor (GDNF receptor α 1) i el receptor tirosina quinasa Ret, durant el desenvolupament.

En cultius primaris de neurones dopaminèrgiques postnatals esposats a GDNF i en nadons de rata Sprague-Dawley tractats amb GDNF intraestriatal s'ha pogut suprimir el primer pic apoptòtic fisiològic de les neurones dopaminèrgiques i contràriament l'administració intraestriatal de anticossos anti-GDNF en nadons de rata ha incrementat la mort de neurones de la SNc durant aquesta primera onada apoptòtica (Oo et al., 2003), aquestes i altres evidencies (Kholodilov et al., 2004) recolzen el paper fisiològic de GDNF en la regulació de la primera fase de mort fisiològica de les nDAm. Tanmateix, la major supervivència neuronal propiciada pel GDNF sobreexpressat en l'estriat de ratolins transgènics no s'ha vist mantinguda en l'edat adulta, de manera que s'ha suggerit la necessitat d'altres factors tròfics derivats del teixit diana que juntament amb GDNF regulin el nombre finals de les neurones dopaminèrgiques nigroestriatals (vegeu la taula 2) (Smidt and Burbach, 2007).

| LLIGAND BDNF | RECEPTOR TrkB, receptor P75 | LLIGAND Neurotrofina 4/5 | RECEPTOR TrkB |
|----------------------|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| GDNF | GFRα-cRET, GFRα-NCAM | TGFα | Receptor TGFa |
| Neurturina | GFRa-cRET | TGFα | Receptor EGF/TGFa |
| Neublastina/artemina | GFRa-cRET | Neurregulina 1 | Receptor ERBB3/4 |
| Persefina | GFRa4-cRET | BMPs | BMPR1/2 |
| Neurotrofina 3 | TrkC | HB-EGF | ERBB1 |
| GDF5 | BMPR1b | FGF2 | FGFR1 |
| bFGF | FGFR1-3 | | |

Taula 2. Proteïnes amb un efecte neurotròfic sobre les nDAm

BDNF, brain-derived neurotrophic factor; bFGF, basic fibroblast growth factor; BMP, bone morphogenetic protein; BMPR1, BMP receptor type 1; cRET, RET receptor tyrosine kinase; EGF, epidermal growth factor, ERBB1, v-erb-a erytroblastic leukaemia viral oncogene homologue 1; GDF5, growth differentiation factor 5; GFR α , GDNF family receptor- α ; HB-EGF, heparin binding EGF; NCAM, neural cell adhesion molecule; TGF α , transforming growth factor- α ; TrkB, tyrosine receptor kinase B) (Smidt and Burbach, 2007).

Activitat elèctrica de les neurones dopaminèrgiques

Des de fa bastants anys, el grup de Schultz (Schulz, 1986) ha obtingut registres electrofisiològics de l'activitat elèctrica extracel·lular de neurones dopaminèrgiques en el mico despert i actiu; més recentment altres grups han aconseguit el mateix en rosegadors. També des de fa temps, el grup de Grace and Bunney (1984) ha fet registres electrofisiològics intracel·lulars de neurones dopaminèrgiques (per inserció de microelèctrodes o per la tècnica de fixació de membrana, patch-clamp), però la complexitat tècnica d'aquest abordatge sols permet el registre en l'animal anestesiat, així s'ha obtingut informació essencial sobre la seqüència temporal dels potencials d'acció d'aquestes neurones i de les oscil·lacions dels potencials de membrana en l'escala subllindar, que aporten informació rellevant sobre
els tipus de canal iònic responsables de la generació i control de l'activitat elèctrica neuronal.

Tanmateix, la major part dels registres intracel·lulars de l'activitat elèctrica dopaminèrgica deriven de preparacions in vitro de seccions gruixudes ("slices") de mesencèfal o de neurones dopaminèrgiques acabades de dissociar, preparacions que amputen la majoria dels axons i dendrites de la neurona (que s'obtenen d'animals massa joves com rosegadors de 2-3 setmanes) aïllant-les de la complexa xarxa de connexions dels ganglis bassals de la que formen part i que en última instància és la principal controladora de l'activitat elèctrica dopaminèrgica (Liss i Roeper, 2010).

Així, tan en les preparacions in vivo com in vitro i degut a la inaccessibilitat dels fins axons i dels botons sinàptics, els registres provenen del compartiment somatodendrític. Amb tot, s'han definit dos patrons temporals d'activitat elèctrica en les nDAm, en l'animal despert:

a) Un patró tònic basal, de marcapassos regular en les nDAm nigroestriatals, que provoca l'exocitosi de vesícules dopaminèrgiques, l'augment extracel·lular de DA de l'ordre nanomolar i que assegura les concentracions basals estables de DA en l'estriat dorsal o sensoriomotor. Aquest patró es caracteritza per descàrregues contínues de potencials d'acció únics, de baixa freqüència, d'uns 4.0 Hz (vegeu les figures 13b i 14b) (Liss i Roeper, 2008), es pensa que pot ser el correlat elèctric de la denominada transmissió volumètrica característica dels sistemes monoaminèrgics (que descriu la difusió tridimensional del neurotransmissor i el seu efecte a gran distància més que la comunicació focal de la transmissió sinàptica clàssica - Fuxe et al., 2007). El patró tònic de marcapassos s'explica per l'activitat combinada dels tres tipus de canals iònics: 1) canals de calci Cav1.3 (canals de Ca^{2+} sensibles a voltatge, tipus L, d'acció lenta - long-lasting), 2) canals HCN (canals no selectius de cations activats per hiperpolarització i modulats per nucleòtids cíclics) i 3) canals SK3 (canals de K⁺ depenent de calci de baixa conductivitat i sensibles a apamina). En la zona somatodendrítica d'aquestes neurones hi ha GIRK2 (canals de potassi activats pels autorreceptors D2 acoblats a proteïnes Gi) que medien la inhibició de l'activitat elèctrica.

Les nDAm de la via mesocorticolímbica també presenten activitat elèctrica tònica de marcapassos però de major freqüència, entre 15 i 30 Hz, més irregular i sembla independent dels canals responsables en les anteriorment esmentades. Aquí, l'activitat tònica es generaria per l'activitat dels Nav (canals de sodi depenent de voltatge i sensibles a tetradotoxina), d'una banda, i dels contraposats Kv4.3L/Kchip3 (canals de K⁺ tipus A de ràpida inactivació) i els Kir (canals de potassi de rectificació interna) de l'altra. Les nDAm mesocorticolímbiques, a diferencia de les nigroestriatals, no expressen autorreceptors D2 ni els canals de potassi que s'hi associen, de manera que són indiferents als agonistes dopaminergics D2 i tenen baixos nivells d'expressió de DAT.

b) Un patró elèctric fàsic en les neurones de la via mesocorticolímbica de rosegadors i primats estudiats in vivo, a base de trens d'entre 2-10 potencials d'acció, d'alta freqüència, 20-80Hz, separats per intervals d'uns 60 ms, quan l'animal rep una recompensa nova o quan està davant d'un estímul sensorial que normalment precedeix una recompensa ja coneguda. Aquest patró fàsic fa augmentar la DA extracellular fins a l'ordre micromolar, durant cents de milisegons i quan falla la prevista recompensa, el interval entre les tongades de potencials d'acció s'allarga més de 400 ms. Aquesta activitat fàsica no apareix espontàniament en els registres electrofisiològics in vitro, però es pot generar quelcom de similar activant farmacològicament els receptors de NMDA (receptors ionotròpics de glutamat sensibles a N-metil Daspartat) i els canals SK3 (vegeu les figures 13c i 14c).



Figura 13. Registre elèctric amb la tècnica de patch-clamp in vitro de neurones dopaminèrgiques a partir de seccions gruixudes (slices) de teixit mesencefalic. a) típic potencial d'acció simple. b) patró tònic basal de marcapassos. c) patró fàsic induït per inhibició farmacològica dels canals SK. Línia de punts representa -50 mV. Barra d'escala representa 10 mV i 2 ms (a) ó 500 ms (b i c) (Liss and Roeper, 2010).

Les diferències fenotípiques i funcionals observades entre les nDAm de la via nigroestriatal i les de la via mesocorticolímbica no acaben aquí, doncs les neurones nigroestriatals són més proclius a la neurodegeneració que les mesocorticolímbiques com es comprova en els malalts i en els models animals de la malaltia de Parkinson, on les segones són molt menys afectades. A més, quan s'estudien els principals canals iònics o quan s'apliquen pertorbacions farmacològiques i elèctriques en les nDAm en animals KO, ambdues poblacions mostren distinta flexibilitat i adaptabilitat per mantenir el seu patró elèctric intrínsec (Liss and Roeper, 2010).



Figura 14. Registre elèctric intracel·lular de neurones dopaminèrgiques in vivo, en rata anestesiada. b) patró d'activitat tònica i c) patró d'activitat fàsica, el petit registre en c) correspon a un registre extracel·lular in vivo, barres d'escala representen 0.3 mV i 250 ms. (Liss and Roeper, 2010).

La DA en la gratificació, l'addició i l'aprenentatge

Al llarg de l'evolució, els organismes han desenvolupat circuits neuronals relacionats amb la recompensa que s'activen a partir de determinats estímuls ambientals rellevants (reforçadors com l'aliment, la beguda, el sexe i el joc) per assegurar l'aprenentatge de conductes de cerca i consumació, útils per a la seva supervivència, benestar i perpetuació (Schultz, 2006).

Com els estímuls naturals esmentats, però de molta més potencia, les drogues d'abús són "reforçadors de la conducta" que provoquen l'activació de les neurones dopaminèrgiques mesocorticolímbiques (cos a la VTA i projeccions cap a les àrees límbiques i corticals).

Els estudis clàssics de psicoestimulants en animals i els de neuroimatge funcional aplicats a humans (Merims, 2008) demostren que totes les drogues indueixen un fort i ràpid augment de la DA extracel·lular, especialment en el nucli accumbens (NAc o estriat ventral), augment que coincideix amb la sensació d'eufòria i de "pujada" referida pel consumidor, sobre tot si s'administra per via endovenosa, que potencia l'efecte reforçador per la rapidesa de l'efecte. El NAc actua de interfície entre les àrees límbiques i corticals, relacionades amb la motivació, per una banda, i els circuits motors responsables de l'execució de les conductes motivades, per l'altre (Wolf, 2006).

L'excessiu alliberament de DA provoca canvis moleculars i cel·lulars compensatoris tant en les neurones GABAèrgiques del NAc com en els circuits neuronals glutamatèrgics relacionats (vegeu la figura 15).



Figura 15. Esquema del sistema dopaminèrgic mesocorticolimbic i circuits relacionats. L'àrea tegmental ventral (VTA) conté neurones dopaminèrgiques que innerven el nucli accumbens (NAc) i el còrtex prefrontal (PFC), entre altres nuclis del cervell anterior. Les neurones GABAèrgiques del NAc reben aferències glutamatèrgiques del còrtex prefrontal PFC, de l'amígdala (AMY), de l'hipocamp (HPC) i del tàlem, zones relacionades amb la motivació i els projectes i envien eferències cap al globus pàl·lid ventral (VP), la VTA i la SN, regions relacionades amb l'execució de les conductes motivades. Les eferències glutamatèrgiques del PFC modulem aquests circuits fent sinapsis amb NAc, VTA, SN, PPT (nucli tegmental-peduncle-pontí) i LTD (nucli tegmental-lateral-dorsal) (Wolf, 2006).

Els animals d'experimentació tractats amb psicoestimulants presenten un augment de la densitat de dendrites i espines dendrítiques (localització preferent de les sinapsis glutamatèrgiques) en el NAc i en el còrtex prefrontal.

Els estudis funcionals per PET amb drogoaddictes mostren, respecte dels controls: a) una menor densitat de receptors tipus D2 a l'estriat ventral i dorsal i b) una disminució de la DA alliberada per les neurones mesocorticolímbiques, ambdós canvis, s'especula, podrien explicar la menor sensibilitat d'aquets malalts a la gratificació dels reforçadors naturals. c) Suposadament relacionats amb la disponibilitat de receptors D2, durant la síndrome d'abstinència s'observa una activitat disminuïda en el còrtex orbito-frontal (implicada amb la motivació i l'assignació de rellevància als estímuls) i en el gir cinglat anterior (relacionat amb el control inhibitori de les conductes), situació que vira cap a una hiperactivitat d'aquestes zones quan la droga o els senyals relacionats amb ella es presenten, fenomen que pot tenir que veure amb el comportament compulsiu i desinhibit de cerca i consum del drogodepenent (Volkow, 2004).

En resum, independentment del mecanisme molecular particular de cada droga, totes augmenten la neurotransmissió dopaminèrgica mesocorticolímbica, reforçant l'aprenentatge i la memòria de la conducta addictiva (la cocaïna, l'amfetamina i el metilfenidat alteren directament la recaptació o l'alliberament de la DA, mentre que la nicotina, l'alcohol, els opiacis i la cànnabis actuen sobre altres neurotransmissors que modulen la DA (vegeu la figura 16).



Figura 16. Esquema dels mecanismes a través dels quals les drogues d'abús incrementen la neurotransmissió dopaminèrgica en les neurones mesocorticolímbiques: Opiacis, etanol i cànnabis disminueixen la transmissió GABAèrgica en la VTA, desinhibint les neurones dopaminèrgiques. Les drogues estimulants (cocaïna, amfetamina, metilfenidat) augmenten els nivells extracel·lulars de DA, interaccionant amb el DAT. La nicotina, a través dels receptors nicotínics de ACh localitzats en les neurones dopaminèrgiques, Gabaèrgiques i terminacions glutamatèrgiques activa la transmissió dopàminèrgica i promou l'alliberament de glutamat en la VTA (wolf, 2006).

Quant a la dopamina, no tan sols s'associa amb la recompensa sinó amb la predicció de la recompensa i la rellevància dels estímuls (entesa com la capacitat de l'estímul per a produir una activació o un canvi en la atenció o la conducta) de tal manera que a més dels estímuls recompensants, la dopamina o la seva manca també "assenyalaria" els estímuls aversius, nous i inesperats. Els registres electrofisiològics (Shultz, 2007) mostren que el patró fàsic d'activitat elèctrica dopaminèrgica augmenta quan els micos entrenats reconeixen certs estímuls ambientals associats a una immediata recompensa, o bé quan se'ls presenta una recompensa inesperada o millor que l'esperada (el que es considera una predicció positiva en l'error de recompensa). En canvi, quan la recompensa és tal com s'esperava, les nDAm

mostren el patró de dispars tònic basal i quan l'expectativa de recompensa falla (predicció negativa en l'error de recompensa) hi ha un silenci elèctric en aquestes neurones.

Les nDA de la VTA s'adapten ràpidament a la informació proporcionada per la predicció dels estímuls de recompensa, canviant en funció del guany ajustat a la previsió del valor de la recompensa (Tobler, 2005). Els elevats nivells extracel·lulars de la DA provocats per les drogues motiven la cerca de més droga (independentment de si l'efecte és plaent o no) i faciliten l'aprenentatge condicionat, de forma que els estímuls neutres ambientals associats a la droga adquireixen rellevància i per si sols poden desencadenar l'augment de DA i el desig de consumir, d'aquí la recomanació d'eliminar les circumstancies ambientals que envolten el consum de les drogues d'abús per evitar les recaigudes, després de la deshabituació.

En els últims any, s'han publicat casos de malalts de Parkinson que han desenvolupat trastorns compulsius com addicció a la pròpia medicació, hipersexualitat, ludopatia, compres o ingesta compulsives, quelcom de sorprenent tenint en compta que l'estereotip del parkinsonià (persona rígida, introvertida, poc donada a les novetats i amb molt baixa incidència d'abús de drogues legals) és oposada a la personalitat dels addictes (extravertida, impulsiva i predisposada a tot lo nou). Els malalts de PD que han patit un trastorn del control dels impulsos han estat, majoritàriament, homes joves (en el moment del diagnòstic) amb antecedents de consum de drogues, en alguns casos amb antecedents de depressió i amb una personalitat de "buscadors de novetats" ("novelty seeking") segons el test de personalitat de Cloninger. Una altra característica comú d'aquest grup de malalts ha estat el començament, pocs mesos abans de l'aparició del quadre d'addicció, d'una pauta farmacològica amb agonistes dopaminèrgics (pramipexol o ropinirol) sols o combinats amb L-DOPA. Aquests malalts han persistit en el consum compulsiu de la medicació, a pesar de presentar en poc temps discinèsies invalidants. Quan s'han reduït les dosis o s'han retirat els agonistes dopaminèrgics, el quadre ha remés; el desencadenant del trastorn compulsiu, possiblement, ha estat l'excessiva estimulació dopaminèrgica produïda pels fàrmacs agonistes sobre l'estriat ventral (NAc), prou preservat en aquests malalts joves, en comparació amb la ja degenerada via nigroestriatal (Merims and Giladi, 2008) (Lawrence et al., 2003).

Malalties relacionades amb la dopamina

La dopamina està implicada en patologies neurològiques i psiquiàtriques: la disminució de la transmissió dopaminèrgica a l'estriat per degeneració de la via nigroestriatal s'associa als símptomes motors de la PD, de l'atròfia multisistèmica i d'altres parkinsonismes. En canvi, l'augment de la dopamina en la via mesocorticolímbica i la disfunció dopaminèrgica

a nivell del còrtex i hipocamp es relacionen respectivament amb els símptomes positius (al·lucinacions, deliris) i negatius (aïllament social, pobresa en l'expressió verbal, els pensaments, els afectes i la motivació) de l'esquizofrènia. En el trastorn per dèficit de l'atenció i hiperactivitat hi ha un dèficit en el control dopaminèrgic a nivell prefrontal i estriatal. En les addiccions hi ha una alteració dopaminèrgica en les àrees límbiques i corticals.

De tots aquests quadres, hem volgut revisar especialment la Malaltia de Parkinson per la seva relació amb el model de parkinsonisme en rata que hem estudiat.

Malaltia de Parkinson idiopàtica i altres parkinsonismes

El parkinsonisme és una síndrome clínica neurològica que agrupa una sèrie heterogènia de malalties de causes diverses, però amb el denominador comú de l'alteració motora que es plasma en signes com la tremolor, la rigidesa, la bradicinèsia i el trastorn postural. Sota la denominació comú de parkinsonisme es recullen les següents entitats clíniques:

- Malaltia de Parkinson, la més freqüent.
- Paràlisi supranuclear progressiva.
- Parkinsonismes farmacològics degut a) neurolèptics clàssics del grup de les fenotiazines i butirofenones com l'haloperidol; b) neurolèptics utilitzats pel tractament del vertigen (proclorperazina), la dispèpsia i els vòmits (metoclopramida) o la depressió bipolar (clorpromazina); c) la reserpina utilitzada abans com antipsicòtic i antihipertensiu; d) els antagonistes del calci (flunarizina, cinnarizina); e) l'anticonvulsivant valproat sòdic, principalment. (Index farmacológic, 2000; Lees et al., 2009).
- Atròfies multisistèmiques
- Parkinsonisme vascular
- Encefalopatia multiinfart
- Leucoencefalopatia de Binswanger
- Malaltia d'Alzheimer.
- Hidrocefalia normo o hipertensiva.

La malaltia de Parkinson esporàdica o idiopàtica (PD) (per diferenciar-la de la PD familiar de base genètica) va ser descrita fa més de 180 anys per James Parkinson com una paràlisi agitant (Parkinson, 1817). Encara que el seu estudi ha generat i genera una ingent quantitat de literatura científica, en totes les referències es segueix afirmant "malaltia de causa desconeguda". El que sí és cert és la manca de tractament curatiu, tanmateix l'enorme quantitat de dades epidemiològiques, clíniques i experimentals acumulades durant els darrers 50 anys, perfilen més clarament la seva fisiopatologia, així com els abordatges terapèutics actuals i futurs.

Epidemiologia de la PD

La PD es considera el segon trastorn neurodegeneratiu més freqüent a la població mundial, després de la malaltia d'Alzheimer, amb una incidència de 20 casos/100.000 habitants/any i una tendència a l'alça paral·lela a l'augment de l'esperança de vida de la població (Schapira and Olanow, 2004). Hi ha, tanmateix, controvèrsia sobre les dades epidemiològiques de la PD degut, en part, a la dificultat d'establir el diagnòstic precís de la malaltia i en part, als freqüents casos no diagnosticats.

Els estudis d'incidència demostren que la taxa de PD augmenta considerablement després de la cinquena dècada de vida, amb una edat d'inici promig de 60 anys i una major incidència entre els homes, també s'observen diferències ètniques (Van Den Eeden et al., 2003). La prevalença augmenta a mida que augmenta l'edat del grup estudiat: és del 0,9% en persones de 65-69 any; del 1,5% en les que tenen entre 70 i 74 anys; de 3,7 en les de entre 75 i 79 anys; 5% entre els de 80-84 anys i de 5,1% pel grup de 85-89 anys, de manera que l'edat es converteix en el primer factor de risc d'aquesta patologia (De Rijk et al., 1997). En general, es veu una major incidència entre els familiars dels malalts joves i entre germans bessons quan un d'ells desenvolupa la malaltia abans dels 50 anys (Tanner, 1999).

Respecte a la població espanyola, un estudi epidemiològic en persones d'entre 65 i 85 anys situa la incidència en 186 por cada 100.000 habitants/any (Benito-Leon et al., 2004). Es calcula que al nostre país hauria aproximadament entre 120.000 i 150.000 malalts de Parkinson.

Clínica i diagnòstic de la PD

Per facilitar el maneig clínic dels afectats, es solen descriure quatre etapes evolutives de la malaltia (Juri and Chaná, 2006)

- a) Etapa presimptomàtica, des de l'inici del procés fins que apareixen els primers signes i símptomes, es pot descobrir per tècniques de neuroimatge, en aquelles persones susceptibles de patir un parkinsonisme familiar. Es pensa que aquesta etapa no sobrepassa els set anys de durada i evidentment es considera el moment ideal per aplicar teràpies neuroprotectores que frenin o retardin la progressió de la malaltia (Di Monte, 2002).
- b) Etapa inicial, des de l'aparició dels símptomes fins que es presenten les primers complicacions degudes al tractament farmacològic, pot oscil·lar entre 5 i 10 anys.
- c) Etapa intermèdia, a partir de l'aparició de les complicacions pel tractament i fins que es fan evidents alteracions psiquiàtriques.
- d) Etapa avançada, es fa evident el deterior cognitiu i autonòmic del malalt amb signes

que no responen a levodopa com la imantació de la marxa.

Els signes i símptomes inicials són força inespecífics, els afectats es queixen de lentitud, de pèrdua d'agilitat per realitzar les tasques quotidianes i de gran cansament als petits esforços. Els familiars comenten que l'afectat ha envellit de cop.

Poc a poc es manifesten els signes motors característics que inicialment solen ser unilaterals: bradicinèsia (lentitud dels moviments) i hipocinèsia (retardament en el inici dels moviments), tremolor en repòs que recorda el moviment de rodar boles, rigidesa muscular, actitud postural en flexió, trastorns que provoquen inestabilitat postural, marxa lenta, maldestra i com en bloc, sense braceig, amb facilitat per "quedar clavat al terra" o per "no poder parar", hi ha caigudes freqüents, dificultat en canviar de posició al llit, curiosament el pujar i baixar escales quasi no s'afecta. Hi ha dificultat per realitzar moviments fins i precisos (micrografia i canvis en l'escriptura, dificultat per vestir-se, rentar-se, tallar aliments, tocar instruments, etc).

Pot haver alteracions respiratòries i de la parla per disminució dels moviments respiratoris i dels músculs que controlen la fonació, la vocalització i l'entonació (expressió verbal lenta, monòtona, sense ritme ni entonació). L'expressió facial és rígida, immòbil pobre en parpelleig (Garcia Ruiz i Fontan, 2000).

Es poden presentar alteracions no vinculades directament amb els trastorns motors voluntaris que deterioren la qualitat de vida dels afectats: hiposmia (disminució de la agudesa olfactiva que pot precedir l'aparició dels signes motors), transtorns del SN autònom com disfagia (dificultat per empassar), sialorrea (augment de la salivació), nàusees, enlentiment del trànsit gastrointestinal i restrenyiment, incontinència urinària, disfuncions sexuals i vasculars perifèriques (López del Val y Navas Vinagre, 2000).

En un 40% dels casos, hi ha antecedents de **depressió endògena** (Cummings, 1992) que pot emmascarar els símptomes motors inicials (evidenciant la possible afectació dels circuits mesolímbics implicats en l'estat d'ànim - Becker et al., 1997) i que és viscuda pel malalt com un dels aspectes més desagradables de la seva situació. A més a més, l'antecedent de depressió és molt més freqüent en els casos de PD que evolucionen cap a **demència** (23 % front al 2,3 % de malalts sense l'antecedent de depressió) (Lennox and Lennox, 2002). També pot aparèixer un quadre **psicòtic** secundari a la depressió o al tractament substitutiu amb levodopa, que en parkinsonians grans sol ser l'anunci de demència. En qualsevol grup de malalts s'intenta reduir o eliminar els fàrmacs que poden causar o exacerbar la psicosi: anticolinérgics (benzhexol), inhibidors de la MAO-B (selegilina), antivirals (amantadina) i agonistes dopaminèrgics (ropinirol, cabergolina, bromocriptina, pergolida, pramipexol, rotigotina). L'acceptació de la tremolor i les discinèsies es el preu que alguns malalts han de pagar per millorar la seva salut mental.

La demència terminal és sis vegades més freqüent en els malalts grans de PD que en con-

trols sans, la prevalença és del 30% en malalts majors de 65 anys i de 65% en majors de 85 anys (Mayeux et al., 1990). Els quadres més severs s'associen a símptomes neurològics atípics com trastorn autònom precoç, presentació bilateral i simètrica dels signes motors i la pobre resposta als fàrmacs agonistes dopaminèrgics.

Comparats amb controls sans, els malalts de Parkinson tenen el doble de risc de morir, sobre tot per les complicacions dels traumatismes a conseqüència del trastorn de la marxa. (Bennet et al., 1996)

El diagnòstic en vida del malalt es basa en criteris clínics:

- -la presentació asimètrica dels signes motors.
- -la persistència durant un període llarg de temps de la bradicinèsia hipocinèsia i al menys, dos dels altres signes motors característics: la rigidesa, la tremolor en repòs i la inestabilitat postural.
- -la bona i perllongada resposta al tractament amb L-DOPA (Koller, 1992).

Precisament, la manca de proves diagnòstiques objectives específiques origina un considerable percentatge d'errors en l'etiquetatge dels malalts (24 % dels casos diagnosticats en vida i estudiats en necròpsies (Hughes et al., 1993).

L'estadificació clínica és l'estàndard actual de referència per al seguiment de l'evolució de la malaltia. L'escala més completa i àmpliament utilitzada és la denominada "Escala unificada de valoració de la Malaltia de Parkinson" (UPDRS o Unified Parkinson's Disease Rating Scale) (Fahn and Elton, 1987). Malgrat els seus punts forts, però, l'escala té una sèrie de limitacions clares: els pacients tenen símptomes que varien de dia a dia, pot haver una considerable variabilitat interobservador, a més a més, per definició, l'escala és ineficaç per a detectar la malaltia presimptomàtica.

Per una altra banda, les tècniques d'imatge actuals més sensible per al seguiment de la malaltia són la tomografia per emissió de positrons (PET) que mesura l'absorció de la levodopa en el cos estriat i la tomografia computoritzada per emissió de fotó únic (SPECT) que utilitza el lligand del transportador de dopamina β -CIT. Ambdues tècniques mesuren els canvis del cos estriat, però no els de la pròpia SNc i són majorment sensibles en l'etapa simptomàtica, ambdues tenen un cost elevat que les fa poc accessibles per a un ús ample i encara tenen un altre inconvenient i és que s'han d'aplicar després de com a mínim 12 hores de deixar la medicació. D'altra banda, les tècniques d'imatge per ressonància magnètica (RMI) són més senzilles d'aplicar i relativament més barates que les anteriors. El seu ús en la PD s'ha encaminat a estudiar els canvis en els dipòsits de ferro que s'observen en la SN dels malalts (i tot i que en menor grau, també en els controls sans) i els canvis en l'amplada d'aquest nucli, els resultats obtinguts per RMI no són concloents (Hutchinson i Raff, 2000).

Aspectes neuropatològics i bioquímics de la PD

El diagnòstic de certesa de PD requereix la confirmació neuropatològica post-mortem, a partir de les següents troballes (Marsden, 1990; Lees et al., 2009):

1) Desaparició de més del 60% de les neurones pigmentades de la SNc, visible macroscòpicament en el teixit cerebral mesencefàlic postmortem (vegeu la figura 17) i que es tradueix en la disminució de la immunoreactivitat per a la TH a la SN i a l'estriat. La pèrdua neuronal en la SN característica de la PD, i pràcticament oposada a la observada en l'envelliment fisiològic, afecta principalment a la zona ventrolateral de la SNc que innerva el putamen i és menor en la regió dorsal i ventromedial de la SNc que innerva el caudat.



Figura 17. Microfotografia del teixit mesencefàlic cerebral postmortem a nivell de la substancia negra, pigmentada en un individu normal (A) i d'un afectat per PD que ha perdut gran part de la pigmentació (B). En la part superior es mostra l'esquema dels nuclis caudat i putamen, dianes de les fibres dopaminèrgica nigroestriatals.

Tanmateix, la via nigroestriatal no és la única regió afectada per la neurodegeneració en la PD, la via mesocorticolímbica també degenera en fases avançades. Els malalts de PD afectats de demència, en relació als que no presenten aquesta anomalia, presenten pèrdua neuronal en el lloc ceruli (LC, origen de les neurones noradrenèrgiques centrals) que pot provocar un dèficit de NA del 40 - 80 %, a les àrees de projecció (medul·la espinal, cerebel, matèria grisa central del mesencèfal, amígdala, substància innominada, tàlem, còrtex límbic i neocòrtex). L'afectació dels nuclis del rafe, origen de les neurones serotoninèrgiques centrals (que projecten a la medul·la espinal, cerebel, SN, amígdala, hipocamp, estriat i còrtex) pot provocar en estriat i còrtex una reducció del 50 % de la serotonina i l'àcid 5-hidroxi-indolacètic (5-HIAA, el principal metabòlit). L'afectació del nucli basal de Meynert, origen d'amples entrades colinèrgiques al cervell, fa disminuir l'acetilcolina al neocòrtex i a l'hipocamp. El nucli dorsal del vago (DMV) i el nucli olfactori anterior també es troben afectats (vegeu la figura 18).



Figura 18. Il.lustració de les regions catecolaminèrgiques i serotoninèrgiques centrals que presenten alteracions anatomopatològiques característiques en la malaltia de Parkinson. (Lang A.E. 2008 disponible en: http://www.dana.org/news/publications/detail.aspx?id=12236

2) Disminució del 70-80% de la DA i els seus metabòlits al nucli estriat, especialment en la porció més caudal del putamen on pot arribar a ser del 95% (Marsden, 1990). El quocient molar HVA / DA augmenta un 300 % al nucli caudat (HVA / DA = 3,5) i un 2.200 % al putamen (HVA / DA = 27), el que evidencia un augment del recanvi dopaminèrgic en les neurones romanents de la SNc. Aquesta gran capacitat per a compensar la pèrdua de DA explica l'aparició tardana dels primers signes motors, quan ja més del 80% de les neurones del putamen han desaparegut. 3) Presència característica d'inclusions neuronals anòmales: els cossos (LB) i neurites (LN) de Lewy i els cossos pàl·lids (PB), principalment en les neurones supervivents de la SN i en les àrees catecolaminèrgiques esmentades en 1).

Els LB són inclusions anòmales intraneuronals, esfèriques i eosinofíliques, de naturalesa proteica fibril·lar, el principal component estructural de les quals es la α -sinucleïna (Spillantini et al., 1997), també s'hi detecta ubiqüitina, proteïna neurofilamentosa i alfa-B-cristalina (vegeu la figura 19). Els PB es consideren formes prèvies, més clares i grans que els anteriors. Els LB són característics però no exclusius de la PD, doncs apareixen a altres malalties neurodegeneratives (α -sinucleïnopaties) (Goedert, 2001).

Hi ha controvèrsia quant al paper patogènic dels LB: per a uns, la simple acumulació dels agregats de α -sinucleïna desencadena la patologia (Goedert, 2001). Per a d'altres, la formació d'aquests agregats és un mecanisme segrestador de proteïnes anòmales que protegeix la cèl·lula afectada i que explicaria l'agressivitat i precocitat d'algunes formes familiars de PD que no presenten LB (McNaught i Jenner, 2001) i també que l'expressió d' α -sinucleïna sigui major en les neurones supervivents de la SN que no en les que degeneren (Kholodilov et al., 1999). Per alguns investigadors, la presència d'oligòmers a base de α -sinucleïna formant adductes amb DA i potenciats per ROS, (en lloc de la formació de les fibril·les que formen el cor dels LB) serien els responsables de la toxicitat i la mort de les neurones dopaminèrgiques. (Conway et al., 2001).



Figura 19. Microfotografia d'una secció fina de teixit parafinat corresponent a la SN amb els clàssics cossos de Lewy (LB) i neurites de Lewy (LN) immunoreactius per a l' α -sinucleïna (Li et al, 2008) (esquerra i centre) i per ubiqüitina (dreta) disponible : http://www.nature.com/nm/journal/v14/n5/fig_tab/nm1746_F2.html

Basada en la distribució anatòmica i l'aparició cronològica de les inclusions neuronals anòmales, l'anatomista Braak (Braak et al., 2003) hipotetitza que s'ha de buscar l'inici de la neurodegeneració dopaminèrgica en els nuclis motors dorsals dels nervis glossofaringi i vago i/o als bulbs olfactoris, on es troben LB i LN que progressen, en direcció ascendent, cap als ganglis basals subcorticals i finalment cap a les àrees corticals (on es troben els PB), progressió en paral·lel a la de la malaltia, des de les fases preclíniques a les fases terminals amb afectació cognitiva. Braak i altres troben les inclusions anòmales fins i tot en estructures nervioses perifèriques com el gangli celíac i el sistema nerviós entèric dels malalts de PD (Pan-Montojo et al., 2010) suggerint una possible relació causal entre noxes que utilitzen el tub digestiu i les vies aèries superiors com a porta d'entrada i la PD.

Tractament farmacològic de la PD

No hi ha un tractament curatiu per a la PD, de manera que l'objectiu terapèutic és neuroprotector i simptomàtic, encaminat a retardar l'evolució de la malaltia, minimitzar els símptomes i disminuir els efectes indesitjables de la medicació. Com en qualsevol malaltia crònica, és imprescindible potenciar hàbits saludables en els afectats i recolzar-se en teràpies complementàries (psicoteràpia, fisioteràpia, logoteràpia i teràpia ocupacional) que poden millorar molt la seva qualitat de vida.

En relació als **agents neuroprotectors**, aquells que poden actuar favorablement sobre la patogènesi o el curs de la malaltia produint efectes perdurables mesurables, Ravina et al. (2003) fan una avaluació sistemàtica dels que han demostrat una certa eficàcia en models animals, dels que hi ha dades sobre la seva seguretat i capacitat de travessar la BHE en humans i dels que hi ha estudis farmacològics i/o epidemiològics controlats i en seleccionen 12, entre ells: la cafeïna, la nicotina, la coenzim Q10, els estrògens, l'antibiòtic minociclina, els inhibidors selectius de la MAO-B (rasagilina-selegilina, sobre tot el primer que no produeix els metabòlits amfetamínics del segon i del que hi ha evidència d'un efecte anti-apoptótic) i els agonistes dopaminèrgics (ropinirole i pramipexole) dels que hi ha evidències d'un cert efecte antioxidant i antiapoptòtic in vitro. L'antiviral amantadina s'utilitza perquè millora alguns signes de la PD, com altres fàrmacs amb acció antiglutamatèrgica (ramacemida, riluzol) s'ha estudiat el seu possible efecte neuroprotector en contrarrestar la exitotoxicitat derivada de la hiperactivitat del nucli subtalàmic (glutamatergic) en la PD. Actualment, per cap d'ells s'ha demostrat una acció neuroprotectora clara (Valldeoriola i Villegas, 2007) (vegeu la pàgina 53).

Pel tractament substitutiu, la L-DOPA (levodopa), tot i ser l'agent antiparkinsonià més antic, continua sent el més efectiu. La naturalesa polar de la DA impedeix el seu pas a través de la BHE, en canvi el seu precursor L-DOPA la travessa com aminoàcid actiu i es transforma en DA a nivell de les terminacions dopaminèrgiques de les neurones romanents i d'altres cèl·lules amb AADC. La levodopa millora els símptomes motors de la PD de forma dosi-depenent, fet que serveix per confirmar el diagnòstic clínic de la malaltia (LeWitt, 2008). Curiosament, en la medicina tradicional ayurvédica, la pols de la leguminosa *mucuma pruriens*, molt rica en levodopa, s'ha utilitzat des de molt antic pel tractament del Parkinsonisme, en el 2004, Katzenschlager et al. han presentat un estudi clínic i farmacològic a doble cec en un petit grup de parkinsonians demostrant alguns avantatges del preparat natural respecte del tractament farmacològic habitual.

Desgraciadament, el tractament crònic amb L-DOPA comporta, invariablement, l'aparició de discinèsies invalidants (moviments involuntaris distònics i coreics), fluctuacions motores ON-OFF (períodes d'activitat motora discinètica i períodes acinètics) i fenòmens de congelació ("freezing"), entre 2 i 5 anys després de l'inici, en el 40 % dels tractats i en el 90 % dels malalts després de 10 anys de tractament (Lane and Dunnett, 2008).

En un principi, les discinèsies s'han atribuït a l'augment dels receptors dopaminèrgics postsinàptics en l'estriat mancat de DA (Ungerstedt, 1971). Actualment, es creu que el dèficit dopaminèrgic estriatal altera l'expressió gènica de les neurones espinoses mitjanes, augmentant la densitat dels receptors D2 en la via estriat-pal·lidal indirecta i disminuint la dels receptors D1 en la via estriat-nigral directa, on a més a més, alteraria l'acoblament dels receptors al sistema de transducció que activa ERK1/2, l'activació repetida de la qual provocaria les discinèsies (Gerfen, 2010).

Per retardar l'aparició dels fenòmens ON-OFF i les discinèsies, en afectats joves en fase inicial, es tendeix a disminuir la dosi de levodopa, combinant-la amb fàrmacs complementaris

Pel tractament complementari es compta amb els següents grups de farmacs:

a) *Inhibidors de la DDC* (carbidopa o bencerazida) que eviten la conversió perifèrica de levodopa a DA i els efectes cardiocirculatoris indesitjables deguts a l'efecte simpaticomimètic sobre els receptors B1-adrenèrgics (taquicàrdia, hipotensió, nàusees) (LeWitt, 2008).

b) *Inhibidors de la COMT* (entacapone i tolcapone) que eviten el metabolisme enzimàtic de la DA i asseguren una major concentració sanguínia perifèrica i central.

c) *Inhibidors de la MAO-B* (selegilina-deprenil® o rasagilina), eviten el metabolisme cerebral de la DA. La selegilina, a més, inhibeix la recaptació de la DA i té propietats antioxidants. A començament dels anys 90 va ser inclosa en l'estudi DATATOP (prospectiu, a doble cec, randomitzat i controlat contra placebo) per esbrinar la seva capacitat neuroprotectora en front a altes dosis de vitamina E, en les fases inicials de la malaltia. Es va concloure que la millora de la simptomatologia motora després d'un any de seguiment era probablement conseqüència de la seva acció farmacològica més que de la neuroprotectora (Parkinson study group, 1996).

d) Agonistes dopaminèrgics tipus no ergòtics (pramipexole i ropinirole) i ergòtics (cabergolina,

bromocriptina, pergolide, lisuride). En dos estudis prospectius, REAL-PET (Whone et al., 2003) i CALM-PD (Parkinson Study Group, 2000), mitjançant l'ús de tècniques d'imatge funcionals i comparats amb levodopa, aquests fàrmacs han demostrat una menor pèrdua de neurones dopaminèrgiques, perquè són més neuroprotectors i/o bé perquè són menys tòxics que aquella, tanmateix s'ha de tenir en compta que els primers estudis amb tècniques de neuroimatge han donat resultats contradictoris.

e) Anticolinèrgics (benzatropina, biperidén) (LeWitt. 2008).

Tractament Quirúrgic de la PD

Les primeres experiències en el tractament quirúrgic estereotàctic de la PD daten de mitjans del segle passat. L'any 1947, Spiegel i Wycis han aconseguit construir un aparell estereotàctic per humans similar als utilitzats des de principis del segle en micos, a més, han perfilat les coordenades per abordar zones corticals i subcorticals del cervell humà i coneixen la relació funcional entre el tàlem i l'escorça motora primària, també són testimonis de les desastroses conseqüències, sobre la personalitat i la conducta, de la lobotomia prefrontal aplicada per tractar alguns signes de la PD, de tot això se'n deriven les primeres intervencions que realitzen i publiquen per tractar la tremolor asimètrica intractable de la PD: ablacions dels nuclis dorsomedial i vetrolateral del tàlem que milloren el quadre.

La introducció del tractament farmacològic amb levodopa, a mitjans dels 60, va minvar l'entusiasme inicial per l'abordatge quirúrgic, que tanmateix va reprendre rellevància cap a finals dels 70 per dos motius, primer pel desenvolupament de la tomografia axial computoritzada (TAC) que simplificava i augmentava la precisió de la tècnica estereotàctica i segon, per l'acumulació d'evidències dels efectes indesitjables de la levodopa a mig i llarg termini (discinèsies, ON-OFF i "freezing"), efectes que es van començar a tractar amb la pallidotomia posteroventral (ablació de la porció motora del GPi) (Guridi i Obeso, 1995).

Segons els conceptes fisiopatològics dels ganglis basals, la lesió del GPi (que amb la SNr són els dos nuclis de sortida dels GB cap el tàlem) ha de reduir la hiperactivitat inhibidora d'aquest nucli i retornar l'equilibri al sistema (vegeu la figura 20).

La pal·lidotomia unilateral millora en més d'un 30%, pràcticament tots els signes motors de la PD de predomini asimètric, en malalts molt discinètics, sobre tot en el cantó contralateral i augmenta la perfusió de l'àrea motora suplementària i còrtex prefrontal casi als valors normals (valorat per PET); en el cantó ipsilateral al tractat, el benefici no és tan gran ni tan mantingut en el temps. En conjunt, milloren les activitats de la vida quotidiana valorades per la UPDRS, però el malalt no pot reduir la medicació substitutiva.

La pal·lidotomia bilateral no es realitza per les alteracions cognitives i del llenguatge que comporta.

Com a alternativa a la pal·lidotomia es practica **DBS-GPi** ("deep brain stimulation" o estimulació cerebral profunda del GPi) uni o bilateral, que a més d'evitar les complicacions de la pal·lidotomia bilateral, millora en casi un 40% els signes cardinals de la PD i es manté fins a 3 anys, baldament el malalt no pugui deixar la medicació.

La DBS-VIM unilateral (estimulació cerebral profunda del nucli intermediventral del tàlem) es realitza sobre tot per controlar la tremolor en el costat contralateral, tanmateix, la col·locació bilateral d'elèctrodes és ben tolerada.



Figura 20. Esquema d'un tall coronal del Cervell humà amb els nuclis basals diana de la cirurgia en la PD: el globus pàl·lid intern (GPi), el tàlem i el nucli subtalàmic (STN) (Ford, 2005).

Actualment, la tècnica quirúrgica d'elecció per a la PD és la DBS-STN (nucli subtalàmic) uni o bilateral. Va ser introduïda en la dècada dels 90, a França, pel Dr. Benabid, en constatar la desaparició de la tremolor per l'estimulació elèctrica del nucli, mentre explorava un malalt en el curs d'una talamotomia (Ford, 2005). Els seus avantatges respecte de les dues tècniques anteriors són: a) un efecte sobre les dues eferències dels ganglis basals (GPi i SNr) i sobre el sistema troncoencefàlic que millora la marxa, l'equilibri i la postura, b) fàcil localització cerebral del STN, c) mida petita (160 mm3 comparat amb el GPi que té 458 mm³) que facilita l'accés de l'estimulació elèctrica a les unitats neuronals sobre les que es vol actuar, d) pot abolir totalment la tremolor, e) redueix la dosi de levodopa, f) no provoca una lesió permanent del STN, sinó que l'estimula de forma reversible i programada. A pesar dels beneficis, alguns grups fan servir les lesions al STN en lloc de l'estimulació cerebral profunda, per l'elevat cost del tot el sistema d'estimulació i per la dificultat de regular els paràmetres d'estimulació en alguns malats (Guridi et al., 2004).

La reinnervació estriatal mitjançant implants de cèl·lules dopaminèrgiques obtingudes d'embrions de 7 - 8 setmanes s'ha provat en alguns casos de malalts avançats de PD, amb distints abordatges (Freed et al., 1992): implants unilaterals en els caudat i putamen contralaterals al costat amb signes més greus de PD i implants bilaterals en el putamen. Els resultats, en un principi, s'han considerat positius doncs tant els que han seguit teràpia immunosupressora com els que no, han millorat en les escales de valoració de la activitat de la vida diària i de l'activitat motora. La medicació s'ha pogut reduir en tots els casos (7) un 40% de mitjana i l'estudi de PET amb fluorodopa practicat a un dels malalts ha estat compatible amb la supervivència de l'implant dos anys després de la cirurgia. El mateix grup d'investigadors, nou anys més tard (Freed et al., 2001) ha publicat els resultats d'un estudi comparatiu entre implants bilaterals en putamen i placebo (sols es perfora la calota craniana, però no la duramàter) en un grup de 40 malalts; sols els implantats joves presenten una certa millora clínica respecte del grup control placebo, no detecten diferencies entre els malalts grans i en canvi comptabilitzen greus discinèsies en una important proporció dels implantats, corroborades per altres grups (Olanow et al., 2003) i que poden tenir relació amb la situació dels implants dins el putamen. Tot i que les cèl·lules implantades sobreviuen i creixen en el teixit hoste, actualment no es recomanen els implants de cèl·lules embrionàries com a teràpia de la PD.

Dins el camp de la neurorestauració dopaminèrgica actualment també es treballa amb factors de creixement com el GDNF que ha donat bons resultats quan s'administra a l'estriat mitjançant bombes d'infusió (Gill et al. 2003) i altres cèl·lules productores de dopamina com les del cos carotidi que van mostrar beneficis motors en micos (Luquin et al. 1999).

Etiologia de la PD

A pesar que ara es coneixen varies mutacions genètiques causants de parkinsonisme hereditari en un nombre molt reduït de famílies afectades i a pesar que l'exposició a tòxics ambientals, com a causa dels quadres esporàdics, ha estat la hipòtesi etiològica més acceptada, actualment es tendeix a considerar la PD idiopàtica com una síndrome de causa multifactorial, amb una predisposició genètica sobre la que interactuen de forma complexa tòxics interns i externs i factors ambientals, per desencadenar-la (Olanow, 2007). En aquest apartat revisem les dues hipòtesis etiològiques més estudiades de la PD, la tòxica i la genètica:

L'exposició a tòxics ambientals es va considerar de risc des del moment que el Dr. Parkinson va descriure la malaltia, a l'Anglaterra de la revolució industrial. Des d'aleshores, com a possibles candidats s'han assenyalat molts pesticides i herbicides, per posar uns exemples: el paraquat que presenta similitud estructural amb la neurotoxina MPP⁺. El DDT i dieldrin (pesticides organoclorats extensament usats durant la segona meitat del passat segle, sobre tot en els conreus de blat de moro i cotó i que es troben significativament augmentats en el teixit cerebral postmorten de parkinsonians en relació als controls sans). El plaguicida heptaclor que ha estat totalment prohibit a principis dels 90 per la seva toxicitat i llarga permanència en la cadena tròfica i que altera l'expressió de DAT. Carbamats i tiocarbamats, insecticides que estan àmpliament presents en processos industrials, farmacèutics i agrícoles, i que s'han demostrat tòxics pel sistema nigroestriatal, actuant de forma sinèrgica amb altres neurotoxines. Els pesticides organofosfatats i derivats de la rotenona (un dels pocs pesticides permesos a l'agricultura biològica fins l'any 2007) són inhibidors del complex I de la cadena respiratòria mitocondrial i s'han utilitzat per modelar la PD en rosegadors.

De fet, una de les pistes més consistents aportades pels estudis epidemiològics sobre la PD és la seva relació amb, al menys, un dels següents factors de risc: residir en zona rural, treballar en granges, consumir aigua de pou, estar exposat a plaguicides i herbicides (Di Monte, 2002), ser treballador de "mono blau", miner del manganès, treballador industrial exposat a metalls pesants, àcid cianhídric, laques i solvents orgànics, (Pezzoli et al., 2000).

En canvi, dins la llarga llista de tòxics ambientals no s'inclou el tabac, que fins i tot sembla ser neuroprotector dopaminèrgic en forma dosidependent (comprovat en cultius cel·lulars i model de PD en rosegadors), actuant a través de la inhibició de la MAO-A i B que disminueix el metabolisme de la DA i la producció de radicals lliures que se'n deriva, a més d'evitar l'activació de neurotoxines com l'MPTP. En l'estriat i la substància negra postmortem de grans fumadors s'ha comprovat la disminució significativa del quocient HVA/ DA, com a índex de recanvi dopaminèrgic, a més els fumadors presenten nivells baixos d'activitat MAO A i B. (Seidler et al., 1996).

Un estudi sobre el consum de te en la població xinesa (Chan, 1998) i experiments amb cafeïna administrada a rosegadors hemiparkinsonians (lesionats amb 6-OHDA i MPTP) han demostrat característiques protectores de la cafeïna front la degeneració nigroestriatal. El mecanisme proposat és el bloqueig dels receptors A2A d'adenosina abundants a l'estriat i que interaccionen amb els receptors tipus D2 per modular les neurones GABAèrgiques estriat-pal·lidals de la via indirecta (Ferré et al., 1997).

L'any 1983 als EEUU, un grup de joves toxicòmans van ser diagnosticats de parkinsonisme irreversible després de consumir heroïna contaminada amb una, fins aleshores, desconeguda substancia, l'MPTP. Aquest fet va aportar una evidència, encara més convincent, en favor del tòxic ambiental com a causa de la PD. Els joves afectats, que com els malalts de PD respongueren bé al tractament amb levodopa, van morir entre 3 i 16 anys després de l'inici de la síndrome i l'estudi anatomopatològic dels seus cervells va aportar moltes dades: la esperada pèrdua neuronal a la SNc era present a tots, en canvi, els característics LB i LN no, probablement per la rapidesa de la neurodegeneració aguda post toxina; en alguns s'observà marcada gliosi i concentració de micròglia al voltant de les neurones de la SN; un d'ells mostrà intensa acumulació extraneuronal de neuromelanina a la SN. A partir d'aquests resultats es va plantejar la hipòtesi patogènica inflamatòria causada per la neurotoxina i perpetuada en el temps per citoquines d'origen glial (Langston et al., 1999).



Figura 21. Subestructura de la dopamina i dels agents químics que poden induir parkinsonisme en humans (Ubeda, 2000)

Tòxics endògens com les tetrahidroisoquinolines i les betacarbolines, també s'han relacionat amb la PD, les betacarbolines són alcaloides naturals presents a alguns aliments rics en 2-feniletilamina com la xocolata i alguns formatges fermentats (Olanow i Tatton, 1999), aquests compostos comparteixen una similitud estructural amb l'MPTP i un dels seus hipotètics mecanismes d'acció, doncs, en ser bioactivats a les formes quinolini i carbanili, respectivament, interfereixen amb la respiració mitocondrial (Di Monte et al., 2002). Finalment, recolzant la causa toxicològica, hi ha la sèrie de fàrmacs registrats amb efectes indesitjables parkinsonitzants, que com la majoria dels compostos orgànics citats, presenten una agrupació estructural pròxima a la DA (vegeu la figura 21) (Ubeda, 2000). L'estrès oxidatiu va ser la primera hipòtesi etiopatogènica desenvolupada per explicar la neurotoxicitat de tots aquests compostos.

La causa genètica de la PD ha generat una gran quantitat d'estudis i dades rellevants. En un principi, es potencià la cerca de mutacions en els gens que codifiquen per proteïnes relacionades amb l'estrès oxidatiu a les neurones dopaminèrgiques mesencefàliques, com Apo-4, tirosina hidroxilasa, glutatió peroxidasa, catalasa, superòxid dismutasa Cu/Zn citosólica (SOD-1) i mitocondrial (SOD-2), receptors dopaminèrgics tipus D2, D3 i D4. En cap cas s'ha pogut relacionar l'alteració única de qualsevol d'aquests gens amb la malaltia (Gasser et al., 1994), tot i que els ratolins deficients en SOD-1 o SOD-2 es mostren més sensibles que els controls a la toxicitat per l'MPTP, fet que apunta a una predisposició genètica per a la PD (Good et al.,1997). Coherent amb l'anterior, s'ha demostrat que la sobreexpressió de la SOD-1 o SOD-2 en els ratolins atenua la toxicitat de MPTP (Przedborski et al., 1992; Klivenyi et al., 1998).

Polimorfismes en certs gens, com els que codifiquen per a la proteïna transportadora de DA (DAT), la α -1-antiquimiotripsina, la MAO-B i el citocrom P450-1A1 (CYP1A1) s'han associat, també, amb un major risc de patir MP (Prasad et al., 1999).

Una activitat alterada del complex I mitocondrial observada en la SN, plaquetes i fibres musculars de necròpsies de malalts de PD estimulà la cerca de mutacions en els gens mitocondrials o nuclears que codifiquen pels components de la cadena respiratòria (Schapira et al., 1990). El DNA mitocondrial, a més a més, és molt susceptible d'acumular mutacions amb l'edat per estar crònicament exposat a radicals lliures derivats de l'oxigen (ROS), per mancar-li un revestiment d'histones i per tenir pocs sistemes reparadors. Hi ha controvèrsia en les dades, doncs alguns estudis no troben defectes específics en els gens de la cadena respiratòria (Olanow i Tatton, 1999), mentre que d'altres utilitzant cíbrids (a partir de plaquetes de malalts de Parkinson i cèl·lules deficients en mtDNA per exposició a bromur d'etidi) observen un defecte específic del 25% en l'activitat del complex I que demostra que en aquest grup de malalts l'alteració de la cadena respiratòria es causada per mutació del mtDNA (Gu et al., 1998).

Recentment, s'han identificat alteracions genètiques (mutacions, duplicacions, triplicacions) en distintes formes de PD familiar d'inici precoç (abans de la cinquena dècada de vida) (vegeu la Taula 3). El primer gen identificat va ser el SNCA o PARK1 que codifica per a la proteïna α -sinucleïna, amb tres distintes mutacions conegudes fins ara: A53T (Polymeropoulos et al., 1997), A30P (Kruger et al., 1998) i E476K (Zarranz et al., 2004).

| Locus | ocus Map | | Inherit. | Gene/Protein |
|--------|------------------|-------|-----------|--------------------|
| PARK1 | 4q21 | 40s | Dominant | SNCA/a-synuclein |
| PARK2 | 6q25 | 20s | Recessive | PARK2/parkin |
| PARK3 | 2p13 | 60s | Dominant | Unknown |
| PARK4 | 4q21 | 30s | Dominant | α-Synuklein Trip.n |
| PARK5 | 4p14 | ~ 50 | Dominant | UCHL1 |
| PARK6 | 1p35-37 | ~ 40 | Recessive | PINK1 |
| PARK7 | 1p38 | ~ 40 | Recessive | PARK7/DJ-1 |
| PARK8 | 12p11.2- 13.1 | ~ 50 | Dominant | PARK8/LRRK2 |
| PARK10 | 1p32 | 50-60 | Dominant | Unknown |
| PARK11 | 2q34 | late | Dominant | Unknown |

| Taula J. Relacio de les mulacions geniques responsables de formes familiais de la | Taula | 3. | Relació | de | les | mutacions | gèniq | ues r | esponsables | de | formes | familiars | de | la | Ρ | D |
|---|-------|----|---------|----|-----|-----------|-------|-------|-------------|----|--------|-----------|----|----|---|---|
|---|-------|----|---------|----|-----|-----------|-------|-------|-------------|----|--------|-----------|----|----|---|---|

L' α -sinucleïna és un dels principals components dels LB i LN. Es tracta d'una petita proteïna acídica que es localitza a prop de les vesícules sinàptiques amb les que pot interaccionar (d'aquí el rol que se li atribueix en la sinaptogènesi), així com amb moltes proteïnes, de les que pot modificar l'activitat: TH, DAT, proteïna14-3-3, MAPK, PL, D2, PKC, parkina, tau...el que fa pensar en un paper de xaperona per a l' α -sinucleïna.

Quan es troba mutada o quan augmenta la seva expressió a la cèl·lula, l' α -sinucleïna és propensa a perdre la seva estructura nativa soluble i a autoagregar-se i enganxar-se amb d'altres proteïnes formant inclusions insolubles que alteren el funcionament del sistema proteolític ubiqüitina-proteasoma (UPS). A més, la formació d'oligòmers tòxics de la proteïna és estimulada per la presència de ions metàl·lics, per l'augment de la força iònica i la concentració de proteïnes i per la disminució del pH. Aquests oligòmers d' α -sinucleïna podrien provocar pors en la membrana plasmàtica, la del reticle endoplasmàtic o en les vesícules sinàptiques, alterant l'homeòstasi iònica (Ca²⁺) i la localització normal dels neurotransmissors en la terminació sinàptica (Conway et al., 2000; Cookson i Van der Brug, 2008).

Les alteracions en el gen de l' α -sinucleïna provoquen formes autosòmiques dominants de PD familiar amb inclusions intraneuronals indistingibles de la PD, alteracions similars es reprodueixen en models cel·lulars i en ratolins transgènics que la sobrexpressen (Olanow, 2007).

Posteriorment es va identificar una mutació en el gen de la parkina, PRKN o PARK2, que s'associa a un quadre de PD autosòmic recessiu. La parkina és una ubiqüitina lligasa involucrada en el sistema UPS. Els afectats tenen nivells alts de substrats no ubiqüitinilats de parkina, a més de mitocondris morfològicament alterats amb fragmentació de les crestes. Aquest és el tipus de mutació que més freqüentment s'ha trobat en parkinsonians joves. La proteïna Uch-L1, al seu torn, catalitza la desunió entre la ubiqüitina i la proteïna que es dirigeix al proteasoma, la mutació del gen UCH-L1 o PARK5, a més d'alterar el UPS, redueix el nivell de ubiqüitina necessària per a la degradació d'altres proteïnes inservibles. La proteïna codificada pel gen PINK1 o PARK6 és una serina /treonina kinasa mitocondrial que sembla protegir de l'estrès oxidatiu i de la inhibició del proteasoma, es creu que actua en la mateixa via que la parkina, però cascada amunt. La mutació del gen resulta en una forma autosòmica recessiva juvenil de PD.

La proteïna codificada pel DJ-1 o PARK7 es creu que actua com un sensor de l'estrès oxidatiu o com una xaperona, la seva mutació propicia la agregació de la α -sinucleïna.

Per últim, la mutació del gen LRRK2 o PARK8 que codifica per a la quinasa rica en leucina 2 també indueix neurodegeneració, a més de trobar-se en casos autosòmics dominants de PD familiar, està present en un 3% dels casos esporàdics d'inici tardà. Per la seva estructura es creu que actua com a quinasa lligada a la membrana externa mitocondrial externa, des d' on interactuaria amb la parkina (Hernandez et al., 2005).

Hipòtesis sobre els mecanismes patogènics de la PD

Probablement, hem de renunciar al desig d'un únic mecanisme, en favor de distints mecanismes patogènics que porten a la neurodegeneració de la PD. En aquest apartat revisem doncs les principals hipòtesis de perquè i com degeneren les neurones dopaminèrgiques sigui quina sigui la causa desencadenant:

A) L'estrès oxidatiu es defineix com un desequilibri redox degut a la producció excessiva de substancies oxidants, principalment radicals lliures derivats de l'oxigen, ROS ("reactive oxigen species") i RNS ("reactive nitrogen species") i/o al dèficit de sistemes antioxidants. Distintes característiques estructurals del cervell el fan especialment vulnerable a l'estrès oxidatiu. De fet, l'estrès oxidatiu, com a causa primària o com a producte d'altres disfuncions cel·lulars causades per toxines exògenes i/o endògenes i/o un perfil genètic facilitador, ha estat el primer mecanisme patogènic seriosament considerat, tant en la PD com en d'altres malalties neurodegeneratives (vegeu la figura 23). (Olanow, 1993; Chinta i Andersen, 2008):

- 1- El cervell representa sols el 2% del pes total del cos, però consumeix el 20% de l'oxigen total en repòs.
- 2- L'elevada proporció d'àcids grassos poliinsaturats com a components de les membranes neuronals, les fan molt susceptibles a l'oxidació.



3- El cervell presenta nivells baixos d'antioxidants: pobre activitat catalasa i glutatió peroxidasa (GPO) i dèficit dels sistemes antiradicalaris glutatió reduït (GSH) i vitamina E.

> Figura 22. Esquema de la homeòstasi del ferro a nivell cerebral, on la barrera hematoencefàlica "filtra" el ferro plasmàtic i els oligodendròcits, la micròglia i les neurones en són els principals reservoris. La expressió de la proteïna intracel·lular lligadora de ferro, la ferritina, és molt baixa en els astròcits, per la qual cosa, es creu que aquestes cèl·lules glials no n'emmagatzemen gaire (Zecca et al., 2004). Disponible http://neurobsesion.com/page/19/

- 4- El ferro és un cofactor essencial per a distintes proteïnes involucrades en el funcionament normal del teixit nerviós, entre d'altres els complexes de la cadena respiratòria mitocondrial i la TH. Hi ha una progressiva acumulació de ferro, en funció de l'edat, especialment, en les zones del cervell relacionades amb les funcions motores, com el globus pàl·lid i la substància negra (inclús per sobre de les concentracions hepàtiques) i en putamen, còrtex motor i còrtex prefrontal, zones especialment proclius a la neurodegeneració en la PD i la malaltia d'Alzheimer. La causa de la concentració augmentada de ferro en les esmentades regions no es coneix però s'ha especulat amb determinats polimorfismes genètics relacionats amb el transport i emmagatzemament del ferro o bé possibles alteracions en la permeabilitat de la barrera hematoencefalica a nivell de la SN (vegeu la figura 22) (Zecca et al., 2004).
- 5- Al cervell, es troba una baixa concentració de transferrina (proteïna transportadora de ferro, proporcionalment menor que a la sang, amb aparició de ferro lliure al líquid cerebroespinal (CSF), ferro reactiu que actua com a potenciador de les reaccions de Fenton i de Haber-Weiss generadores de ROS (vegeu c i d del requadre 1).
- 6- Els principals generadors d'energia de les cèl·lules, els mitocondris són al mateix temps una font de ROS i la immediata i vulnerable diana dels mateixos.
- 7- El metabolisme dels neurotransmissors com la dopamina produeix ROS tant per via enzimàtica (vegeu a del requadre 1) com per autooxidació no enzimàtica a pH neutre, que genera quinones i semiquinones, aquestes últimes especialment citotò-xiques per la seva tendència a iniciar un cicle redox que continua fins a produir la depleció total del NADPH i del oxigen citoplasmàtic (vegeu *b* del requadre 1). El potencial generador de ROS del metabolisme de la DA, DOPAC i L-DOPA es pot veure incrementat, encara més, si augmenta el recanvi dopaminèrgic com a compensació d'una pèrdua neuronal (vegeu la pàgina 30).

La cascada de reaccions oxidatives s'autopropaga, de manera que un ROS tendeix a generar un altre, així, en presencia del ió ferrós (Fe²⁺), el peròxid d'hidrogen (H₂O₂) es pot autooxidar, per la denominada reacció de Fenton, produint el radical hidroxil (HO[•]) (vegeu *c* del requadre 1), un dels radicals lliures més reactius, especialment amb els grups sulfhidril (-SH) (del glutatió reduït i de les proteïnes) i els lípids insaturats, però també, amb el ADN, ARN i carbohidrats.



Requadre 1. hipòtesi de l'estrès oxidatiu en la PD

Una altra font de radicals hidroxil és la denominada reacció de Haber-Weiss, mitjançant la qual l'anió superòxid (O_2^{-}) reacciona amb el peròxid d'hidrogen (vegeu *d* del requadre 1) i encara una reacció addicional pot generar peroxonitrits (RNS) derivats de l'òxid nítric (NO) (vegeu *e* del requadre 1).

Quan es revisa la qüestió en la PD, es troben moltes evidències d'un important quadre oxidatiu en la SN del teixit cerebral postmortem de malalts (i de models animals):

1- Elevat contingut de substancies com 4-hidroxinonenal i malondialdehid, demostratives de la peroxidació lipídica. Increment dels nivells de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina que reflecteix l'oxidació del DNA. Augment d'adductes catecol-proteïna com a productes derivats de l'oxidació proteica que pot suposar fins al 40% d'increment respecte dels controls i que no deixa de sorprendre, si es té en compta que les neurones dopaminèrtgiques de la SNc representen sols del 5 al 15 % de totes les cèl·lules que conformen aquest nucli. L'augment d'encreuament proteic es plasma en la presència dels anòmals cossos de Lewy (LB), en els que es detecta α -sinucleïna nitrosilada en tirosines, un fet indicatiu de la formació de radicals 'NO que probablement contribueix a la pèrdua de la solubilitat de la proteïna i promou la seva agregació (Giasson, 2000)(Di Monte, 2002).

2- Hi ha una elevació de la ràtio GSSG / GHS que demostra el desgast d'un dels

principals sistemes antiradicalaris cel·lulars (Riederer et al., 1989) i un augment dels adductes catecol-cisteïnes, superior al que es troba en l'envelliment fisiològic. Aquests compostos intervenen en el procés de formació de la neuromelanina (vegeu la figura 10).

3- Hi ha una afectació del metabolisme del ferro i altres ions metàl·lics a la SN, amb un augment del ferro total, una disminució del coure i una elevació del zinc (Dexter et al., 1987). D'altre banda, els grànuls de melanina de la SN i el noradrenèrgic lloc ceruli (LC) tenen un gran capacitat quelant de ferro, però amb l'edat, l'homeòstasi del ferro es manté més conservada en LC que en SN, on es troben els LB amb dipòsits de ferro acumulat en la perifèria.

4- Hi ha un augment en l'expressió dels receptors de lactoferrina a neurones, microvasos i algunes cèl·lules de la glia, amb valors normals o disminuïts de ferritina neuronal (proteïna intracel·lular lligadora del ferro iònic), que indica un estat lliure i reactiu del ferro intraneuronal que com hem comentat abans, potencia les cascades oxidatives (Faucheux et al., 1995).

5- Les activitats peroxidasa i catalasa es troben reduïdes a mesencèfal i estriats mentre que l'activitat SOD-2 induïble es mostra elevada possiblement en resposta a la situació d'estrès oxidatiu crònic (Ambani et al., 1975).

B) Una altra hipòtesi neuropatogènica de la PD, en part relacionada amb l'anterior, emfatitza la **disfunció mitocondrial i el dèficit d'ATP** en les neurones dopaminèrgiques de la SN, com a origen o com a conseqüència de l'augment dels radicals lliures, ROS i especialment dels RNS, que poden interaccionar específica i irreversiblement amb els complexes de la cadena respiratòria, el blanc més sensible de la qual és el complex IV o citocrom c oxidasa, inhibint la seva activitat. El dèficit de ATP provoca l'alteració de l'homeòstasi del sodi i calci intracel·lular i engega els mecanismes de mort. Algunes evidències en relació a la hipòtesi mitocondrial són (vegeu la figura 23):

1- Els mitocondris de les nDAm de casi la meitat dels cervells parkinsonians postmortem estudiats mostren una activitat NADH-DH i alfacetoglutarat-DH dismi nuïda en un 30% - 40% respecte dels controls, sense afectació d'altres zones cerebrals, disminució que també està present en el teixit muscular esquelètic i les plaquetes dels afectats (sense defectes genètics observables en el mDNA) (Schapira et al., 1990; Mann et al., 1992). 2- Les neurotoxines que actuen inhibint el complex I mitocondrial augmenten l'estrès oxidatiu i provoquen neurodegeneració dopaminèrgica tant en humans com en models animals per administració de MPP⁺ (Nicklas et al., 1985), 6-OHDA (Glinka et al.,1996) o rotenona.

3- L'alteració del complex I mitocondrial pot disminuir el gradient de protons i el potencial de la membrana mitocondrial interna, augmentant-hi la permeabilitat i l'alliberament de factors pro apoptòtics com el citocrom c.

C) Hi ha una possible implicació del sistema immunitari i de la inflamació crònica local en la mort neuronal característica de les malalties neurodegeneratives (McGeer et al., 1995). En la SN dels teixits postmortem de malalts de PD, estudis immunohisquímics van evidenciar, ja fa anys, una important activació de la micròglia (McGeer et al., 1988), i un augment de citocines proinflamatòries en l'estriat i el CSF dels malalts (Mogi et al., 1994; Fiszer et al., 1994).

La inflamació en el cervell està mediada per l'activitat dels astròcits i la micròglia, els primers, en ser activats per distints insults cerebrals i immunològics, augmenten l'expressió de GFAP, principalment. La micròglia en ser activada, adopta una morfologia ameboide i fa una ràpida regulació ascendent de molècules de superfície (receptors de proteïnes del complement, molècules del CMH) i distintes molècules solubles, entre elles, alguns factors tròfics, però sobre tot, diferents mediadors proinflamatoris, com NO, TNF α , IL-1 β , IL-6, potencialment neurotòxics en una zona constitutivament rica en micròglia com és la SN (Liu et al., 2003).

Quant al possible origen de la inflamació observada en la neurodegeneració de la PD i a partir d'estudis epidemiològics s'han proposat les infeccions virals en les primeres etapes de la vida, les infeccions bacterianes sobre tot relacionades amb el tracte gastrointestinal, els traumatismes cranioencefàlics (en veterans de la segona guerra mundial, en boxejadors), els pesticides, fungicides (maneb) i altres tòxics ambientals citats anteriorment. Sigui quina sigui la causa detonant de la inflamació, la presència extracel·lular d'algunes molècules de neuromelanina alliberada per les neurones dopaminèrgiques que degeneren (neuromelanina carregada de ferro, tòxics i quinones) podria mantenir l'activació microglial, entrant en un cercle crònic de neuroinflamació i neurodegeneració (Wilms et al., 2003) en el que la α -sinucleïna extraneuronal també podria participar (mentre la neuromelanina roman a l'interior de les neurones pigmentades exerciria un paper neuroprotector actuant com a quelant dels ions metàl·lics reactius, pesticides i altres toxines, Zecca et al., 2003).

Tot i que encara no hi ha estudis clínics prospectius en humans sobre l'acció neuroprotectora dels antiinflamatoris, algunes dades epidemiològiques retrospectives indiquen una menor incidència de PD en persones tractades crònicament amb antiinflamatoris no esteroïdals (AINES) (Chen et al., 2003), principalment l'ibuprofé, però no l'aspirina o l' acetaminofé (Gao et al., 2011).

Alguns AINES han mostrat efectes neuroprotectors en models animals de parkinsonisme per LPS, MPTP o 6-OHDA (Gao et al, 2003); en el ratolí parkinsonià per MPTP, l'inhibidor de la micròglia activada, minociclina, també ha disminuït la neurodegeneració dopaminèrgica. En tots aquests models, s'ha demostrat l'efecte lesiu sinèrgic de la inflamació perifèrica i de la neurotoxina administrada en cada cas, sobre les neurones dopaminèrgiques, efecte sumatori que s'atribueix a l'augment de IL-1 β i TNF α directe en el teixit cerebral o indirecte, pel seu transport des de la sang, a més s'ha vist que monòcits reclutats des de la sang perifèrica poden estar potenciant la inflamació central (Machado et al., 2011).

D) L'exitotoxicitat com a hipòtesi patogènica de la PD implica l'estrès traumàtic i crònic que fa augmentar els nivells de glucocorticoides circulants, aquests, a nivell central frenen la recaptació de DA i glutamat i augmenten els efectes dels aminoàcids excitadors. La sinergia d'aquests tres fenòmens provocaria el quadre excitotòxic fatal per les neurones dopaminèrgiques amb hiperestimulació dels receptors NMDA de glutamat, l'augment de l'entrada de ions calci i sodi al citosol que portarien a l'estrès osmòtic, inflor de la cèl·lula i dels orgànuls subcel·lulars, activació de proteases i fosfolipases i mort cel·lular. Els glucocorticoides, a més a més, augmenten els nivells cel·lulars de proteïnes proapoptòtiques i disminueixen la concentració de neurotrofines i molècules antiapoptòtiques (Smith et al., 2002)

L'excés de DA lliure al citosol potencia la producció de ROS i una menor protecció front als aminoàcids excitadors. Això ens fa representar la PD com una manifestació més d'una malaltia sistèmica amb afectació endocrina i immunològica.

E) La hipòtesi de l'estrès proteolític / proteasomal ha assolit rellevància degut a la caracterització dels LB i LN a base de α -sinucleïna i ubiqüitina, presents tant en la malaltia idiopàtica com en algunes formes familiars de la PD (vegeu la figura. 23).

En les cèl·lules eucariotes, les proteïnes mutants, danyades o inservibles són eliminades pel sistema ubiquitina-proteasoma (UPS), els aminoàcids i pèptids resultants són reutilitzats per a la síntesi de noves proteïnes, mentre que els monòmers de ubiquitina tornen a marcar noves proteïnes eliminables. Quan el volum de proteïnes inservibles sobrepassa la capacitat del UPS o bé quan alguns dels seus components s'altera s'esdevé estrès proteolític.



Figura 23. Esquema de les principals hipòtesis etiopatogèniques de la neurodegeneració en la malaltia de Parkinson, on poden interactuar anomalies genètiques, tòxics ambientals o el propi neurotransmissor per generar una disfunció del mitocondri i del sistema ubiqüitina-proteasoma que desemboquen en un quadre d'estrès oxidatiu, una acumulació de proteïnes anòmales i la mort cel·lular programada (Abou-Sleiman et al., 2006).

L'edat s'associa a un augment gradual dels nivells cel·lulars de proteïnes alterades i a una disminució de l'activitat proteasomal, a més a més, la SNc es relativament pobre en activitat proteasomal, a pesar que el metabolisme dopaminèrgic és una font de ROS i de possiblement una tassa elevada de proteïnes oxidades, d'aquí que els LB es considerin per alguns com a una estratègia protectora per "emmagatzemar" l'excés de proteïnes alterades en aquestes cèl·lules (Kholodilov et al., 1999).

Estudis postmorten de cervells de malalts de PD esporàdica mostren una activitat proteasomal reduïda a la SN, activitat que està totalment anul·lada en els casos familiars per mutació dels gens PARK i UCHL1 (Kahle et al., 2002).

A més a més, l'administració d'inhibidors del proteasoma en la rata produeix una pèrdua de neurones dopaminèrgiques a la SNc i d'aferències dopaminèrgiques a l'estriat així com alguns símptomes de PD (McNaught et al. 2004).

F) Hipòtesi del dany neuronal primari extranigra. L'anatomista Braak i els seus collaboradors han suggerit aquesta hipótesi, recolzant-se en el llarg període sense simptomatologia motora de la PD, però durant el qual es desenvolupen alteracions olfactives, del to vagal i de la son; aquest grup té en compta, a més, la localització primerenca dels LB al bulb olfactori i al plexes nerviosos entèrics. Hipotetitzen que un patogen neuròtrop, probablement viral, podria penetrar al lòbul temporal del cervell per via anterògrada, des de la mucosa nasal i des de l'estomac (a través de fibres del plexe de Meissner). Des del lòbul temporal i per via transsinàptica el patogen assoliria les neurones motores parasimpàtiques preganglionars del nervi vago i seguiria per via retrògrada, fins a la medul·la, protuberància, mesencèfal i la SNc, moment en que s'iniciaria la simptomatologia motora (Hawkes et al., 2007). També s'ha demostrat en cultius neuronals primaris que els oligòmers de α -sinucleïna poden ser endocitats, formar agregats intraneuronals i ser transportats de neurona a neurona

G) Individualment, cap dels mecanismes etiopatogènics mencionats fins ara pot explicar tots els casos esporàdics o familiars de la PD, en canvi, cadascun per separat pot induir **apoptosi** en cultius de neurones dopaminèrgiques. L'apoptosi és una de les distintes formes morfològiques que adopta la mort cel·lular programada i es caracteritza per la contracció i formació de fragments cel·lulars limitats per membrana, per la condensació del nucli i per la fragmentació del DNA.

produint-hi inclusions i mort neuronal (Pan-Montojo et al., 2010).

En un principi, es va intentar evidenciar les neurones en procés apoptòtic en els teixits cerebrals postmortem de malats de PD, però els resultats van ser, en molts casos, contradictoris degut a les tècniques emprades, bàsicament la tècnica de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end labelling) que ara se sap, pot donar falsos positius en teixits que han patit hipòxia (eventualitat no infreqüent en malalts grans terminals), a més els malalts terminals de PD tenen poques neurones dopaminèrgiques i és poc probable trobar-ne moltes amb morfologia apoptòtica, procés molt ràpid en relació a la lentitud de la neurodegeneració.

Mes tard i també en teixits postmortem, s'ha intentar evidenciar els components moleculars de la maquinaria apoptòtica, però el que més està ajudant a establir el rol de la mort programada en la patogènia de les malalties neurodegeneratives és manipular les molècules implicades en models transgènics i "nockouts" o inhibir-les amb agents farmacològics o vectors virals en models experimentals (Vila i Przedborski, 2003).

En aquest sentit, s'ha trobat immunomarcatge augmentat per a la proteïna proapoptótica Bax en la SNc dels cervells postmortem de parkinsonians respecte dels controls, que pot evidenciar un procés apoptòtic actiu en la regió, confirmat per altres estudis que mostren una major activitat de l'efectora caspasa 3 i de les caspases iniciadores 8 i 9 (Tatton, 2000).

En ratolins parkinsonians per administració crònica de dosis baixes de la neurotoxina MPTP s'ha trobat morfologia apoptòtica en les neurones dopaminèrgiques de la SN, a més de l'augment d'expressió de Bax i baixa expressió de l'antiapoptótica Bcl2 (vegeu la figura 24).



Figura 24. Esquema del possible mecanisme subjacent a la mort per apoptosi de les neurones dopaminèrgiques de la SNc en el ratolí parkinsonià per MPTP: l'estrès oxidatiu desencadenat per la neurotoxina i el conseqüent dany al DNA activarien p53, induint una regulació ascendent de Bax que en ser translocada al mitocondri per mediació de JNK, provocaria la sortida al citosol del citocrom c, aquest, l'activació de les caspases i finalment la mort cel·lular (Vila i Przedborski, 2003).

Models animals de la PD

Donat que la majoria de malalts de PD no presenten mutacions genètiques identificables, la informació sobre els mecanismes patofisiològics subjacents a la malaltia ha de provenir de models animals, de fet, pràcticament tot el que coneixem sobre la patogènia i el tractament de la PD deriva de innombrables estudis dels 40 darrers anys en models animals. Un dels primers models animals consistien en realitzar lesions mecàniques en el feix prosencefàlic medial o mfb format pels axons de les neurones dopaminèrgiques de la SNc en el seu camí rostral cap el nucli estriat (Faull and Mehler, 1978). Tanmateix, la majoria dels models animals es basen en lesions químiques per administració de toxines per via sistèmica (reserpina, MPTP, rotenona) o intracranial (6-OHDA, MPP⁺) a rosegadors i primats no humans de cara a reproduir si no tots, els trets més rellevants de la malaltia.

El model ideal de PD hauria de tenir les següents característiques: 1) un conjunt normal de neurones dopaminèrgiques al nàixer que al començament de l'edat adulta anés disminuint progressivament, 2) un dèficit motor fàcil de detectar i que inclogués la bradicinèsia/ hipocinèsia/ acinèsia, la rigidesa i la tremolor en repòs, 3) hauria de mostrar el desenvolupament de cossos de Lewy, 4) en cas de ser un model genètic, hauria de presentar una sola mutació i 5) hauria de tenir un curs relativament curt, d'uns pocs mesos, per permetre el cribatge ràpid d'agents terapèutics (Beal, 2001).

En els models animals desenvolupats fins ara, el que resulta més difícil de reproduir és l'espectre complet de la malaltia amb les alteracions extranigrals i la seva progressió (Blandini, 2008). A continuació es revisen els punts forts i febles dels principals models animals de PD:

Models amb 6-OHDA

La 6-OHDA és un anàleg de la DA (vegeu la figura 1 de metodologia) fàcilment oxidable en contacte amb l'aire. Administrada per via endovenosa no travessa la BHE, però, s'acumula al citoplasma i a l'axó de les neurones adrenèrgiques perifèriques on causa, segons la dosi, des de la depleció de les vesícules sinàptiques fins a la destrucció d'aquestes neurones (50mM).

Fa uns 40 anys que es va establir com el primer model animal neurotòxic de la PD, donada la seva capacitat per a produir la degeneració anterògrada quasi completa de la via dopaminèrgica nigroestriatal a les 48-72h de ser administrada directament a la SNc o al mfb.

A través del DAT, la 6-OHDA entra en la terminació dopaminèrgica on s'autooxida i dispara la producció de ROS, principalment H²O², OH[•] i quinones (Cohen and Heikkila, 1974). Al mateix temps, s'acumula al mitocondri on inhibeix la cadena respiratòria a nivell de la NADH deshidrogenasa (complex I) i citocrom c oxidasa (complex IV) (Glinka et al., 1996).En aquest model, es sol realitzar una lesió intracranial unilateral per evitar la situació d'afàgia (incapacitat per deglutir) i adípsia (incapacitat per beure) greus que pot comprometre la supervivència de molts animals si s'administra de forma bilateral, a més la lesió unilateral permet utilitzar l'altre hemisferi com a control. Normalment s'ha d'administrar sistèmicament un inhibidor específic de la recaptació de NA (desipramina 25 mg/Kg i.p.) per a protegir les vies noradrenèrgiques (Jonsson, 1976),

Cap als anys 90, es va provar d'administrar la toxina a l'estriat (20 µg/3µl), aconseguint una lesió degenerativa, progressiva, retrògrada i més limitada que l'anterior, des de les terminacions dopaminèrgiques estriatals fins als somes corresponents de la SNc, resultant una pèrdua neuronal del 50-70%, màxima a les 4 setmanes (Sauer and Oertel, 1994).

Després de lesionar unilateralment amb 6-OHDA, una proporció dels animals presenta una torsió postural espontània ipsilateral al cantó lesionat, que s'interpreta com un signe motor present a la malaltia humana i que evidència la distinta concentració de DA entre els dos hemisferis. Passades 2-3 setmanes de la lesió unilateral, es pot avaluar el grau de lesió de cada animal mitjançant el test rotacional induït farmacològicament (Ungerstedt, 1971).

Model amb MPTP o MPP+

L'MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) es forma com a producte col·lateral de la síntesi de MPPP (1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina), potent analgèsic molt relacionat amb dos altres analgèsics comuns, meperidina (Demerol) i alfaprodina (Nisentil) (Heikkila et al. 1984).

Els efectes neurotòxics de MPTP es coneixen per primer cop, cap a l'any 1977 en un jove estudiant de 23 anys que presentà de forma tan sobtada i intensa la triada motora característica de la PD, que és diagnosticat com a esquizofrènia catatònica, erròniament com es va veure més tard, doncs la bona resposta a levodopa obligà a rectificar el primer diagnòstic pel de parkinsonisme; l'autòpsia del jove, mort per sobredosi, revelà una profunda degeneració de la SN; aquest va ser el primer afectat d'un grup d'uns 400 adults joves nord-americans toxicòmans que s'injectaren una "nova heroïna" sintetitzada clandestinament a partir de MPPP i que en alguns casos era d'una puresa del 100% en MPTP. Alguns dels consumidors de la droga, presentaven pocs dies després una síndrome parkinsoniana indistingible de la PD, amb bradicinèsia, rigidesa, tremolors i alteració de la postura en flexió, simptomatologia que revertia amb levodopa o agonistes dopaminèrgics (Langston et al.,1983). L'estudi funcional per PET amb 18F-6-fluoro-L-dopa va mostrar una pèrdua de terminals dopaminèrgics estriatals proporcional a la intensitat dels símptomes (Calne et al., 1985).

La toxicitat de l' MPTP donà renovat impuls a la hipòtesi toxicològica dels parkinsonismes i de la malaltia de Parkinson i desencadenà un seguit d'estudis farmacocinètics de molècules emparentades. Donat que la clínica i les alteracions neuropatològiques induïdes per l' MPTP en humans, s'ajusten a les característiques de la PD més que qualsevol altre quadre humà o animal provocat per toxines, fàrmacs, metalls o virus, s'han desenvolupat distints models animals de parkinsonisme utilitzant l' MPTP (Snyder i D'Amato, 1986).

Els primats no humans que durant dies reben MPTP per via sistèmica presenten un parkinsonisme molt semblant a l' humà, quan la depleció dopaminèrgica estriatal supera el 90%, és el model que millor reprodueix el comportament motor de la PD, amb rigidesa, bradicinèsia, postura en flexió, pèrdua de reflexes, disminució de la vocalització i del parpelleig. Hi ha pèrdua de marcatge TH positiu a fibres i somes dopaminèrgics de SNc (Jenner, 2003; Langston et al., 1984). L'administració subcrònica (dosi diària durant 5 dies) provoca una certa acumulació de α -sinucleïna en les neurones nigrals dels micos vells, però no dels joves. Aquesta reproductibilitat dels símptomes, validen el model, entre altres coses, per avaluar els efectes indesitjables tardans del tractament amb levodopa.

També s'ha provat MPTP en altres especies animals com conill, conill d'Índies, rata, peix zebra, gos i ratolí; els tres primers són relativament insensibles a l' MPTP, mentre que la susceptibilitat dels últims varia en funció del sexe, l'edat i la soca, el que obliga a ser molt estrictes amb els protocols que es segueixen en cada cas (Lane and Dunnet, 2008).

L' MPTP és una substància molt lipòfila que pot travessar fàcilment la BHE, és metabolitzada per l'enzim MAO-B glial a MPP⁺ (ió 1-metil-4-fenilpiridinium), el seu metabòlit tòxic actiu (Markey et al. 1984). MPP⁺ ingressa selectivament en el terminal dopaminèrgic a través del DAT (Javitch et al., 1985) i és emmagatzemat en vesícules via VMAT2, fet que sembla protegir la neurona de la seva toxicitat. La relació entre DAT i VMAT2 determina la toxicitat de l' MPTP i el seu metabòlit, de manera que els inhibidors de DAT, com nomifensina, o els ratolins transgènics pel DAT són resistents a l' MPTP, en canvi quant més alta és l'expressió de DAT, més vulnerable és l'animal. També els inhibidors de VMAT2 o els ratolins heterozigots per a aquest transportador són més sensibles a l' MPTP.

L' MPP⁺ citosòlic entra als mitocondris a favor del potencial transmembrana depenent d' ATP i un cop dins pot inhibir el complex I de la cadena respiratòria mitocondrial, fet que a més de produir un dèficit energètic, incrementa la producció interna de ROS (Nicklas et al.,1985). Altres mecanismes patogènics que s'han involucrat en la toxicitat de l' MPTP / MPP⁺, a partir d'estudis en sistemes cel·lulars i models animals molt variats són: l' excitotoxicitat, l' apoptosi, l' hiperproducció de peroxonitrits i la inflamació, concloent que la sensibilitat cel·lular a la neurotoxina augmenta en relació directa a la capacitat de recaptar selectivament MPP⁺, quant més depenent és la cèl·lula del metabolisme aeròbic i quant més alt és el seu contingut en neuromelanina (D'Amato et al.,1986), tres condicions que es donen en les neurones dopaminèrgiques (Di Monte et al., 2002).

Altres models animals de PD

A mida que es coneixen més detalls de la patogènia de la PD s'intenten desenvolupar models animals que la reprodueixin, com l'acumulació de proteïnes anòmales per alteració de l'UPS, el dèficit local i sistèmic del complex I mitocondrial o la implicació de neurotoxines per vies més "fisiològiques" que la injecció intracranial (Betarbet, 2000).

Hi ha nous protocols d'administració sistèmica de epoxomicina natural o el sintètic PSI (inhibidor sintètic del proteasoma) en rosegadors i primats no humans que aconsegueixen una reducció de l'activitat del sistema UPS similar a la observada en el teixit cerebral postmortem de malalts de PD (McNaught i Jenner, 2001) i que possiblement és el mecanisme subjacent a la formació dels LB en alguns casos de PD. Tot i ser celebrat per les semblances motores i anatomopatològiques amb la PD, aquest model ha estat difícil de reproduir per grups distints al dels autors (McNaught et al., 2004), el que ha originat un fort debat sobre el mateix (Lane i Dunnett, 2008).

L' observació de l'activitat reduïda del complex I mitocondrial en el teixit postmortem neuronal i extraneuronal de parkinsonians, per una banda, i l'augment de la incidència de la malaltia en persones relacionades amb els pesticides rotenona i paraquat, ambdós inhibidors del complex I, per l'altra, ha promogut distints models en rosegadors amb aquestes substàncies (Betarbet et al., 2000; Thiruchelvam, 2003). L'administració sistèmica crònica d'aquests pesticides reprodueix l'acumulació intraneuronal de proteïnes anòmales, la simptomatologia motora i la lesió menys selectiva sobre les neurones dopaminèrgiques, però exigeix un gran nombre d'animals en cada estudi degut a la gran variabilitat en el tipus i extensió de la lesió.

El model en Drosophila melanogaster

Tot i que en aquesta revisió no hem entrat en els nous models animals genètics de parkinsonisme, que s'han desenvolupat principalment en ratolins transgènics per als distints gens responsables de les formes familiars de PD (Fleming et al., 2005), volem citar el, sens dubta, més curiós i possiblement molt prometedor model obtingut i publicat per Feany i Bender, l'any 2000, en la mosca Drosophila per sobrexpressió de l' α -sinucleïna humana normal i mutada. Les mosques "parkinsonianes" transgèniques mostren una pèrdua selectiva de neurones dorsomedials, TH positives, que augmenta amb l'edat. A més, presenten més dificultats locomotrius que les mosques control i desenvolupen inclusions neuronals riques en microfibrilles similars als LB observats en els teixits humans afectats, inclusions que es marquen amb anticossos anti- α -sinucleïna (vegeu la figura 25).



Figura 25. Microfotografies òptiques de mosques Drosophila de 30 dies d'edat, control (c) i transgènica per sobrexpressió de α -sinucleïna humana normal i mutada (d) que mostra, en aquesta, la desaparició de la tinció immunohistoquímica anti-TH de les neurones dorsomedials assenyalades amb una fletxa en la primera. En (g) les fletxes indiquen inclusions neuronals amb marcatge immunohistoquímic anti- α -sinucleïna en cèl·lules del gangli subesofagic de la mosca transgènica de 30 dies, molt similars al que es marquen amb la mateixa tinció en el còrtex cingulat de malalts de demència per cossos de lewy (h) (Feany i Bender, 2000).
Objectius

Donada la situació dels coneixements a mesura que s'anava realitzant aquest treball, ens varem anar plantejant els següents objectius:

1.

Establir els límits espai-temporals de les lesions intracerebrals provocades amb 6-OHDA i amb MPP⁺ en el model parkinsonià de rata.

2.

Establir els límits de mesura de l'efecte cerebrals extracel·lular d'ambdues toxines per microdiàlisi estriatal in vivo.

3.

Observar el grau d'implantació i la reacció del teixit adjacent després de la implantació de cèl·lules en l'estriat amb la finalitat de pal·liar la lesió i estudiar l'efecte d'alguns factors neurotròfics.

4.

Estudiar els mecanismes de mort neuronal in vivo i in vitro.

5.

Buscar possibles nexes entre la lesió cerebrals en la PD i alteracions en el sistema immunològic.

6.

Abordar els mecanismes moleculars d'acció de l'MPP⁺ més enllà dels descrits fins al moment, per establir una relació entre dosi i efecte en la depleció, viabilitat i activitat mitocondrial.

7.

Estudiar l'efecte lesiu de la dopamina per sí mateixa i proposar algun mecanisme relacionat amb els gens recentment implicats en la PD.

Capítol 2: Metodologia

Animals i tractaments

En tots els experiments s'operen rates mascles (en algunes ocasions, també femelles) Sprague-Dawley adultes (2-3 mesos), d' entre 250 - 350 g de pes.

Un cop finalitzada l'experiència, es sacrifiquen els animals per decapitació quan el que interessa és el teixit fresc per a mesures bioquímiques, pels experiments amb seccions tissulars (slices) i per obtenir fraccions subcel·lulars.

Per a l'estudi morfològic microscòpic del teixit control, lesionat i lesionat/implantat es procedeix a la perfusió transcardíaca de la rata (vegeu la figura 8), seguida de sobrefixació del teixit enucleat amb solució fixadora de PFA al 4% en SSF.

Les suspensions de cèl·lules fetals mesencefàliques (FMC) per a l'estudi dels trasplantaments en teixit lesionat, s'obtenen a partir de la zona del cervell corresponent a mesencèfal d'embrions de 14 dies (E-14) de femelles de rata Sprague-Dawley (vegeu la figura 5). Tots els animals procedeixen de l'estabulari del Campus de Bellvitge, on s'apliquen les condicions d'estabulació homologades pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la U.B.

Neurotoxines

MPP+ (1-methyl-4-phenylpyridinium)

A partir de la sal iodada de MPP⁺ (PM 297.14 g/mol) (Research Biochemical Inc., Natick. MA. USA) (vegeu la figura 1) es prepara i congela la solució mare 0,1M (30 mg/ml en sèrum salí fisiològic), per descongelació i dilució de la qual, obtenim la dosi acordada en cada experiment. També es prepara solució salina fisiològica amb 25 mM de NaI, equimolar amb la solució de MPP⁺.



Figura 1. Estructura química de MPTP, MPP⁺, 6-OHDA i DA.

6-OHDA (6- hidroxidopamina)

La 6-OHDA (Sigma Chemical Co.-St Louis. MO. USA) (PM 168.18 g/mol)en dissolució salina i a temperatura ambient s'oxida ràpidament, procés espontani que es pot atenuar si s'afegeix a la solució un 0.02 % d'àcid ascòrbic. La dissolució 5 mM de 6-OHDA es conserva congelada (-20°C) i en alíquotes de pocs microlitres fins el moment just abans de l'administració intracerebral.

Anestèsia

Abans d'aplicar les tècniques quirúrgiques dels estudis in vivo, anestesiem les rates amb una solució mescla de clorhidrat de ketamina (Imalgeme 1000 de Parke-Davis ®) (100 mg/kg/ml i.p.) i xilazina (Rompúm de Bayer ®) (2 mg/kg/ml i.p.).

També s'utilitza una dosi de 400 mg/kg i.p. (1.6 ml/Kg) de hidrat de cloral (Panreac ®), a partir d'una solució aquosa 25 % en SSF (2.5 g/10 ml de SSF). L'efecte anestèsic de l' hidrat de cloral és més immediat i perllongat que el de la ketamina-xilazina, però administrat per la via intraperitoneal habitual tendeix a provocar un trastorn abdominal similar a un ili paralític, d'aquí que es reservi per l'anestèsia prèvia al sacrifici.

Tests comportamentals

Test rotacional induït farmacològicament

Quan passades 2-3 setmanes de l'administració unilateral intracranial de 6-OHDA, s' administra a la rata un agonista dopaminèrgic com l'apomorfina (0.05 mg/Kg s.c.), si la lesió de la via dopaminèrgica ha estat efectiva, s'observa una conducta rotacional (la rata gira contínuament sobre sí mateixa) en direcció contralateral a l'hemisferi lesionat. En canvi, si s'administra amfetamina (1mg/Kg i.p.) fàrmac que allibera a l'espai sinàptic la DA continguda en les vesícules sinàptiques de les terminacions dopaminèrgiques, l'animal gira en direcció ipsilateral a l'hemisferi lesionat. Aquest és un mètode ràpid i senzill per valorar la pèrdua dopaminèrgica i es correlaciona positivament amb l'augment dels receptors D2 de DA a la zona dorsolateral del nucli estriat (Cadet et al, 1992; Lane and Dunnett, 2008).

Un cop s'inicia el comportament rotacional de l'animal, per observació directa i durant 10 minuts, es compta el nombre de girs. Més de 40 rotacions en 10 min es considera un test positiu que reflecteix una important lesió de la via dopaminèrgica nigroestriatal.

Estudi de l'activitat motora

L'activitat motora de les rates control i lesionades bilateralment es mesura durant una hora en un sistema de laberint circular amb cèl·lules fotoelèctriques amb l'ajut del Dr. Jordi Llorens (Llorens et al., 1990).

Tècniques Quirúrgiques

Lesió estereotàctica

Coneixent les coordenades anatòmiques de referència per al cervell de rata (Paxinos i Watson, 1982), l'abordatge estereotàctic ens permet localitzar amb precisió i accedir fàcilment a la via dopaminèrgica nigroestriatal per dipositar-hi solucions, suspensions cel·lulars o collocar cànules de microdiàlisi. S'utilitza un aparell mecànic d' estereotàxia (David Kopf Instruments, model 900. Palo Alto. CA. USA) acoblat a un sistema de tres eixos mil·limetrats mòbils: anteroposterior (A), mediolateral (L) i dorsoventral o vertical (H) i proveït d'un suport per a xeringa Hamilton (de10 µL, model 801 RNE) (vegeu la figura 4).



Figura 2. Esquema d'un tall sagital de cervell de rata amb els tres punts (fletxes) d'abordatge habitual de la via dopaminèrgica nigroestriatal (Ambrosio i Espino, 1997).

Els tres punts habituals per abordar la via nigroestriatal són: a) la porció lateral de la part compacta de la substància negra (SNc), b) el punt mig del trajecte dels axons de projecció de la SN, MFB i c) el centre del nucli estriat (vegeu la figura 2), les coordenades estereotàctiques dels quals figuren a la Taula 1. Taula 1. Coordenades estereotàctiques de la SNc, el MFB i el nucli estriat de cervell de rata, expressades en mm. S'apliquen a partir del punt bregma de la superfície craniana (Paxinos and Watson.1982)

| Coordenades (mm) estereotàctiques | Estriat | SNc | MFB | |
|--------------------------------------|---------|-------|-------|--|
| anteroposterior (A) | + 0.7 | - 4.8 | - 4.3 | |
| mediolateral (L) | ± 2.8 | ± 1.6 | ± 1.4 | |
| dorsoventral (H) | - 5.0 | - 8.0 | - 8.6 | |

El procediment de la lesió estereotàctica és com segueix: s'immobilitza la rata anestesiada, subjectant-la pels incisius (que queden enganxats a la barra d'incisius situada a 3,3 mm per sota de la línia interauricular) i pels conductes auditius externs amb les dues barres laterals de l'aparell. Amb el bisturí, es practica una incisió longitudinal central en la pell del cap i en el periosti per visualitzar els punts de referència, bregma i lambda, de la superfície craniana. A partir de bregma (vegeu la figura 3), apliquem les coordenades A i L del nucli que volem abordar, en el punt resultant de la superfície òssia es fa un petit orifici amb la broca dental, a través del qual es veu la membrana meníngia externa, recolzant l'agulla d'injecció o la cànula sobre aquesta, prenem la última referència a fi d'aplicar la coordenada H. Després de raspar la duramàter, s'introdueix l'agulla a la profunditat H, s'injecta lentament la solució (1µl/min) i s'espera uns minuts (tants com es triga en fer la injecció) abans de retirar-la per a facilitar la difusió del líquid i evitar el reflux.



Figura 3. Esquema del crani de la rata, cara superior (esquerra) i lateral (dreta). Els punts de referència per a les mesures estereotàctiques són bregma (anterior) i lambda (posterior). (Paxinos and Watson.1982).



Figura 4. Aparell mecànic d'estereotàxia de David Kopf Instruments, model 900 (esquerra), amb la rata anestesiada subjectada pels conductes auriculars i els incisius, just abans de començar el procediment este-reotàctic (dreta).

Obtenció del teixit mesencefàlic embrionari i preparació de la suspensió de cèl·lules fetals mesencefàliques (CFM)

A partir dels embrions de rata E14 (obtinguts per cesària d'una rata prenyada de 14 dies) col·locats en posició lateral i sota lupa, es fa una incisió amb el bisturí per sobre de l'ull i es separa la regió mesencèfalica ventral del tronc de l'encèfal (vegeu la figura 5).



Figura 5. Procediment per a l'obtenció del teixit mesencefàlic embrionari: col·locació lateral del fetus (1), incisió entre la medul·la i el tron encefàlic (2), Incisió supraorbitària fins el plec mesencefàlic (3), extracció de l'encèfal fetal (4-5), talls per a aïllar el mesencèfal fetal (6-10) (Dunnett and Björklund, 1997).

El teixit corresponent a la regió mesencefàlica fetal es disgrega per a fer una suspensió cellular segons el procediment descrit per Dunnett and Björklund (1997), breument:

- a) Es digereix el teixit durant 20 minuts a 37°C en medi DMEM amb suplement de glutamina 2 mM, 0.05% de DNasa i 0.1% de tripsina.
- b) Es renta el medi d'incubació i es disgrega el teixit mecànicament amb suavitat.
- c) Es centrifuguen i resuspenen les cèl·lules en medi DMEM a una concentració final d' entre 100.000 - 200.000 cèl·lules/µl.
- d) Es determina la viabilitat cel·lular depositant uns 3 µl de la suspensió diluïda sobre un portaobjectes i afegint uns 9 µl de taronja d'acridina / bromur d' etidi (1:1). El bromur d'etidi s'uneix als àcids nucleics de les cèl·lules amb la membrana cel·lular danyada i mostra una coloració taronja o vermella quan s'observa al microscopi de fluorescència. Les cèl·lules intactes s'observen de color verd. La solució mare de taronja d'acridina/ bromur d'etidi conté 5 mg de cadascun (Sigma ®) en 500 µl de medi RPMI. La solució de treball conté 100 µl de solució mare en 10 ml de RPMI.
- e) Estereotàcticament, s'injecten 1-2 µl de suspensió cel·lular viable al nucli estriat.

El medi DMEM conté: NaCl, 6.4 g; NaHCO₃, 3.7 g; D-glucosa, 1.0 g; L-glutamina, 0.58 g per litre d'aigua.

El medi RPMI conté: NaCl, 6.0 g; NaHCO₃, 2.0 g; Na₂HPO₄.7H₂O, 1.51g; 20 mM D-glucosa per litre d'aigua.

Microdiàlisi intracerebral in vivo

Tècnicament, la col·locació d'una cànula de microdiàlisi no difereix de la lesió estereotàctica, però aquí el que s'introdueix en cada nucli estriat és la zona dialítica de una cànula, fins assolir una profunditat de 7 mm des de la duramàter (vegeu la figura 6). La porció externa de la cànula queda fitxada amb ciment dental a dos petits perns cargolats a la superfície craniana.

La inflamació postquirúrgica de la zona intervinguda justifica un temps d'espera de 24h abans de recollir les primeres mostres, temps que permet assolir una relativa estabilitat bioquímica microambiental. Al dia següent de l' implantació de la cànula, amb la rata desperta i activa, s'inicia la sessió de microdiàlisi d'unes 5 hores de durada, durant les quals es bombeja contínuament un perfusat a base de líquid cerebroespinal artificial lliure de neurotransmissors (CSF: dissolució aquosa a base de NaCl, 119.5 mM; KCl, 4.75 mM; CaCl₂, 1.27 mM; KH₂PO₄, 1.19m M; MgSO₄, 1.19m M; Na₂PO₄, 1.60 mM a pH 7.2, segons Benveniste and Hüttemeier, 1990) amb una bomba de microinfusió (Harvard Apparatus model 22, south Natick, MA) que impulsa el CSF a un flux constant de 1.25 µl/min, a

través d'un tub de polietilè flexible connectat a l'extrem d'entrada de la cànula de microdiàlisi. Simultàniament es va recuperant el dialitzat per l'extrem de sortida de la cànula que drena a un tub Eppendorf mantingut en gel, a través d'un tub fi de polietilè. Es recull una nostra cada 20 minuts i s'emmagatzema a –20°C fins a l'anàlisi cromatogràfica (vegeu la figura 7). Després de 48h de l'implantació, la gliosi reactiva al voltant de la cànula redueix molt la seva capacitat dialítica.

La permeabilitat de la membrana dialítica de cuprofan utilitzada per a la fabricació de les cànules, permet la difusió dels compostos de menys de 20 kDa en ambdós sentits (Lange et al.,1997; Chefer et al., 2009). La pròpia dinàmica del procés de difusió entre el teixit i el perfusat fa que la concentració dels analits al voltant de la cànula sigui inferior a la del teixit intacte més allunyat (vegeu la figura 6) i per tant que la fracció recuperada sigui menor que la real, de manera que les successives mostres de dialitzat, un cop analitzades per cromatografia HPLC, són una aproximació relativa a la composició del líquid extracel·lular de la zona estudiada, en el nostre cas l'estriat dorsal, (Westerink et al., 1987; Westerink, 1995). In vitro, les cànules de fabricació pròpia, recuperaven entre un 2 i un 20 % de la DA i els seus metabòlits, una proporció similar a la publicada per a les cànules comercials (Zetterström et al., 1983).



Figura 6. Esquema de la col·locació intraestriatal de la zona dialítica de la cànula implantada, el tub d'acer (en verd) travessa la calota òssia i l'escorça cerebral (esquerra). Esquema que il·lustra la complexa composició de l'espai extracel·lular a través del qual els analits (punts negre) han de difondre per arribar a la cànula de microdiàlisi (c); la presència dels capil·lars sanguinis (V) que redueix el volum de líquid que envolta la cànula i l'augment de la trajectòria de difusió (fletxa) dels analits en moviment cap a la cànula fan que l'efecte net sigui una disminució de la seva difusivitat (dreta) (Chefer et al, 2010).

Materials i procediment de fabricació d'una cànula de microdiàlisi

L'elevat cost de les cànules de microdiàlisi comercials, evidentment d'un sol ús, i la possibilitat de poder aprendre el procés de fabricació al laboratori del Dr. Artigas (CSIC Barcelona) (Adell i Artigas, 1997) ens va motivar a fabricar-les nosaltres mateixos a partir dels següents materials (vegeu la figura 7) i procediment:



Figura 7. Esquema d'una cànula de microdiàlisi cerebral, realitzada segons el procediment descrit per Adell i Artigas, 1997. A) Parts de la cànula descrita en el text. B) Comprovació del funcionament de la cànula abans de la inserció de la membrana de cuprofan. C) sessió de microdiàlisi, els dos llargs tubs de polietilè corresponents a una sola cànula. En general s'han inserit dues cànules en cada animal, una en cada nucli estriat.

a) Tub d'acer inoxidable hipodèrmic prim (1 fig. 7) (de 400 μm de Ø extern i 190 de Ø intern, n° catàleg: 8332) i tub gruixut (2 fig. 7) (de 500 μm de Ø extern i 290 μm de Ø intern, n° catàleg: 8420) de A-M Systems, Everett, USA. Per a una cànula es

tallen dos segments de 7 mm de longitud de tub prim i un segment de 20 mm del tub gruixut.

- b) Tubs de sílica (3 fig. 7) (de 140 μm de Ø extern i 40 μm de Ø intern, ref. VS-14-40, de Scientific Glass Engineering, Melbourne, Australia subministrada per KROM-PEX S.A.). Dos segments per cànula: un de 20 mm i un altre de 35 mm.
- c) Tubs de polietilè (4 fig. 7) (de 610 μm de Ø extern i 280 de Ø intern, de Portex, England, subministrat per Técnicas Médicas S.A.). Dos segments de 20 mm per cànula.
- d) Membrana dialítica cilíndrica de cuprofan (5 fig. 7)(Enka AG, Wupertal, FRG). Un segment de 10 mm per cànula, que recobreix la part distal de la mateixa, per sobre del segment de sílica i sobresurt uns 4 mm des de l'extrem del tub d'acer.

Els diferents materials es munten sobre plastilina Blutac® i s'enganxen amb pega Araldite® (6 fig. 7); passades 24h es recobreix la unió dels tubs d'acer amb ciment dental (7 fig. 7) (TAB 2000, Kerr, Itàlia), i per sobre silicona termofusible que ho engloba tot, deixant visible sols el tub d'acer gruixut distal i els segments curts de polietilè proximals. Abans d'inserir la membrana dialítica, es comprova la funcionalitat de la cànula injectant aigua pels dos extrems de polietilè i observant la sortida del líquid diferencial (B fig 7). Sota lupa, s'enganxa la membrana dialítica cilíndrica a l'extrem del tub d'acer amb resina epoxi Loctite ® i amb la mateixa pega s'obtura l'extrem. Al dia següent s'observa, sota la lupa, la funcionalitat.

Perfusió transcardíaca de solució fixadora i obtenció de teixits per tècniques histològiques

Un cop anestesiades les rates amb solució salina de hidrat de cloral, es realitza una incisió en la línia mitja de la paret abdominal, en direcció ascendent, per accedir a la cavitat toràcica, es secciona transversalment el múscul diafragma i lateralment les costelles, s'aixeca la graella costal i es punxa el ventricle esquerre del cor amb una cànula intravascular connectada a un sistema d' infusió endovenosa per on s'administra, primer, solució salina (SSF) heparinitzada (50 U/ml) fins a l' eliminació total de la sang i a continuació un volum (1L/Kg d'animal) de solució fixadora isotònica de paraformaldehid al 4% en tampó fosfat (PFA); una incisió a l' aurícula dreta permet la sortida de la sang i d'aquestes solucions després d'haver circulat per tota la xarxa vascular fitxant els teixits, després d'uns minuts de perfusió amb PFA es pinça l'arteria aorta abdominal per optimitzar la perfusió toracocranial i estalviar solució de PFA (vegeu la figura 8). En acabar la perfusió, s'enuclea el cervell i es ressuspen en PFA durant un màxim de 24h a 4°C. En acabar la postfixació, es renta el cervell i es munta en parafina o bé es conserva en etanol del 70 % fins la parafinació. Tot el procés es fa sota campana.

La solució fixadora isotònica de PFA al 4% conté: 13.7 ml de Na_2HPO_4 0.5M; 6.86 ml de NaH_2PO_4 0.5M; 8.17 mg de NaCl i 40 g de PFA per litre d'aigua, s'escalfa a 60°C sota campana fins a obtenir la total transparència de la solució, finalment es basifica el pH fins a 7.4 i es manté refrigerada durant una setmana.

Obtenció de teixit fresc per a determinacions bioquímiques

Després de sacrificar la rata desperta amb guillotina, s'agafa el cap, es retira la pell del crani i amb l'ajuda de tisores grosses es talla la calota craniana seguint les fissures parietotemporals, s'enuclea el cervell amb una espàtula petita i es diposita sobre la base, es secciona el cos callós, visible al fons de la cissura interhemisfèrica com una làmina fibrosa de color clar, es separa lateralment l'escorça cerebral de cada hemisferi i es visualitza els voluminosos nuclis estriats dret i esquerre de disposició subcortical i d'aspecte característic, lleugerament ratllat. Es separen de la resta del teixit cerebral amb tisora petita, es congelen ràpidament en neu carbònica o nitrogen líquid i es conserven a -80°C fins al processament de les mostres.



Figura 8. Esquema de la perfusió transcardíaca de la rata. (Atlas de histologia vegetal i animal. Internet. Consultat en octubre 2011, disponible en: http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/2-metodos-fijacion.php

Tècniques histològiques

Parafinació de teixits cerebrals fixats amb PFA

Abans d' incloure en parafina els cervells fitxats de rata, es renten amb aigua i es fa un tall coronal per a obtenir dos blocs, un del cervell anterior que conté el nucli estriat i un del cervell posterior que conté la regió mesencefàlica. Cada bloc es tanca dins una cassette de biòpsia i es deshidrata, fent-ho passar per successives cubetes d'etanol del 70%, 96%, 100% (3 x 40 min en cadascun) i xilol (3 x 20 min). A partir d'aquí, s'inclou el teixit fixat en parafina líquida (56-58°C, però sempre a menys de 60°C) durant 12h. Passat aquest temps es fan els blocs de teixit parafinat en cubetes metàl·liques, blocs que es poden conservar a T^a ambient indefinidament. D'aquests blocs s'obtenen seccions coronals fines de 5 µm, amb un micròtom Leica, que s'enganxen sobre porta gelatinitzat.

En ocasions, el teixit fitxat amb PFA es ressuspen en sacarosa al 30% en tampó fosfat (PBS), durant 12h a 4°C, abans de ser congelat en neu carbònica i emmagatzemat a –40 °C, procediment que conserva millor l'integritat tissular i millorar la definició visual de les tincions aplicades. En aquest cas, es realitzen seccions fines de 10 µm amb un micròtom criòstat (Jung CM 1800, Leica) que s'enganxen sobre portaobjectes gelatinitzats.

Tinció d' Hematoxilina – Eosina

Aquesta tinció és útil per a observar l'arquitectura i integritat general del teixit tractat. Abans de la tinció s'han de desparafinar les seccions de teixit introduint els portaobjectes en successives cubetes de xilol, etanol del 100% i del 96% (3 x 5 min), etanol 70% (1 x 5 min) i aigua destil·lada (1 x 5 min). Un cop hidratades, les seccions es submergeixen en hematoxilina de Harris (Sigma®) durant 20s, es renten en aigua corrent entre 2-5 min, fins l'aparició de la coloració blavosa típica dels nuclis cel·lulars i es contrasten amb eosina durant uns segons, tinció que colora de rosa els citoplasmes. Després de submergir-les breument en xilol, les seccions es munten amb DPX i el cobreobjectes. La solució mare d' eosina groga per treballar amb hematoxilina de Harris conté 1g de eosina groga en 20 ml d'aigua destil·lada i 80 ml d'etanol 96%. La solució de treball conté 25% de solució mare, 74% d'etanol del 80% i 1% d'àcid acètic.

Tinció de Fluoro-Jade

S'utilitza la tinció de Fluoro-Jade B per visualitzar selectivament les neurones que estan degenerant segons la descripció de Schmued et al. (1997).

Breument, es procedeix a la rehidratació i rentat de les seccions tissulars parafinades com en la tècnica anterior, a continuació s'incuben en solució aquosa 0.06% de KMnO₄ durant 15

min amb agitació suau, es renten en aigua durant 1 min i es submergeixen dins la solució aquosa 0.001% de Fluoro-Jade B (a partir d'una solució mare 0.01% de F-J i una 0.1% d'àcid acètic) al resguard de la llum, durant 30 min, agitant suaument. Després de rentar amb aigua (3 x 1 min) es sequen els portaobjectes i es munten. Les seccions així tenyides es van analitzar per microscòpia de fluorescència (λ ex 450-490 nm i λ em per sobre de 515 nm).

Tècniques immunològiques

Marcatge anti-tirosina-hidroxilasa (anti-TH)

Amb l'ajuda del microscopi òptic, aquesta tinció permet observar la morfologia tissular i valorar quantitativament el nombre de neurones dopaminèrgiques autòctones de la SN, a diferents temps després de les lesions estriatals o nigrals, així com les que sobreviuen i maduren a partir de les CFM implantades al nucli estriat.

S'aplica el mètode de l'avidina-biotina-peroxidasa (ABC kit, Vectastain, Vector®). Breument, la tècnica consisteix en sotmetre les seccions desparafinades i rehidratades de teixit a un bloqueig de peroxidases endògenes, seguit d'una permeabilització de la membrana cel·lular amb detergent per afavorir la penetració de l'anticòs primari i l'ús d'un sèrum no immunogènic per evitar la unió inespecífica d'aquell a proteïnes ubiqües (collàgens).

La unió de l'anticòs primari a la proteïna tissular es magnifica amb un segon anticòs secundari biotinilat i amb el complex Avidina-Biotina-Peroxidasa i es revelen els complexes amb peròxid d'hidrogen i substàncies cromògenes (Bourne, 1983).

El protocol seguit és el següent:

- Desparafinar / rehidratar les seccions tissulars dipositades en portaobjectes impregnats en polilisina mitjançant incubacions successives en: xilol, etanol 100%, etanol 95% (3 x 5 min), etanol 70% (2 x 5 min) i aigua destil·lada (1 x 5 min).
- 2) Rentar amb PBS 0.01 M (3 x 5 min).
- 3) Bloquejar peroxidases endògenes: incubant durant 15 min en cambra fosca en una solució que conté 140 ml de 0.01 M PBS; 60 ml metanol i 2 ml H_2O_2 .
- 4) Rentar amb H₂O (1 x 5 min).
- 5) Rentar amb PBS 0.01 M (3 x 5 min).
- 6) Permeabilització de membranes amb solució aquosa 0.05% de saponina, durant 30 min (portes en posició horitzontal en cambra humida).
- 7) Rentar amb PBS 0.01 M (3 x 5 min).

- 8) Incubar amb sèrum normal de cavall al 3% diluït en PBS- Albúmina Bovina 2%, dins cambra humida i durant 2 h, per evitar la unió inespecífica, es calcula uns 150 µl de la solució del sèrum per cobrir cada portaobjectes, passat aquest temps es decanta.
- 9) Incubar amb sèrum primari específic anti-TH, diluït (1:200) en PBS-Albúmina-Bovina 2%, durant 12-15 hores a 4°C en cambra humida, passat aquest temps es deixa 1h a temperatura ambient.
- 10) Rentar amb PBS 0.01 M (3 x 5 min).
- 11) Incubar amb sèrum secundari biotinilat diluït (1:200) en PBS- Albúmina-Bovina 2%, durant 1 h en cambra humida, per a magnificar la unió a l'anticòs primari.
- 12) Rentar amb PBS 0.01 M (3 x 5 min).
- 13) Incubar amb el complex Avidina-Biotina-Peroxidasa diluït (1:100) en PBS-Albúmina Bovina 2% durant 1h en cambra humida, per a magnificar la unió amb l'anticòs secundari.
- 14) Rentar amb PBS 0.01 M (3 x 5 min).
- 15) Revelar la tinció amb diamino-benzidina (DAB) per immunohistoquímica òptica o amb Alexa 568-red per immunohistoquímica de fluorescència, prèvia incubació amb Sudan black durant 10 min per inhibir la fluorescència endògena.

Altres marcatges immunohistologics

Un procediment anàleg al marcatge de la TH s'utilitza per a visualitzar Lamp-1 i GADD-153 (Santa-Cruz®), caspasa-3 activa (Pharmingen®) α -sinucleïna (Chemicon®).

Tinció de TUNEL

S' utilitza aquesta tinció per visualitzar la fragmentació del DNA nuclear en la SN de les rates retrògradament lesionades per l'administració de 6-OHDA a l'estriat. S'aplica amb el kit ApopTag (Oncor®) sobre seccions de teixit parafinat de 5 µm. La reacció amb la pero-xidasa es visualitza amb solució 0.05% DAB i 0.01% de H_2O_2 i les seccions es contrasten amb hematoxilina.

Microscòpia electrònica

Blocs de cervells corresponents al mesencèfal es fixen amb una solució al 2% de glutaraldehid durant 4 h i posteriorment amb solució al 2% de OsO_4 durant 2 h a 4°C. Les mostres es deshidraten segons les tècniques convencionals i es munten en pega Araldite®. Les seccions ultrafines (de 25 a 100 nm) obtingudes per ultramicròtom es tenyeixen amb acetat d'uranil i citrat de plom i s'examinen en el microscopi electrònic del servei d'anatomia patològica de l'HUB (Zeiss EM-109).

Determinacions bioquímiques

Determinació de catecolamines per cromatografia (HPLC)

Es processa el teixit estriatal congelat o bé les seccions gruixudes de teixit fresc de la següent manera (Holman, 1993) :

- a) Es pesa la mostra (20-35 mg cada estriat).
- b) S'homogeneïtza en tubs Eppendorfs amb un volum 1:10 de àcid perclòric (0.1N de HClO₄), mitjançant sonicació intermitent a 100 W durant 12 seg (Branson Sonifier).
- c) Es centrifuga a 13.000 rpm, durant 10 min, a 4°C (centrífuga Biofuge 13. Heraeus).
- d) Es dilueix el sobrenedant obtingut (1:5, 1:10), es filtra amb filtre Millipore de 0.4 µm i s'injecten 20 µl de la mostra a l'aparell de HPLC (LKB-Pharmacia, Bromma, Sweden) a través d'un injector d'alta pressió (Rheodyne, Palo Alto USA) amb un loop de 20 µl.
- e) La separació de les catecolamines (DA, DOPAC, HVA) (vegeu la figura 9), tant en les mostres de teixit estriatal fresc processat com en els perfusats de líquid extracel·lular obtinguts per microdiàlisi cerebral, es realitza amb una columna cromatogràfica Nucleosil C-18 de fase reversa (5 μm, 250 mm x 6,6 mm de Teknocroma, Barcelona, Spain) protegida per una precolumna (30-40 μm, 50 mm x 4,6 mm de Merck). La detecció de les catecolamines es fa amb un detector electroquímic dual (Coulochem II, ESA), amb uns potencials analítics E1 = +50 mV i E2 = +300 mV en la cel·la analítica.

La fase mòbil consisteix en una solució tampó a pH = 4.1 de 50 mM d'acetat sòdic (8.2 g / 2 l H_2O); 25 mM d'àcid cítric (10.5 g / 2 l H_2O); 0.7 mM d'àcid octansulfònic (OSA) (15 ml de OSA 1M / 2 l H_2O) i 10% de Metanol. La solució es filtra amb filtre Millipore de 0.2 µm de por i es desgasifica amb bomba de buit amb agitació.





Determinació de GABA

En mostres de teixit estriatal, es determina la concentració de GABA per HPLC utilitzant una columna Hypersil-ODS (5 µm, 250 mm x 4,6 mm) de fase reversa després de derivatitzar la mostra amb o-ftaldialdehid (OPA) més β -mercaptoetanol i una separació en un gradients d'acetat sòdic (0.2 M, pH 6.2) i acetonitril. El derivat OPA-GABA es detecta amb un detector de fluorescència (Shimadzu RF-551) amb λ ex 340 nm i λ em 455 nm. Els cromatogrames s'analitzen amb el software HPLC manager (Pharmacia LKB) connectat al programa Nelson d'integració i processament de dades.

Citometria de limfòcits

Els limfòcits de rata s'extreuen, en part, de sang perifèrica, però majorment de nòduls limfàtics mesentèrics. Les cèl·lules es tenyeixen amb anticossos monoclonals conjugats amb un fluorocrom distint: PE-W3/25 pels limfòcits CD4 i FITC-OX39 pels limfòcits CD25 (ambdós de Serotec®UK). Les mostres s'analitzen amb un aparell de citometria de flux FAC Sscan (Beckton-Dickinson) per immunofluorescència doble directa. S'importen 400 senyals per mostra i es calcula el percentatge de les distintes poblacions de limfòcits amb el programa CELLQuest TM.

Experiments amb talls gruixuts d'estriat (slices)

Preparació i incubacións

Després de sacrificar la rata i enuclear el cervell, es dissequen els nuclis estriats dret i esquerra i es tallen ràpidament en seccions de 0.3 mm amb un chopper slicer (Panlab). Els talls d'ambdós estriats s' incuben per separat a 37°C en 1 ml de tampó Krebs-Ringer bicarbonat, a pH de 7.2 en un bany d'agitació, sota una atmosfera 95% O₂ / 5% CO₂.

El medi d'incubació consisteix en NaCl 119 mM, KCl 4.8 mM, CaCl₂ 1.7 mM, MgCl₂ 1.2 mM, KH₂PO4 1.2 mM, NaHCO₃ 23.8 mM, glucosa 5.5 mM i MOPS 25 mM.

Tots els compostos que s'afegeixen es dissolen prèviament en aquest medi. Les incubacions es realitzen durant un màxim de 2 h. El teixit i el sobrenedant s'analitzen per separat, el teixit es processa per mesurar el contingut de proteïna pel mètode de Bradford i el sobrenedant diluït 1:5 amb 0.1N d'àcid perclòric s'utilitza per a determinar el contingut de catecolamines per HPLC.

Determinació de l'activitat TH

Els talls gruixuts d'estriat s' homogeneïtzen en 400 µl de sacarosa 0.25 M a 4°C. L'activitat TH s'obté mesurant la producció de L-DOPA després de l' incubació del teixit en un medi tampó d'acetat sòdic 1M i pH = 6.0, que conté 1mM de L-Tyr (Sigma®), 10mM (en 0.1M de 2-mercaptoetanol) de 6-metil-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (THBP, Sigma®) i 2.5 mg/ ml de catalasa (Sigma®). L' L-DOPA formada s'extreu amb alúmina i es determina per HPLC en una columna cromatogràfica de fase reversa amb detector electroquímic dual (Coulochem II, ESA), segons el mètode descrit per Ambrosio et al. (1987). Una µU de TH correspon a 1 pmol de L-DOPA formada per min a 37°C.

Determinació de l'activitat glutamina sintasa (GS)

Seguint el mètode de Meister (1985), s'utilitza hidroxilamina com a substrat; per colorimetria es mesura la formació de γ -glutamil-hidroxamat. La reacció s'atura als 10 i 20 min amb FeCl₃ (0.37 M) en una solució que conté 0.67 M de HCl i 0.2 M de TCA. La proteïna precipitada s'elimina per centrifugació i es llegeix l'activitat òptica en el sobrenedant a 535 nm. L'activitat enzimàtica es calcula a partir d'un estàndard de γ -glutamil-hidroxamat. Una mU de glutamina sintasa correspon a un nmol de γ -glutamil-hidroxamat format en 1 min a 37°C.

Detecció de Malondialdehid (MDA)

La formació de MDA, considerada com a índex de peroxidació lipídica, es mesura utilitzant

tiobarbiturat (TBA), segons el mètode descrit per Di Monte et al. (1986). Els slices estriatals s' homogeneïtzen en el medi d' incubació i un cop en alíquotes es tornen a incubar amb TCA al 40% i amb àcid tiobarbitúric (TBA 0.67% en 1.5 M de NaOH), durant 15 min a 100°C. Després de centrifugar la mostra, es llegeix l'absorbància del sobrenedant a 535 nm en relació a un blanc que conté tots els reactius excepte el teixit. La concentració de MDA es calcula utilitzant una $\varepsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Determinació de la DA

La determinació de la dopamina es fa tal com s'ha descrit pel teixit estriatal.

Determinació de NO

La producció de NO es determina per l'acumulació de nitrit amb nitrat reductasa segons el mètode descrit per Hortelano et al. (1993).

Experiments amb mitocondris

Totes les tècniques aplicades a l'estudi dels mitocondris es realitzen amb l'ajut dels Drs. J. Boada i J. Bermúdez de la Unitat de Biofísica del Departament de ciències Fisiològiques II.

Obtenció dels mitocondris

S'obtenen mitocondris de fetge de rata Sprague-Dawley segons el procediment establert al nostre laboratori per la Dra. Manzano et al. (1996). Assessorats per la bibliografia respecte de la resposta similar dels mitocondris de fetge i cervell a l' MPP⁺ (Vyas et al., 1986), es decideix utilitzar el teixit hepàtic pel seu major rendiment i per la dificultat que comporta separar completament els mitocondris dels sinaptosomes neuronals.

Breument, es disseca i trosseja el fetge de la rata, s'homogeneïtza (aparell de vidre i tefló Potter-Elvehjem) en fred a 1.500 rpm, amb 15-20 polsos, en 8 volums de medi fred (0,25 M de sacarosa, 10 mM de HEPES i 1 mM de EGTA, a un pH = 7.3), es filtra l'homogenat i es centrifuga a 4 °C i 600 x g durant 10 min per eliminar el sediment que conté la fracció nuclear. Centrifugant el sobrenedant a 12.000 x g durant 10 min s'obté el sediment que conté els mitocondris. Finalment, es renta aquest sediment i es dispersa en medi d'homogeneïtzació, mantenint-ho en fred i protegit de la llum fins la realització dels experiments. Així com l'activitat MAO de les neurones dopaminèrgiques de la rata és casi indetectable, la dels hepatòcits es bastant elevada (Arai et al., 1998), raó per la qual en tots els experiments amb mitocondris d'hepatòcits s'afegeix un inhibidor no selectiu de la MAO, la tranilcipromina (TCP) 200 μ M, de cara a evitar el metabolisme de la DA per la MAO i la producció conseqüent de peròxid d'hidrogen (H₂O₂), restringint així els resultats a l'efecte exclusiu de la DA o de la DA oxidada afegida en els experiments.

Incubació dels mitocondris

Mostres de mitocondris de 0.3 - 1.0 mg de proteïna/ml segons els casos (determinada amb el BCA Protein Assay Reagent Kit de Pierce®, utilitzant com a patró una solució mare de 1mg/ ml de BSA) s' incuben a 37 °C en un tampó que conté 220 mM sacarosa, 3 mM Hepes, 20 mM MgCl₂, 2 mM KH₂PO₄, 0.5 mM EGTA, 20 mM glucosa i 20 IU/ L hexo-kinasa, al qual s'afegeix successivament 5 mM K-succinat i 0,8 mM d' ADP per a iniciar la respiració (estat 3).

Estudi de l'activitat metabòlica per microcalorimetria

La microcalorimetria s'aplica per a estudiar l'activitat metabòlica de les suspensions de CFM i la viabilitat dels mitocondris hepàtics en suspensió. Es tracta d'un procediment bastant inespecífic que permet tenir una idea global del funcionament energètic del sistema (Schön et al, 1990; Bottcher and Furst, 1997).

La mesura de la dissipació de calor de la suspensió mitocondrial es realitza a 37°C durant 60 min, utilitzant un sistema microcalorimètric multicanal (Thermal Activity Monitor – TAM- LKB-Thermometric®, Järfalla, Suècia) (Roig et al., 1994), introduint 2,7 ml de suspensió en les cel·les amb agitació de 120 rpm (el volum d'oxigen romanent dins les cel·les és d'uns 0.8 ml, el que assegura unes condicions aeròbiques) i després d'afegir 30 µl de medi (controls), DA i MPP⁺ fins a una concentració final de 70 µM i 5 µM, respectivament.

El senyal de potencia s'adquireix a una freqüència d'1 Hz, les corbes de potència obtingudes indiquen la calor dissipada durant l'activitat metabòlica. Els resultats es donen en μ W/ mg proteïna.

Determinació del consum d'oxigen

La mesura polarogràfica del consum d'oxigen de la suspensió mitocondrial es realitza durant 20 min a 37°C amb un elèctrode d'oxigen tipus cel·la de Clarck (Rank Brothers®, Cambritge, Regne Unit) (Roig et al., 1994), amb 200 rpm d'agitació i condicions idèntiques a les de la microcalorimetria. Les mesures s'efectuen a partir del moment de la incorporació de 5 mM K-succinat i 0.8 mM ADP per a iniciar la respiració mitocondrial; quan s'arriba a l'estabilització del registre (90% saturació O_2 aprox.) s'afegeix de forma seqüencial l'MPP⁺ 5 µM i la DA o DA oxidada 70 µM. Els resultats es donen en nmols d'O₂ consumit/ mg de proteïna/ min.

Mesura de la viabilitat per MTT

La viabilitat de la suspensió mitocondrial es mesura per la detecció espectrofotomètrica a una longitud d'ona de 550 nm de l' MTT formazán (solubilitzat) produït a partir de la reducció de l' MTT (bromur de 3-(4,5-dimetiltiozol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli) afegit a les mostres. L' MTT és un pigment soluble de color groc (substrat de la succinat deshidrogenasa mitocondrial) que es va transformant en MTT formazán, pigment insoluble de color púrpura, mentre el mitocondri és actiu i té suficient poder reductor. Les mesures es van realitzar en suspensions mitocondrials corresponents a 1.0 mg de proteïna, incubades a 37°C durant 45 min amb MPP⁺ 5 µM i DA o DA oxidada 70 µM, abans d'afegir 0.5 mg/ ml d' MTT i reincubades a 25°C durant 15 min més, després d'afegir-ho. La reacció es va aturar amb isopropanol /1M HCl (24:1) (Cohen et al., 1997).

Citometria mitocondrial

L'anàlisi, per citometria de flux amb fluoresceïna, dels mitocondris aïllats de fetge, controls i incubats amb MPP⁺ i DA o DA oxidada utilitza la dispersió frontal de la llum (FSC) com a índex de la mida de la partícula i la dispersió lateral (SSC) com a índex de complexitat. Les mesures es van dur a terme en un citòmetre FACSCalibur controlat pel programari CellQuest.

Mesura del potencial de membrana mitocondrial

Les variacions del potencial de membrana mitocondrial es mesuren durant 20 min per espectrofotometria a 660nm, mitjançant una sonda sensible de membrana diS-C2-(5) (Iodur de 3,3'-dietiltiadicarbocianina). Pel seu caràcter catiònic, la sonda entra en el mitocondri només quan aquest es despolaritza, de manera que a major despolarització mitocondrial, major segrest de sonda per l'orgànul i menor és l'absorbància llegida. El succinat afegit a la suspensió activa la respiració mitocondrial creant un gradient de protons (polarització) que es desfà quan es produeix ATP a partir de l'ADP afegit, aquesta és la despolarització fisiològica que s'observa en les suspensions de mitocondris control. La tècnica no permet mesurar valors absoluts.

Mesura de l'activitat NADH-DH

L'activitat NADH deshidrogenasa es va determinar espectrofotomètricament a partir de la

velocitat d'oxidació de NADH, a una longitud d'ona de 340 nm i a 37°C en una incubació de mitocondris (100mM Tris-HCl i 0.2mM NADH a pH = 7.5)(Ben-Sachar et al., 1995). La mesura es va fer considerant un coeficient d'absorció molar: $\varepsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ i s'expressa en nmol x min⁻¹ x mg prot⁻¹.

Mesura de l'activitat glutamat-deshidrogenasa

Es va determinar espectrofotomètricament per la desaparició de NADPH, a una longitud d'ona de 340 nm i 37°C en un medi 100mM Tris-HCl, 2mM α -oxoglutarat i 0.5mM NADPH (pH = 7.5) (Kornberg i Horecker, 1955). La mesura es va fer considerant un coeficient d'absorció molar: ε = 6.220 M⁻¹ cm-1 i s'expressa en µmol x min⁻¹ x mg prot⁻¹.

Producció de DA oxidada espontàniament

Una solució 14mM de DA en PBS ajustada a 7.4 de pH es deixa unes 12h a T^a ambient. L'oxidació de la solució amb la formació d'aminocrom es detecta per espectrofotometria a una longitud d'ona de 450 nm i es pot visualitzar per la coloració marró que adquireix. Incubant la solució de DA amb 1mM de MPP⁺ el procés s'accelera. Quan l'absorbància de les solucions és igual o superior a 0,6 es considera adequada pels experiments (Offen et al. 1997).

Experiments amb *a*-sinucleïna in vitro

Es va adquirir α -sinucleïna d'un 95% de puresa (Calbiochem®), N-acetilcisteina (NAC) (Sigma®) i dopamina tritiada [7,8- ³H]-DA (Amersham®).

Producció de DA oxidada

Es pot accelerar el procés d'oxidació espontània de la DA a aminocrom incubant una solució 10 mM de DA amb 10 mM de periodat (Sigma®) en tampó 2M Tris a pH 6.8 i a 25°C durant 2h i 30 min, segons el mètode descrit per Aroca et al. (1990), el producte d'aquesta oxidació es centrifuga 1 min a 13000 rpm i es filtra el sobrenedant. Es monitoritza a 450 nm en el espectrofotòmetre.

Incubacións i determinació in vitro de α -sinucleïna

S' incuben a 37°C, concentracions 5 μ M de α -sinucleïna, 100 μ M de DA tritiada o 100 μ M d'aminocrom i 10 mM de NAC (opcional) en tampó PBS a pH 7.4, durant 1h o 12h. Les mostres es bullen amb 1,4-ditiotreitol (DTT) o es precipiten amb solució 40% d'àcid tricloroacètic (TCA). Després de centrifugar-les i rentar-les amb TCA fins no trobar radioactivitat als rentats, es dispersen els pelets amb tampó 1 mM de Tris a pH 7.5 i es mesura la radioactivitat.

Posteriorment es fa l'electroforesi de les mostres en gels de SDS-PAGE 15% i es transfereix a membranes de nitrocel·lulosa pel seu anàlisi per Western-blot: les membranes s'incuben durant la nit amb l'anticòs policional anti- α -sinucleïna (Chemicon®) diluït 1:500, i després dels rentats, s'incuben durant 1h amb l'anticòs secundari biotinilat unit a la peroxidasa de rave (horseradish peroxidase) diluït 1:5000. Per a la detecció de l'anticòs secundari s'usa el procediment de quimioluminescència ECL, que en contactar amb la peroxidasa de rave s'oxida i emet luminescència. El revelat es fa posant en contacte la membrana amb una pel·lícula d'autoradiografia (Amersham®) i mesurant la radioactivitat de les bandes corresponents a α -sinucleïna.

Anàlisi estadístic

Les diferències neuroquímiques entre les mitjanes dels controls i de les rates lesionades s'analitzen amb proves no paramètriques (el test de U-Mann-Whitney per a la comparació entre dos grups, el test de Kruskall-Wallis per a la comparació entre tres o més grups i el test de Wilcoxon per a comparar percentatges) i paramètriques (test d'anàlisi de la variança, ANOVA) amb post-hoc tests (Scheffé F-test), quan no es pot assumir l'equivalència de les variàncies entre els grups o la normalitat de la distribució de les poblacions.

La significació estadística s'estableix a partir de p< 0.05, de manera que consignem * si p< 0.05, ** si p< 0.01 i *** si p< 0.001. Tot el tractament estadístic es realitza amb el paquet estadístic Stat View II de Macintosh.

Capítol 3: Resultats

1. Posta a punt: mesura de la dopamina estriatal

El nucli estriat del cervell de la rata té, curiosament, una concentració de dopamina que correspon a més del doble de la que es troba en humans en els nuclis caudat (uns 25 nmols/g) i putamen (uns 33 nmols/g) (Tong et al., 2006; Nagatsu and Sawada, 2007). Volent establir si els estriats dels dos hemisferis de la rata es podien considerar del tot equivalents, es va determinar el contingut de DA i dels seus metabòlits en ambdós estriats, dret i esquerra, en un nombre de 10 rates. Considerades una per una, els resultats varen ser molt variables. De fet una certa lateralitat està descrita en rates, de manera que es pot parlar de rates dretanes i esquerranes (Glick and Cox, 1978; Glick and Ross, 1981) i això pot repercutir en el contingut de DA estriatal. Encara que relacionar el contingut de DA amb la tendència dreta/esquerra de la rata no era el propòsit del nostre treball, sinó el de constatar si podíem considerar indistintament els estriats dret i esquerra. Considerats en conjunt i malgrat la variabilitat, hi havia una tendència de l'estriat esquerra a presentar entre un 5-10% menys de DA que el dret, encara que estadísticament no ho podíem considerar significatiu. Pel que fa al metabolisme dopaminèrgic, el DOPAC és el metabòlit prioritari en rata, representant aproximadament un 10% del contingut de DA i el HVA és el segon metabòlit, que representa un 5% del contingut de DA, a diferència del caudat-putamen humans on el HVA és el metabòlit predominant (Wilk and Stanlet, 1978; Hornykiewicz, 2001). Les seves concentracions no varien d'un estriat a l'altre (vegeu la figura 1).



Figura 1. Lleugera asimetria entre el contingut de dopamina de l'estriat dret i esquerra de la rata, expressat en nmols/gram de teixit, que no es reflecteix en el contingut dels metabòlits DOPAC i HVA.

2. Lesió a substància negra amb 6-OHDA i amb MPP+

Les lesions amb 6-OHDA es van realitzar en la SN dreta, injectant estereotàcticament 3 µl d'una solució de 7 µg/µl de 6-OHDA en SSF amb 0.02 % d'àcid ascòrbic. Es va verificar el grau de lesió al cap de 2 setmanes mitjançant el test rotacional induït farmacològicament, això és, observant l'aparició d'una conducta rotacional de l'animal en sentit contralateral al costat lesionat quan s'injecta apomorfina 0.05 mg/Kg s.c. i una conducta rotacional en sentit ipsilateral quan s'administra amfetamina 1 mg/Kg i.p.

Es podien definir, així, dos grups d'animals segons que rotessin (més de 40 rotacions en 10 min) o no rotessin o rotessin poc (3 o menys rotacions per minut). En les rates que rotaven, els nivells de DA en el nucli estriat ipsilateral a la SN lesionada s'havien reduït per sota del 5% respecte del cantó control no lesionat (n=8). En les rates que no rotaven o rotaven poc (n=8) els nivells de DA estriatal també estaven reduïts però en menor proporció i de forma molt variable (entre un 25 i un 50%) (vegeu la figura 2).



Figura 2. Determinació de la dopamina estriatal (nmols/g \pm S.E.M.) al cap de 15 dies d'injectar 21µg/3 µl de la neurotoxina 6-OHDA (grup lesió) o 3µl de SSF (grup control) a la SN dreta, segons el resultat del test rotacional induït farmacològicament. Sols les rates que tenen menys del 5% de la dopamina estriatal dels controls responen positivament al test rotacional, fent més de 40 rotacions/10 min en direcció contralateral al hemisferi dret lesionat quan s'injecta apomorfina 0.05 mg/kg s.c, i en direcció ipsilateral al cantó lesionat quan s'injecta amfetamina 1 mg/kg i.p.

Així doncs, el test rotacional positiu de la rata, amb apomorfina i amb amfetamina, ens està indicant un grau de lesió important en la SN i en l'estriat corresponent, situació, pel que fa al contingut de DA, comparable al parkinsonisme o més ben dit a l'hemiparkinsonisme. Aquelles situacions que corresponen a una lesió intermèdia i que es podrien comparar amb un preparkinsonisme, no es detecten amb el test de rotació induït farmacològicament.

També es van realitzar animals controls amb solució fisiològica injectada a la SN i animals amb lesions bilaterals a la SN amb 6-OHDA. En el primer cas, encara que histològicament es podia veure l'efecte d'una lesió mecànica al nucli mesencefàlic, no hi havia cap repercussió en els nivells de DA estriatal.

En el segon cas, els nivells de DA en ambdós estriats disminuïen, encara que d'una forma força variable corresponent al grau de lesió que s'hauria provocat a la SN. Aquestes rates no rotaven ni amb apomorfina ni amb amfetamina, sinó que quedaven en una postura arreactiva i catatònica que ens obligava a alimentar-les amb solució glucosada s.c. per evitar la mort per inanició. Encara que aquesta lesió bilateral podria ser la més propera a la malaltia de Parkinson, la reacció de la rata podia comparar-s'hi només en quant a l'acinèsia, però no quant a la rigidesa ni al tremolor.

Les rates bilateralment lesionades amb 6-OHDA a SN es van utilitzar per estudiar la supervivència de CFM, obtingudes a partir d'embrions de rata E14, preparades en suspensió i implantades dins els estriats denervats.

Les lesions amb la neurotoxina MPP⁺ (n = 8) també es van realitzar a la SN dreta de les rates, injectant 3 µl d'una solució 3 µg/µl de MPP⁺. Ja al cap de poques hores de la lesió, les rates mostraven una tendència espontània a la rotació en direcció ipsilateral al cantó lesionat, que augmentava amb el tractament amb amfetamina. No rotaven amb apomorfina.

La repercussió en la DA estriatal es va comprovar al cap de 2 dies, observant un dèficit important però sempre inferior al que es produïa amb la neurotoxina 6-OHDA (entre un 10 i un 30% de DA), pel que ens trobaríem dins del grup de 6-OHDA que no rotaven. Al cap de 7 i 14 dies la lesió es mantenia, encara que amb una tendència a una certa recuperació (vegeu la figura 3).

La lesió amb MPP⁺ a la SN era doncs més ràpida però menys contundent i possiblement menys selectiva que amb la 6-OHDA, quedant preservades un nombre superior de neurones que permetria una certa recuperació estriatal, possiblement per nova arborització ("sprouting") de les terminacions dopaminèrgiques.



Figura 3. Determinació de la dopamina estriatal (nmols/g \pm sem) a la setmana i als 14 dies d'haver administrat 9 µg/3µl de MPP⁺ (lesió) o 3 µl de SSF (control) a la SN dreta. Després de la lesió, s'observa en la rata un comportament rotacional espontani cap a la dreta (ipsilateral al cantó lesionat) que s'incrementa en administrar amfetamina 1 mg/kg i.p durant el test realitzat als 2 dies de la lesió. No s'observa cap comportament rotatori amb l'apomorfina 0.05 mg/kg s.c.

3. Implantació de cèl·lules fetals mesencefàliques (CFM) en animals lesionats amb 6-OHDA a SN

3.1. Caracterització funcional de les CFM en distints medis de suspensió

Els animals amb la via nigroestriatal unilateralment lesionada amb 6-OHDA es varen utilitzar per intentar pal·liar el dèficit de DA estriatal mitjançant la implantació estriatal de CFM E14, és a dir, les cèl·lules progenitores de les neurones dopaminèrgiques. Primer, es va procedir a una caracterització de les CFM en suspensió per a determinar el marge de temps de fiabilitat que podíem tenir en la seva utilització. Per tècniques calorimètriques es va determinar que la funcionalitat metabòlica de les CFM es mantenia durant, al menys, 4 hores en medi DMEM o RPMI, però no en solució tamponada glucosalina (GS). Els nivells de lactat extracel·lular augmentaven paulatinament a mesura que els nivells d'ATP intracel·lular disminuïen (vegeu figura 4). Tot plegat indicava que les CFM es podien utilitzar amb fiabilitat entre 4 i 5 hores després de l' obtenció (Espejo et al., 1997 – ANNEX 1).



Figura 4: Caracterització de la suspensió de cèl·lules fetals mesencefàliques (CFM) 10⁷cèl·lules/ml. A) Determinació de les concentracions extracel·lulars de lactat (µmols/mg proteïna) al llarg de 18 hores. B) Determinació de les concentracions intracel·lulars d'ATP (nmols/mg proteïna) al llarg de 18 hores. C) Mesura de la dissipació de calor obtinguda per microcalorimetria, com a índex de viabilitat metabòlica de les CFM en tres medis d'incubació: DMEM, RPMI i GS. Les corbes de potencia s'expressen en pW/cèl·lula).

3.2. Ús de neurotrofines per augmentar la supervivència de les CFM

Les CFM implantades en l'estriat, en un volum de suspensió de 2µl, mostraven al cap d'una setmana una supervivència de al voltant del 4% (comptabilitzades a partir de mostres del teixit implantat tenyides amb immunohistoquímica anti-tirosina-hidroxilas i contrastades amb hematoxilina). Al cap d'un mes encara es mantenia una supervivència semblant, amb unes neurones força desenvolupades. Per tal d'augmentar la supervivència neuronal, varem afegir a la suspensió cel·lular 1µmol/ml de GDNF, un factor tròfic potent pel sistema do-paminèrgic (Clarkson et al., 1997) ó 1µmol/ml de BMP-2, un factor tròfic que per llavors s'investigava el seu efecte sobre les neurones. Efectivament, la supervivència de les neurones augmentava uns tres cops al cap d'una setmana de la implantació, en el cas d'haver estat en contacte amb GDNF i uns dos cops amb BMP-2. Al cap d'un mes, però, l'efecte del GDNF no era apreciable. És a dir que la incorporació de GDNF tenia un efecte molt temporal, a la llarga el 95% de les cèl·lules implantades es morien igualment (vegeu la figura 5). Al cap d'un més de la implantació de CFM, el nombre de rotacions amb apomorfina 0.05 mg/Kg s.c. no va variar respecte del test realitzat abans (ANNEX 2).



Figura 5: A) Esquema d'un tall coronal de cervell indicant amb una fletxa el lloc d'implantació de les CFM, en el centre del nucli estriat de rates lesionades amb 6-OHDA en la SNc. B) Neurones implantades i desenvolupades a partir de 2 µl d'una suspensió de CFM de 10⁷cel / ml, visualitzades al cap d'un mes per

immunohisto química anti-TH i contrastades amb hematoxilina. Barra d'escala = 50 μ m. C) Nombre total de neurones TH positives (TH+) en l'estriat al cap d'una setmana i d'un mes de la implantació de CFM amb l'addició o no de 1 μ mol / ml de GDNF o BMP-2. D) mesura de les rotacions contralaterals induïdes amb apomorfina, 1 mes postlesió, sense (46) i amb CFM (59), amb CFM i GDNF(39) i amb CFM i BMP-2 (38).

3.3. Implantació de fibroblasts transfectats

Per tal d'intentar que les CFM rebessin GDNF d'una forma continuada es van utilitzar fibroblasts 3T3 transfectats que expressaven i secretaven el GDNF (3T3/GDNF) de forma continua. La implantació d'una solució que conjuntament contingués CFM i 3T3/GDNF va incrementar la supervivència de les CFM en més del doble i va produir una molt significativa arborització de fibres TH + en la zona de contacte entre els fibroblasts i el teixit estriatal (vegeu la figura 6). Al voltant de la implantació dels fibroblasts el grau de gliosi, mesurat amb immunohistoquímica anti-GFAP, era molt important. Aquests resultats es refereixen exclusivament a un temps d'una setmana postimplant (Espejo et al., 2000 – ANNEX 3). Si l'implant de fibroblasts es mantenia fins a un mes es produïa en el cervell de la rata un fibroma de dimensions considerables. La quantificació d'aquests resultats va ser presentada a la tesi de Mònica Espejo (1999). La meva participació va ser en la obtenció de les histologies aquí mostrades.



Figura 6. A) microfotografia òptica d'un implant de fibroblasts 3T3 en el nucli estriat de la rata mostrant la reacció glial circumdant (coloració marró perifèrica d'una immunohistoquímica anti-GFAP). B) microfotografia d'un coimplant de CFM i fibroblast 3T3/GDNF en el nucli estriat que mostra cèl·lules TH+, sobre tot en la perifèria (coloració marró en una immunohistoquímica anti-TH). C) En augmentar la imatge anterior es veu la proliferació de cèl·lules i fibres TH+. Totes les mostres s'obtenen als 7 dies postimplant. Barra d'escala = 100µm. D) Recompte de neurones TH+ a l'estriat segons la combinació de cèl·lules implantades. Els resultats són la mitjana ± S.E.M. de 4 animals per cada grup. La significança determinada per ANOVA (*p<0,05).

4. Lesions al nucli estriat amb 6-OHDA i MPP+

4.1. Contingut de dopamina i els seus metabòlits

L'efecte sobre el contingut i el metabolisme de la DA a l'estriat, de la 6-OHDA ($32 \mu g/4\mu l$) o de l'MPP⁺ ($12\mu g/4\mu l$) injectats estereotàctica i unilateralment a l'estriat dret, va ser estudiat als 2, 7, 15 i 60 dies post lesió. Varem ajustar les dosis de les dues toxines per tal d'aconseguir una reducció similar de la concentració de DA al cap de 7 dies, al voltant del 20-30% de la DA en l'estriat control.

En el cas de la 6-OHDA no es va observar cap mena de recuperació, de manera que als 60 dies, els nivells de la DA estriatal eren encara d'un 20% respecte del control. En el cas del MPP⁺ s'observava una gradual recuperació del neurotransmissor, amb una concentració de DA d'un 60-70% al cap dels 2 mesos (vegeu la figura 7A).

Estudiant els metabòlits dopaminèrgics, DOPAC i HVA (vegeu la figura 7B), observem que inicialment la reducció no es tant dràstica, fins al 50%. Això ens indica que les neurones romanents augmenten el seu metabolisme, possiblement augmentant la síntesi i la degradació de la DA, com si l'haguessin d'aprofitar més. En definitiva hi augmenta el recanvi (*turnover*) dopaminèrgic.



Figura 7. Gràfics de l'evolució en el temps del contingut de DA estriatal (nmol/g) (A) i dels seus principals metabòlits, DOPAC i HVA (B), després de la lesió intraestriatal unilateral amb MPP⁺ ($12\mu g/4\mu l$) o 6-OHDA ($32 \mu g/4\mu l$).

Aquest efecte es va perdent en el cas de la lesió amb 6-OHDA, denotant una manca de recuperació. En canvi es manté en el cas del MPP⁺.

4.2. Contingut de GABA

En els nuclis estriats, la major part de cossos neuronals corresponen a les neurones espinoses mitjanes GABA-èrgiques, d'aquí que el contingut estriatal de GABA sigui bastant elevat (2 µmols/g teixit aprox.) i podem considerar que es troba essencialment en les dendrites de totes les neurones GABA èrgiques i en les terminacions de les interneurones. La lesió estriatal amb 6-OHDA no hi afectava el contingut de GABA, fins i tot es trobava un lleuger augment durant les primeres setmanes (de 2 a 2.5 µmols/g) com a resposta a la manca de regulació per DA. En el cas del MPP⁺ es produïa, en canvi, una disminució a menys de la meitat del contingut de GABA durant els primers dies, que s'anava recuperant paulatinament fins arribar, gairebé, a ser total (vegeu la figura 8). Això representava una prova més de la manca de selectivitat del MPP⁺ injectat a l'estriat. L'afectació neuronal havia de ser, però, molt localitzada al voltant de la zona d'injecció del MPP⁺, com es va comprovar histològicament (Espino et al., 1995; Espejo et al., 1998), i això permetia una recuperació per part de les neurones al voltant de la lesió. Així doncs, el tractament intraestriatal amb MPP⁺ o amb 6-OHDA ens permetria observar la repercussió en el temps de la degeneració retrògrada sobre la SN i el comportament de l'animal.



Figura 8. Contingut de GABA estriatal després de la lesió a l'estriat amb 6-OHDA o MPP⁺ a unes concentracions que provocaven una pèrdua semblant de dopamina. Experiment realitzat amb 6 animals per grup, els valors es donen en μ mols/g ± S.E.M. (significança *p<0,05; **p<0,01 respecte a temps 0).

4.3. Estudi de l'activitat motora després de lesions bilaterals

L'activitat motora es va valorar realitzant lesions bilaterals en ambdós estriats, amb tots els inconvenients que això comportava per a la supervivència dels animals, sobre tot durant els primers dies post lesió. L'efecte d'aquestes lesions es va estudiar a diferents temps, obser-

vant el moviment lliure de la rata, durant una hora, en un laberint circular amb una sèrie de sensors de moviment. Al cap de dos dies de la lesió, l'activitat motora estava gairebé anul·lada tant per l'MPP⁺ com per la 6-OMDA. L'adaptació a la lesió amb 6-OHDA era tan sols parcial, mantenint-se al cap de dos mesos reduïda a un terç del control. En canvi, després de la lesió amb MPP⁺, l'activitat motora es recuperava al cap d'un parell de setmanes, indicant un cop més que la lesió de la via nigroestriatal havia estat diferent en els dos casos, arribant-se a afectar consistentment la SN amb 6-OHDA però no amb MPP⁺ (vegeu la figura 9).



Figura 9. Gràfic de valoració de l'activitat locomotora al llarg del temps, després de lesions estriatals bilaterals amb MPP⁺ o 6-OHDA, observada durant 1h i mesurada en unitats relatives dels sensors de moviment en un laberint. Els resultats són les mitjanes de 6 rates \pm S.E.M. per a cada grup.

5. Microdiàlisi cerebral intraestriatal in vivo

5.1. Efecte de l'MPP⁺ administrat a través de la cànula de microdiàlisi

L'administració de MPP⁺ (10 mM) a l'estriat mitjançant una cànula de microdiàlisi va permetre comprovar que l' MPP⁺ provocava una depleció de dopamina molt ràpida, augmentant la concentració d'aquesta des de 2.5 nM (basal) a més de 10 μ M en uns 40 min. Aquesta acció es mantenia durant 2-3 h. Així doncs el tractament intradiàlisi amb MPP⁺ resultava un bon procediment per produir la depleció estriatal de la dopamina momentàniament (vegeu la figura 10).



Figura 10. Concentracions de dopamina extracel·lular determinades per microdiàlisi després de l'administració (temps 0) de MPP⁺ 10 mM a través de la cànula implantada a l'estriat.

5.2. Nivells extracel·lulars de dopamina

La determinació dels nivells extracel·lulars de DA en animals lesionats amb MPP⁺ o 6-OH-DA mostra que es mantenen sensiblement més baixos (1.5-2.0 nM en ambdós casos, front a uns valors basals d'aproximadament 2.5 nM) durant al menys dos mesos (vegeu la figura 11).





Figura 11. A i B) Percentatge de dopamina extracel·lular estriatal determinada per microdiàlisi estriatal en rates tractades amb 6-OHDA o MPP⁺ i.e., referit als valors de diàlisi en l'estriat contralateral no lesionat (100% = 2,5 $\pm 0,3$ nM). C) Concentracions de DA extracel·lular basals i després de perfondre MPP⁺, tant en estriats control com en lesionats amb MPP⁺ o 6-OHDA, als 2 dies i als 60 dies de la lesió. En l'estriat lesionat amb MPP⁺, si al cap de dos dies es tracta novament amb MPP⁺, es produeix una depleció de DA molt baixa (de 2.5 nM a 5.0 nM). En canvi, al cap de dos mesos l'MPP⁺ produeix una resposta semblant a un estriat sa, no lesionat (de 2.5 a 10.000 nM). En el cas de la lesió amb 6-OHDA la depleció de DA és encara molt baixa (de 2.5 a 7.5 nM) al cap de dos mesos. Tot això corrobora un efecte depletor del MPP⁺ sense arribar a danyar de forma retrògrada la neurona, el que permet una recuperació al llarg del temps, mentre que la 6-OHDA actua més lentament però provoca un dany retrògrad irreversible (ANNEX 4 dels que he utilitzat aquí, exclusivament aquells resultats que vaig assolir jo mateixa).

6. Lesió retrògrada de la SN per 6-OHDA o MPP+ intraestriatal

El comptatge de les neurones TH+ de la SNc va indicar, efectivament, una gradual reducció en les rates tractades intraestriatalment (i.e.) amb 6-OHDA, de manera que al cap de 30 dies s'hi arribava a un 50% de destrucció. En canvi en els tractaments i.e. amb MPP⁺ no es va trobar una reducció prou significativa del nombre de neurones dopaminèrgiques nigrals (vegeu la figura 12).





Figura 12. A) Reducció progressiva del nombre de neurones TH+ de la SNc després de la lesió i.e. amb 6-OHDA. Es van comptar les neurones TH+ en 6 seccions tissulars consecutives de la SNc, a partir de bregma (-5,4 mm), delimitant la VTA a partir del nervi oculomotor. El comptatge es va realitzar en 16 rates control, 8 tractades unilateralment amb MPP⁺ i 8 amb 6-OHDA a l'estriat, les SNc contralaterals es van
considerar com a control, es van comptar un promig de 100 \pm 3 neurones amb marcatge TH+. B) Microfotografies òptiques de immunohistoquímiques anti-TH de la SNc dreta en una rata control, una lesionada amb MPP⁺ i una lesionada amb 6-OHDA a l'estriat.

7. Protecció de la lesió retrògrada de la SNc amb zVAD i PF-9601N

Com que tan sols la lesió amb 6-OHDA ens proporcionava una clara lesió retrògrada en la SN, varem voler analitzar si aquesta degeneració podia estar associada a un procés apoptòtic, és a dir una degradació del DNA associada a l'activació de caspases. En la figura 13B es mostra com efectivament, a la SN ipsilateral a la lesió apareixen nombroses neurones positives per a la tinció de TUNEL, que indiquen la presència de DNA fragmentat. El tractament d'aquests animals amb un inhibidor no selectiu de caspases, tal com el zVAD. fmk (2 µl d'una solució 85 µM) administrat intranigra, va representar una significativa protecció en la pèrdua de neurones TH + (vegeu la figura 13D), indicant que, al menys en bona part, la degeneració retrògrada induïda per 6-OHDA desencadena una activació de caspases i un procés apoptòtic que, al menys en part, es pot frenar in vivo per la inhibició de les caspases (vegeu la figura 13C). Es van assajar diferents temps d'administració del zVAD després de la lesió. La protecció es va veure quan el zVAD s'administrava al cap de 10 -11 dies post lesió, els resultats que s'ensenyen es refereixen a aquest temps (ANNEX 5).



Figura 13. Microfotografies òptiques d'una tinció immunohistoquímica anti TH de cervell de rata en A) es mostra un tall coronal a nivell del mesencèfal amb les dues substancies negra (la del cantó dret amb un rectangle blanc) i les dues VTA amb marcatge positiu, B) Cèl·lules apoptòtiques amb tinció de TUNEL positiva de la SNc dreta a nivell del requadre en A, 12 dies després de l'administració intraestriatal de 6-OHDA i 24 h després d'administrar solució salina o zVAD.fmk (C) en la SNc.



Figura 13 D. Nombre relatiu de neurones TH + a la SNc al cap d'un mes de la lesió retrògrada amb 6-OH-DA i al cap de 20 dies d'haver administrat zVAD estereotàcticament a la SNc. (** p<0,01 comparat amb els animals lesionats amb 6-OHDA i tractats amb zVAD.fmk; # p<0,05 respecte dels animals tractats amb SSF a l'estriat i a la SNc (vehicle). Control es refereix al costat contralateral intacte. Anàlisi de la variança (ANOVA) i test U-Mann-Whitney.

Amb un raonament semblant a l'anterior, i en col·laboració amb el grup de la Dra. Unzeta (dept. de Bioquímica, Medicina, UAB), es va assajar, en animals retrògradament lesionats amb 6-OHDA, l'efecte del tractament amb un nou inhibidor de la MAO-B, el PF-9601N, que havia mostrat un efecte neuroprotector en diferents models in vitro i in vivo (Sanz, 2008). L'administració de 40 mg/Kg i.p. diària de PF-9601N va repercutir en una protecció significativa del nombre de neurones TH + en la SN_{pc} , 18 dies després de la lesió estriatal amb 6-OHDA (vegeu la figura 14). El tractament amb diferents inhibidors de la MAO, especialment amb deprenil (IMAO-B) s'utilitza en el tractament de la malaltia de Parkinson amb resultats relativament incerts. PF-9601N va revelar tenir un efecte marcat in vivo (ANNEX 6).



Figura 14. Gràfic dels percentatges de neurones TH+ a la SNc: protecció de la degeneració retrògrada amb PF-9601N 40 mg/kg/dia i.p. durant 18 dies després de la lesió. (*** p<0,001 respecte dels controls; #p<0,05 respecte dels lesionats amb 6-OHDA (anàlisis de la variança + test de Scheffé).

8. Implantació de CFM en animals lesionats amb MPP⁺ a l'estriat. Efecte sobre els nivells de DA estriatal

Els animals lesionats i.e. amb MPP⁺ presentaven al cap d'una setmana un marcat eixamplament dels ventricles cerebrals, amb pèrdua de teixit estriatal (vegeu la figura 15A), una situació més propera a una degeneració estriatal (com la que succeeix en la corea de Huntington) que no a la degeneració dopaminèrgica pròpia de la malaltia de Parkinson. Tot i així es van utilitzar aquests animals per assajar les possibilitats de supervivència de CFM en el teixit preservat, tal com havíem fet anteriorment (vegeu figures 4 i 5). Al cap de dues setmanes de la lesió amb MPP⁺ es van implantar les CFM i dues setmanes després es van fer els estudis histològics, bioquímics o de microdiàlisi (el que suposava fins a tres operacions i.e. pels animals estudiats per microdiàlisi). La presència de cèl·lules dopaminèrgiques es va comprovar per tinció immunohistoquímica anti-TH. En la microfotografia ampliada de la figura 15A s'observa la disposició d'un grup abundant de cèl·lules TH+ (fletxes).

La quantificació de la DA en el teixit estriatal va indicar un sensible increment de DA després de la implantació de CFM (gràfica esquerra de la figura 15B). La funcionalitat d'aquestes neurones es va comprovar per microdiàlisi, implantant la cànula on indica la fletxa de la figura 15A. Els continguts de DA extracel·lular s'havien parcialment normalitzat després de la implantació de CFM (gràfica dreta de la figura 15B) (ANNEX 7).



Figura 15. A. Microfotografia òptica d'un tall coronal de cervell de rata (esquerra) on s'aprecia l'eixamplament del ventricle cerebral dret degut a la pèrdua tissular, una setmana després de la injecció estereotàctica de $12\mu g / 4\mu l$ de MPP⁺. La fletxa indica el lloc d'implantació de CFM i posteriorment de la cànula de microdiàlisi. En la imatge de la dreta s'amplia el petit rectangle estriatal mostrant la presència de cèl·lules TH+ (fletxes) desenvolupades a partir de les CFM implantades als 15 dies de la lesió.



Figura 15. B. La gràfica de l'esquerra mostra les concentracions de DA determinades en el teixit estriatal de distints grups de rates (n = 8): control (C) tractades amb SSf i DMEM; controls i implantades amb cèl·lules fetals mesencefaliques (C + CFM); lesionades amb MPP⁺ i tractades amb DMEM (MPP); lesionades amb MPP⁺ i implantades amb CFM al cap de 15 dies. **p< 0.01 respecte de C i C+CFM; #p< 0.05 respecte de MPP, test t de Student.

La gràfica de la dreta mostra la concentració de la dopamina estriatal extracel·lular, mesurada en dialitzatsdels mateixos grups de rates que la gràfica esquerra. En groc es representa la depleció aguda de dopamina provocada per la perfusió puntual de MPP⁺ 10 mM a través de la cànula de microdiàlisi en les rates lesionades amb MPP⁺ i en les lesionades i implantades amb CFM. La concentració de DA dels dialitzats s'expressa en nmols $/ g \pm$ S.E.M. (n= 3-4), *p< 0.05 respecte de MPP, test de Kruskall-Wallis + Test de Wilcoxon.

9. Repercussions de la lesió central amb MPP⁺ o 6-OHDA sobre l'activació limfocitària perifèrica

Les repercussions perifèriques d'una lesió central era un tema que despertava i desperta encara considerable interès. En els malalts de Parkinson son múltiples les deficiències perifèriques observades. Entre elles s'ha descrit una alteració en el contingut de limfòcits que es tradueix especialment en un augment de la població CD4⁺CD25⁺ (Bas et al, 2001). Per aquest motiu en rates lesionades bilateralment en el nucli estriat amb 6-OHDA o MPP⁺ es va estudiar per citometria de flux la quantitat d'aquestes cèl·lules immunitàries existents en ganglis perifèrics, al cap de dos dies de la lesió. Sorprenentment la lesió amb MPP⁺ va mostrar uns valors significativament més elevats de limfòcits CD4⁺CD25⁺, tal com s'havia descrit en humans (vegeu la figura 16). El control neuroendocrí del sistema immunològic sembla estar afectat doncs en la malaltia de Parkinson i aquest efecte es pot reproduir en rates amb una lesió estriatal no del tot selectiva sobre el sistema dopaminèrgic (ANNEX 8).



Figura 16. Percentatge de limfòcits $CD4^+CD25^+$ (expressat en % de cèl·lules T $CD4^+$) presents en ganglis perifèrics de rates lesionades bilateralment en la SNc amb 6-0HDA (n = 6) o bilateralment en l'estriat amb MPP⁺ (n = 6). Els animals controls van ser tractats bilateralment amb solució fisiològica en els mateixos nuclis (n = 12), * p< 0.0047, test U de Mann-Whitney (ANNEX 8).

10. Mecanismes de la lesió produïda pel MPP⁺ observada en talls gruixuts d'estriat

10.1. Depleció dopaminèrgica i selectivitat de la lesió

La toxicitat del MPP⁺ a diferents concentracions es va voler assajar directament sobre talls de teixit estriatal posats a incubar en solució PBS oxigenada durant 2h.

Es va comprovar que una concentració de MPP⁺ 2 mM ja era suficient per a reduir la quantitat de DA estriatal en un 50%, a partir de MPP⁺ 100 mM la depleció de DA era d'un 80% (vegeu la figura 17).

En un temps de 2 hores, l'MPP⁺ depletava fins al 80% de la DA estriatal, aquest semblava ser l'efecte més immediat del MPP⁺ que, de fet, ja s'havia observat in vivo per microdiàlisi.



Figura 17. Gràfica de la concentració de dopamina (pmol/ mg proteïna) mesurada a partir de seccions gruixudes d'estriat, incubades durant 2 hores en tampó de Krebs-Ringer bicarbonat amb distintes concentracions de MPP⁺. S'observa un efecte depletor de DA en forma dosidepenent.

MPP+ (µM) en el tampó d'incubació dels slices estriatals

Amb la incubació de seccions gruixudes de teixit estriatal es va poder estudiar la selectivitat de l'efecte de MPP⁺ a distintes concentracions sobre les neurones dopaminèrgiques i les cèl·lules de la glia, utilitzant com a paràmetre representatiu de les terminacions dopaminèrgiques l'activitat enzimàtica tirosina hidroxilasa i com a indicatiu de les cèl·lules glials l'activitat enzimàtica glutamina-sintetasa (GS). L'activitat TH es reduïa significativament amb MPP⁺ 100 μ M (no amb dosis inferiors), l'activitat GS es reduïa significativament només amb dosis a partir de MPP⁺ 1 mM (vegeu la figura 18) (Ambrosio et al., 1996. ANNEX 9).



Figura. 18. Gràfica de l'efecte de MPP⁺ 100 μ M i 1 mM sobre les activitats enzimàtiques tirosina hidroxilasa (TH) i glutamina sintetasa (GS) de slices estriatals incubats en tampó de Krebs-Ringer bicarbonat durant 2 hores. Els resultats són la mitjana ± S.E.M. de tres experiments diferents. El test U-Mann-Whitney dona diferencies significatives en les dues activitats respecte dels controls (*p < 0.05) amb MPP⁺ 1mM i sols de la TH amb MPP⁺ 0.1mM.

10.2. Producció de radicals lliures i NO

Amb els *slices* estriatals es va voler comprovar el possible increment de radicals lliures produït per l'MPP⁺, tal com s'havia postulat llavors per múltiples autors (Adams, 1993 Chiueh, 1993), mesurant la producció del malondialdehid (MDA) acumulat durant la incubació (vegeu la figura 19). El MDA augmenta significativament ja amb dues hores d'incubació i es revertit per un segrestador de radicals lliures com el DMSO (1%).

El DMSO també reverteix l'efecte d'inhibició de la MAO i del metabolisme de la dopamina produït per l'MPP⁺ 1mM en els *slices*, que s'evidencia per la disminució del DOPAC, així com la caiguda d'activitat GS, el que significa que contraresta l'efecte no selectiu, sobre la glia. El DMSO, en canvi, no protegeix la pèrdua de DA. La depleció de DA no sembla doncs dependre, al menys en un primer moment, de la producció de radicals lliures.



Figura 19. Gràfica en percentatges respecte dels valors control, de l'efecte de MPP⁺ 1mM sobre la producció de radicals lliures (MDA), sobre la depleció de dopamina (DA), sobre la inhibició del metabolisme dopaminèrgic (DOPAC) i l'activitat inespecífica sobre la glia (GS). La concentració de DMSO és de 70 mM. Els valors són la mitjana de tres mostres distintes i tres experiments diferents. El test U-Mann-Whitney dona diferencies significatives respecte dels controls (p<0.05) per a tots els valors de les incubacions amb MPP⁺ 1mM i de totes les incubacions amb MPP⁺ / DMSO respecte de MPP⁺ sol, excepte per la depleció de DA.

10.3. Protecció de l'efecte depletor de DA de l'MPP⁺ per inhibidors de la NOS

Com hem mostrat en la figura 17, MPP⁺ produïa la depleció de DA en els *slices* estriatals de forma dosidepenent, aquest efecte produït per les concentracions més baixes de MPP⁺ es va poder protegir amb distints inhibidors de la sintasa de l'òxid nítric (NOS): l'inhibidor específic de la NOS neuronal, 7- nitroindazol, i els més inespecífics, nitoarginina (NO-Arg) i nitroarginina metilester (NAME), indicant que l'efecte depletor de DA de l'MPP⁺ a les dosis més baixes (inferiors a 25 µM) implicava la producció de NO (vegeu la figura 20) (Cutillas et al., 1998 – ANNEX 10).





(MPP +) µM

Figura 20. A) Efecte dels inhibidors de la NOS sobre la toxicitat del MPP⁺ 5 μ M en slices estriatals. EtOH, etanol usat com a vehicle del 7-NI; DMSO, dimetilsulfòxid usat com a quelant de radicals lliures; Inhibidors de la NOS: 7-NI, 7-Nitroindazol; NO-Arg: N ω -nitroarginina; NAME, N ω -nitroarginina metilester. B) Protecció de la depleció de DA amb 0.16 mM de 7-nitroindazol a concentracions de MPP⁺ inferiors a 25 μ M. Els resultants són la mitjana de 4 mostres en tres distints experiments ± S.E.M. El test U-Mann-Whitney dona diferencies significatives (*p < 0.05) pels valors de 2, 5, 10 i 25 μ M MPP⁺ +7-NI, respecte dels mateixos sense l'inhibidor de la NOS.

11. Mecanisme de la lesió pel MPP⁺ estudiat en mitocondris

Les tècniques aplicades a l'estudi dels mitocondris es van realitzar amb l'ajut de la Unitat de Biofísica del departament de ciències Fisiològiques II de la UB, concretament dels Drs. J. Boada i J. Bermúdez.

11.1. Suspensions de mitocondris estudiades per citometria de flux

Per estudiar l'efecte que l'MPP⁺ podia tenir a nivell mitocondrial es van obtenir suspensions de mitocondris de fetge de rata que segons la literatura responen a la neurotoxina de forma similar a com ho fan els de cervell (Vyas et al., 1986), amb l'avantatge d'una més senzilla extracció tissular i un rendiment superior. Per citometria de flux es va determinar l'existència d'una població bastant homogènia de partícules que per la mida corresponia a mitocondris (vegeu la figura 21). La incubació de la suspensió amb MPP⁺ 5 mM desdoblava la població inicial, fent aparèixer una altra que podia correspondre a mitocondris despolaritzats.



Figura 21. Gràfics de citometria de flux de suspensions de mitocondris aïllats de fetge de rata, indicant les dues poblacions de partícules que podrien correspondre a mitocondris polaritzats (esquerra) i despolaritzats (dreta) després de ser incubades amb MPP⁺ 5 μM.

11.2. Funcionalitat metabòlica dels mitocondris: dissipació de calor i viabilitat

La funcionalitat metabòlica dels mitocondris es va assajar: a) mesurant la dissipació de calor de la suspensió i b) mesurant la capacitat reductora de la mateixa amb MTT pigment que es sol utilitzar com a paràmetre indicatiu de la viabilitat de les cèl·lules senceres i que té la propietat de virar de color en ser reduït a MTT formazán.

Es va incloure aquí, a més a més de MPP⁺ 5 μ M, la condició donada per una concentració de DA de 70 μ M, equivalent a la concentració total de DA en l'estriat, doncs suposàvem que aquesta seria la concentració de DA amb la que el mitocondri entraria en contacte en el cas que es buidessin totalment les vesícules dopaminèrgiques per efecte de l'MPP⁺.

Les dues concentracions de MPP⁺ i de DA per separat no arribaven a donar una alteració significativa de la funcionalitat mitocondrial. En canvi, quan s'aplicaven conjuntament els dos paràmetres resultaven significativament disminuïts, com si MPP⁺ i DA s'estiguessin potenciant mútuament per exercir un efecte deleteri sobre el mitocondri (vegeu la figura 22) (ANNEX 11).



Figura 22. A) Gràfica de la dissipació de calor dels mitocondris hepàtics durant 60 min, mesurada en suspensions control (C), incubades amb MPP⁺ 5µM, amb DA 70µM o amb DA i MPP⁺. Els valors s'expressen en µW / mg pr ± S.E.M. Els resultats són la mitjana de 6 experiments (controls) i 4 experiments (DA i MPP⁺) distints. Els test U-Mann-Whitney dona una diferència significativa per a la última condició respecte dels controls (*p< 0.05). B) El poder reductor de la suspensió de mitocondris es va mesurar colorimètricament a 550 nm. Detectant el MTT formazàn produït a partir de MTT 0.5 mg / ml afegit a la suspensió. Els resultats són la mitjana ± S.E.M. de 4 distints experiments. Els test U-Mann-Whitney dona una diferència significativa per a la última condició respecte dels controls (*p< 0.05).

11.3. Mesura del potencial mitocondrial

El potencial mitocondrial es veu alterat per l'acció conjunta de l'MPP⁺ 5μ M i la DA 70 μ M (vegeu la figura 23) (però no per cadascun d'ells per separat). La despolarització produïda per ambdós és força superior a la que fisiològicament es pot observar en les suspensions control. Això vol dir que el mitocondri s'està despolaritzant sense produir ATP, és a dir s'està dissipant calor inútilment.

11.4. Estudi de l'activitat del complex I de la cadena respiratòria mitocondrial sota l'efecte de l'MPP⁺ i la dopamina

El MPP⁺ ha estat extensament descrit com un inhibidor del complex I (NADH-DH) mitocondrial (Nicklas et al., 1985). Per aquest motiu es va assajar l'activitat NADH-DH en homogenats de mitocondris en contacte amb MPP⁺ 5 μ M i DA 70 μ M,



Figura 23. Gràfica de la variació del potencial de la membrana mitocondrial mesurada per espectrofotometria a 660 nm, durant 20 min, en una suspensió de mitocondris activats amb 5 mM de succinat i 0.8 mM de ADP, controls (cercles blancs) o exposats a MPP+ 5 µM i DA 70 µM (cercles negres) afegits quan indiquen les fletxes del gràfic. Cada punt és la mitjana ± S.E.M. de 4 experiments distints. El test ANOVA demostra que les dues corbes són significativament distintes (*p< 0.0001).

utilitzant NADH com a substrat a concentracions saturants. Ni la DA 70 μ M ni l'MPP⁺ 5 μ M, per separat o conjuntament, són suficients per inhibir l'activitat NADH-DH. Cal arribar a una concentració 1mM de MPP⁺ per tenir una reducció de l'activitat NADH-DH d'un 50%. Efectivament l'efecte inhibidor de l'MPP⁺ sobre la NADH-DH ha estat descrita a aquestes concentracions, però això indica que el MPP⁺ és un mal inhibidor de la NADH-DH.

Per assolir una concentració 1 mM de MPP⁺ intramitocondrial, cal suposar que la toxina penetra en contra de gradient. Això de fet, està descrit: l'MPP⁺ és bombejat dins del mitocondri per un mecanisme no determinat però depenent de l'activitat mitocondrial (Davey et al. 1992). Si suposem que per a que es doni això la concentració de MPP⁺ extracel·lular és com a mínim de 0,1 mM i que aquest MPP⁺ prové del metabolisme de l'MPTP circulant per la sang, suposant una absorció del 100% i un pas de la barrera hematoencefàlica per difusió, això representaria una dosi de MPTP de al voltant 1 mg/Kg. Al ratolí s'administren normalment dosis de 30 mg/Kg de MPTP, Dosis repetides de 1,5 mg/Kg administrades a primats i que resulten letals en humans (Colosimo et al, 1992), són, aproximadament equivalents a 5.3 µM, semblants a les dosis que estem assajant en els experiments amb talls estriatals (vegeu la figura 24). Aquestes dosis haurien d'acumular-se 200 vegades en el mitocondri per tenir un efecte sobre l'activitat NADH-DH. (ANNEX 11).



Figura 24. Activitat NADH-DH en suspensions de mitocondris aïllats en presència de MPP⁺ i/o DA. La última barra del gràfic indica la inhibició aconseguida amb MPP⁺ 1 mM. Les dades són la mitjana \pm S.E.M. de 12 preparacions mitocondrials diferents. El test U-Mann-Whitney dona diferencies significatives per a la última condició respecte dels controls (***p < 0.001)

11. 5. Distints efectes del MPP⁺ segons distintes concentracions

Dels resultats anteriors varem poder concloure que l'MPP⁺ a dosis molt baixes, inferiors a 10 μ M, afectava l'alliberament de DA, mentre que a dosis superiors a 100 μ M exercia un efecte sobre l'activitat NADH-DH i la producció de radicals lliures, coincidint amb els efectes inespecífics de l'MPP⁺. Tot això fa pensar que la relació de l'MPP⁺ amb la malaltia de Parkinson s'ha de buscar a unes concentracions tissulars inferiors a 10 μ M i molt possiblement s'ha de relacionar amb la depleció de DA (vegeula figura 25) (Ambrosio, 1997 – ANNEX 12).



Figura 25. Extrapolació dels resultats obtinguts amb talls estriatals i amb mitocondris aïllats sobre l'efecte de l'MPP⁺ en relació a les seves concentracions.

11.6. Consum d'oxigen dels mitocondris exposats a MPP⁺ i DA oxidada

Encara que l'activitat NADH-DH no es veu alterada per l'MPP⁺ 5µM més la DA 70 µM quan es mesura in vitro amb un excés de NADH, el consum d'oxigen sí que es veu alterat quan a la suspensió de mitocondris incubats amb MPP⁺ l'incorporem DA prèviament oxidada (DAox), que majoritàriament estarà en forma de dopaquinona (Boada, 2000 – ANNEX 11) (vegeu la figura 26). Això va fer pensar i es va demostrar posteriorment en el nostre laboratori (Gimènez-Xavier, 2006) que la DAox redueix l'activitat NADH-DH per manca de substrat, i en reduir el NADH mitocondrial està disminuint el poder reductor (MTT) mitocondrial



Figura 26. Gràfiques del consum d'oxigen en mitocondris hepàtics aïllats incubats amb DA, DAox (70 μM) amb o sense MPP⁺ (5 μM). Els resultats són la mitjana de 3 experiments diferents. *p<0,05 comparat amb C (test U de Mann-Whitney)

12. Lesió de la via nigroestriatal amb DA in vivo

12.1 Oxidació de la DA in vitro, efecte de l'MPP+

A pH fisiològic o bàsic, la DA s'oxida espontàniament generant una sèrie de compostos com quinones, semiquinones i 5,6 dihidroxiindoles zwitterionics, tots ells molt reactius, que polimeritzen i rendeixen neuromelanina, aquest procés es veu activat per la presencia de ROS (Graumann et al., 2002), però varem poder comprovar que l'MPP⁺, fent de catalitzador del procés, també podia facilitar aquesta oxidació (vegeu la figura 27) in vitro.



Figura 27. Gràfica de l'absorbància a 450 nm de l'oxidació in vitro de la dopamina en solució tamponada amb PBS a pH 7 i a T^a ambient, en presencia o no de MPP⁺ 1 mM (relació 1:14, com la utilitzada en les incubacions de suspensions de mitocondris aïllats) al llarg de 24h.

12.2. Estudi histològic de la lesió amb DA a la substància negra

Els resultats anteriors feien pensar en un efecte lesiu de la DA per si mateixa, si patia una autooxidació en el citosol, és a dir a fora de les vesícules d'emmagatzemament. Es va procedir, doncs a administrar estereotàcticament una dosi de DA (2µl d'una solució de 3.8 µg/µl) anàloga a la que s'havia utilitzat de 6-OHDA en la SNc de les rates (2µl d'una solució de 4 µg/µl). Al cap d'una setmana, es va poder observar una zona de teixit desestructurat al voltant de la lesió; en zones de la SNc adjacents a la lesió veiem l'activació de caspasa-3 i degeneració neuronal (vegeula figura 28).



Figura 28. Imatge central: substancia negra 7 dies després de la lesió amb DA, s'indica amb X la zona analitzada. A) Tinció amb hematoxil.lina-eosina i B) immunomarcatge amb anti-caspasa-3 activa en el lloc d'administració de DA (marcat amb un asterisc). C) Tinció amb fluoro-jade indicant neurones en degeneració i D) immunohistoquímica anti caspasa-3 activa en la zona X a 0,5 mm del lloc d'injecció. Barra d'escala: 500 µm. Les imatges son representatives de 4 animals tractats.

12.3. Estudi bioquímic i test rotacional de la lesió amb DA in vivo

L' administració intranigra de DA hi redueix el nombre de neurones TH+ i el contingut de DA estriatal, en aproximadament un 50% al cap de tres setmanes de la seva aplicació. La DA resulta doncs lesiva encara que comparativament molt menys que la 6-OHDA, no arribant-se a una lesió suficient com per produir un comportament rotacional en les rates en el test amb apomorfina (vegeu la figura 29).



Figura 29. A) Concentració de DA estriatal, B) Nombre de neurones TH+ en la substància negra i C) rotacions contralaterals amb apomorfina en rates tractades intranigra amb DA o 6-OHDA, al cap de 3 setmanes del tractament.

12.4. Signes d'autofagia en la lesió produïda per la DA in vivo

L'anàlisi de la lesió provocada per la DA va indicar una sobreexpressió d'un marcador d'activació lisosomal com Lamp-1 i algunes figures autofàgiques, observades per microscòpia electrònica, que no es van veure amb 6-OHDA. De forma inversa, un marcador d'estrès reticular com GADD153, possiblement relacionat amb l'augment de radicals lliures i el desencadenament d'apoptosi es va veure fortament incrementat per 6-OHDA però no per DA (vegeula figura 30).



Figura 30. Tractament intranigra amb DA. A) Increment de marcatge lamp-1 al voltant de la lesió. B) Imatge autofàgica representativa observada a la substància negra tractada. C) Increment de GADD-153 en la substància negra tractada amb 6-OHDA, però no amb DA (D).

12.5. Estudi de l'expressió de α -sinucleïna en la lesió per DA in vivo

La primera mutació gènica trobada en una població de malalts de Parkinson va ser el gen SYNA1, rebatejat PARK1, de l' α -sinucleïna. Això va incrementar exponencialment el interès per aquesta proteïna i la seva possible implicació en la degeneració o preservació de les neurones dopaminèrgiques. El seu paper fisiològic i la seva possible relació amb la DA no estan encara avui dia del tot aclarits. Nosaltres vàrem observar que el tractament intranigra amb DA hi incrementava considerablement l'expressió d' α -sinucleïna. Aquest augment d'expressió no es produïa precisament en les neurones dopaminèrgiques sinó en les fibres que envolten aquestes neurones i que resulten preservades en una degeneració dopaminèrgica (vegeu la figura 31). En aquest cas al menys podíem pensar que un augment de l' α -sinucleïna no estaria lligat a la degeneració sinó més aviat a la preservació.



Figura 31. Immunofluorescència per α -sinucleïna (verd) i TH (vermell) en la substancia nigra després del tractament amb DA. S'observa un fort marcatge que es solapa només parcialment amb el de TH, l'increment s'observa sobretot en les fibres TH – de la nigra.

12.6. Estudi de incubació de α -Sinucleïna i DA in vitro

Utilitzant α -sinucleïna pura (Sigma) hem volgut comprovar si la DA interaccionava amb ella i podia explicar la seva pèrdua de solubilitat. Utilitzant H³-DA i H³-DAox es va comprovar que la incorporació de marcatge a l' α -sinucleïna era baix i semblant al que tenia lloc de forma inespecífica a l'albúmina. En canvi, la incubació d' α -sinucleïna amb DA o amb DAox feia aparèixer una banda de doble pes molecular estable per Western-blot (vegeu la figura 32). Tot fa pensar que la presència de DA, sense necessitar de formar enllaç estable amb la α -sinucleïna, catalitza la dimerització covalent d'aquest proteïna. Aquesta dimerització, mitjançant un pont de Tyr, s'ha descrit que té lloc especialment a partir de la α -sinucleïna mutada i és el primer pas de la seva agregació anòmala i conseqüent precipitació i pot estar vinculada amb la degeneració dopaminèrgica en la malaltia de Parkinson.



Figura 32. Western-blot de α -sinucleïna purificada (PM 15 kDa). En presència de DA o DA oxidada (dopaminocrom o DAchr) apareix una banda de pes molecular exactament doble (30 kDa). Aquesta banda deixa d'aparèixer en presència de l'antioxidant Nacetil-cisteïna, indicant un procés lligat a la oxidació de la DA.

Capítol 4: Discussió i conclusions

Quan vaig iniciar aquests treballs, cap a l'any 1995, ja se sabia que la rata era un animal especialment resistent a l'acció de l'MPTP. Aquest compost, amb una important activitat parkinsonígena en humans i en micos, administrat a rates gairebé no els feia efecte en el SNC (Boyce et al., 1984; Chiueh et al., 1984; Enz et al., 1984; Fuller et al., 1985). Augmentant les dosis les rates s'acabaven morint per l'aturada cardíaca conseqüent a la depleció de la noradrenalina periférica (Algeri et al., 1987), sense que hi hagués afectació central. Se sabia també que l'MPTP havia de ser metabolitzat per la MAO-B al catió MPP⁺ per exercir el seu efecte tòxic neuronal, de manera que la inhibició de la MAO-B podia, en part, prevenir el seu efecte (Glover et al., 1986). Quant als mecanismes moleculars d'actuació, el més clar era que l'MPP+ utilitzava els transportadors dopaminèrgics (DAT) per entrar dins la neurona (Javitch et al., 1985) i que era un inhibidor del complex I de la cadena respiratòria mitocondrial (Ramsay et al., 1989; Schapira et al., 1990). Aquest fet semblava per si sol explicar la seva selectivitat i la seva elevada toxicitat sobre les neurones dopaminèrgiques. Les concentracions a les que l'MPP+ inhibia l'activitat mitocondrial eren, però, molt elevades per ser assolides in vivo (al voltant de 1 mM) encara que aquest compost s'acumulés activament dins el mitocondri (Nicklas et al., 1992).

D'altra banda, des dels anys 60, el model clàssicament utilitzat per a destruir les neurones dopaminèrgiques in vivo consistia en l'aplicació estereotàctica de 6-OHDA en la via nigroestriatal de la rata (Ungerstedt, 1968). Tant la 6-OHDA com l'MPP⁺ entren dins la neurona dopaminèrgica a través dels DAT, especialment abundants en les terminacions dopaminèrgiques. Múltiples evidències en patologia recolzaven, a més, la hipòtesi segons la qual la degeneració nigroestriatal té un caràcter retrògrad, començant per les terminacions sinàptiques i avançant cap al cos de la neurona. Calia doncs preguntar-se si MPP⁺ i 6-OHDA podien estar actuant de forma similar.

El MPP⁺ no passa la barrera hematoencefàlica (Shimizu, 2001) i el MPTP no fa efecte a la rata. El motiu no esta del tot clar, però probablement resideix en una ràpida capacitat metabolitzadora perifèrica de l'MPTP a la rata, que no deixa arribar al cervell unes concentracions suficients per resultar tòxiques i una menor activitat MAO-B cerebral, en aquest animal. La diferència d'efecte no residia en el mateix MPP⁺, doncs si aquest compost s'injectava estereotàcticament en la SN o en el nucli estriat de la rata, provocava respectivament una destrucció de la via nigroestriatal o una important depleció dopaminèrgica. La meva primera batalla amb l'MPP⁺ i les rates va consistir en posar a punt un model que va utilitzar la Dra. Anna Espino a la seva tesi: es tractava d'establir unes dosis de 6-OHDA i MPP⁺ que aplicades en l'estriat de la rata provoquessin una lesió comparable en termes de pèrdua de dopamina estriatal i comprovar com aquesta lesió evolucionava en el temps. Es va establir que l'administració intraestriatal de 3 µg/µl de MPP⁺ o de 8 µg/µl de 6-OHDA reduien els nivells DA a aproximadament un 40% al cap de 48h. Al cap de 7 dies els nivells de dopamina estriatals eren encara una mica inferiors (30-35%). Gairebé ja no disminuien més o molt poc en el cas de la 6-OHDA i al cap de 60 dies teniem aproximadament un 20% de la dopamina estriatal control. En canvi, els animals lesionats amb MPP+, al cap de 60 dies teníem en l'estriat un 70% de la dopamina que hagués hagut d'haver. Ambdòs compostos són transportats retroaxonalment des de l'estriat fins la SN, però clarament els seus efectes han de ser diferents. En el cas de la 6-OHDA es destrueixen un 80% de les neurones dopaminèrgiques, corresponents al feix que s'ha lesionat per administració de la toxina en el centre de l'estriat, de manera que sols sobreviuen les neurones que no han entrat en contacte amb la 6-OHDA. En el cas del MPP⁺ hi ha una clara recuperació, malgrat la depleció o destrucció de les terminals sinàptiques estriatals. Una depleció de dopamina semblant no implica, doncs, una lesió semblant de la nigra. La 6-OHDA resulta més lesiva, possiblement per la seva producció directa de radicals lliures derivats de l'oxigen, en condicions fisiològiques. L'MPP⁺, en canvi, és retrotransportat de manera que el seu efecte quedi atenuat, ja sigui perquè és metabolitzat ulteriorment o perquè queda vesiculat i no pot danyar ni el citosol ni els mitocondris.

Per microdiàlisi estriatal es va comprovar el comportament de la dopamina extracel·lular front a les lesions amb 6-OHDA o MPP⁺. La recolecció de mostres a través de la cànula de microdiàlisi ens permetia determinar els nivells extracel·lulars de dopamina i els seus metabòlits, DOPAC i HVA i a l'hora, ens permetia poder estudiar la resposta del teixit estriatal a la perfusió aguda l'MPP⁺ per la cànula, així, en un estriat sa, la perfusió de MPP⁺ produeix una depleció quasi immediata de DA que es detecta per l'augment de la seva concentració en unes 50 vegades, en les mostres recollides. En els estriats lesionats amb MPP⁺ o 6-OHDA els nivells extracel.lulars de dopamina disminuien només en un 30-40% respecte de l'estriat control no lesionat. La perfusió amb MPP⁺ però denotava lesió tissular en quant que la concentració de la DA recollida augmentava només entre 2 i 4 vegades. Aquest efecte es mantenia en els animals lesionats amb 6-OHDA al cap de 60 dies. En canvi, en els lesionats amb MPP⁺ la resposta del teixit a la perfusió aguda de MPP⁺ per la cànula era gairebé igual que la dels animals control. Els metabòlits de la DA, DOPAC i HVA, revelaven també una normalització al cap de 60 dies de la lesió amb MPP⁺ però no amb la de 6-OHDA.

Tot plegat indicava una recuperació en la lesió amb MPP⁺ que no es donava en la lesió amb 6-OHDA.

Per llavors i en col·laboració amb els serveis de neurologia i de immunologia de l'Hospital de Bellvitge, estàvem estudiant la implicació del sistema immunològic en la malaltia de Parkinson. Marcadors limfocitaris com CD4+CD45RA+ (limfocits T helper immadur) o CD4+CD29+ (limfòcit T helper de memòria) es trobaven significativament reduits, mentre altres com CD4+CD25+ (limfocit T helper activats) estaven augmentats en una població de 64 pacients amb la malaltia, independentment del tractament que estiguessin seguint. En els nostres animals lesionats amb MPP⁺ o amb 6-OHDA es varen estudiar aquests paràmetres en els ganglis mesentèrics intestinals. Efectivament en el cas de l'MPP+ es varen trobar uns valors de CD4+CD25+ significativament elevats. La connexió entre la lesió central i el sistema immunològic no està clar què significa. L'aparició de CD25 en la membrana limfocitària indica normalment activació dels limfòcits mediada per interleuquina-2. Encara que ara mateix és merament especulatiu s'ha hipotetitzat que un augment d'IL-2 podria ser un dels detonants de la degeneració neuronal per apoptosi en el SNC, de la mateixa manera que condueix els limfòcits T a entrar en apoptosi (Fournel, 1996). És interessant que la lesió causada per MPP⁺ en l'estriat, encara que reversible i no tant dràstica com la provocada per 6-OHDA, condueixi a una activació limfocitària. Possiblement una certa disrupció de la barrera hematoencefalica té aquí un important paper que no es pot extrapolar a la malaltia de Parkinson. Ara bé, en la PD hi ha una activació microglial (McGeer, 1988; Liu, 2003) i una activació limfocitària perifèrica (Fiszer, 1994), motiu pel que el paper del sistema immunològic precedint o acompanyant la degeneració dopaminèrgica no es pot descartar. En tot cas l'activació limfocitària no seria deguda a la pèrdua de dopamina central, ja que no es reprodueix amb 6-OHDA però sí que podria estar vinculada al procés de degeneració.

Aquests resultats es van publicar en el J. Immunol. (Bas, 2001), en el que es realitzava una comparació entre les dades obtingudes en pacients de PD i en rates tractades amb 6-OHDA o MPP⁺.

La utilització de cèl·lules fetals mesencefàliques (CFM) per a intentar compensar la pèrdua de DA estriatal en la PD s'ha estat proposant des dels anys 80 i s'ha assajat experimentalment i clínicament (Bjorklund, 2000) especialment durant els anys 90, abans inclús d'abocar-se els esforços al control i a la utilització de les cèl·lules progenitores o cèl·lules mare. Amb la Dra. Mónica Espejo vàrem assajar la supervivència i recuperació dopaminèrgica en rates lesionades amb MPP⁺ al cap de 15 dies de la implantació cel·lular. Encara que el nombre de cèl·lules que sobreviuen és molt baix, resulta suficient per incrementar els nivells tissular i extracel·lular de dopamina, respectivament en un 20% i en un 200%. La depleció provocada per perfusió aguda de MPP⁺ també ens indica una major concentració de DA en l'estriat implantat amb CFM. Encara que l'increment sigui relativament petit, hem de tenir en compte que la simptomatologia parkinsoniana apareix amb un grau de lesió d'aproximadament el 80% de pèrdua de DA, de manera que un restabliment ni que sigui d'un 10% pot ser clínicament important.

Aquests resultats es van publicar a Neurochem. Res. (Espejo, 1998).

Continuant amb els mecanismes de lesió retrograda es va comprovar, en animals lesionats amb 6-OHDA, que la pèrdua de neurones a la SN era gradual durant 30 dies després de la lesió i que a la SN anaven apareixent cèl·lules TUNEL positives, indicant la possibilitat d'un mecanisme apoptòtic de mort programada. Els animals lesionats amb 6-OHDA a l'estriat es van tractar estereotàcticament a la SN amb zVAD , un inhibidor genèric de les caspases, a diferents temps després de la lesió i es va comprovar que quan el zVAD s'administrava 11 dies després de la lesió hi havia una prevenció significativa de la mort neuronal. Podiem doncs afirmar que, al menys un 50% de les neurones que degeneraven retrògradament per efecte de la 6-OHDA ho feien per mecanismes d'apoptosi.

Els inhibidors de la MAO-B s'inclouen habitualment en el tractament DATATOP de la PD (levodopa + selegilina + vitamina E). Els motius d'incloure aquests compostos en el tractament de la malaltia no deixen de ser bastant empírics, havent-se demostrat pel deprenil® (selegilina) un efecte neuroprotector (Mytilineou, 1997; Ebadi, 2002) que encara no se sap del tot en què consisteix. La descripció del deprenil com a compost que prevenia la toxicitat de l'MPTP en micos i en ratolins va reforçar aquests arguments (Langston, 2000). Sembla que segons la dosis en que s'utilitzi el deprenil pot tenir un efecte IMAO-B, un efecte de bloqueig de DAT o un efecte antioxidant. Els mateixos criteris poden resultar extensibles a altres IMAOs-B que al metabolitzar-se no donen lloc a amfetamina, que és el cas del deprenil. Nosaltres hem estudiat i hem descrit l'efecte neuroprotector del PF-9601N, [N-(2-propynyl)-2-(5-benzyloxyindolyl) methylamine], un compost d'aquestes característiques amb una selectivitat i afinitat per a la MAO-B superior al deprenil, tal com ha estat descrit pel grup de la Dra.Unzeta de la UAB en col.laboració amb el qual s'ha realitzat aquest treball. En rates lesionades amb 6-OHDA intraestriatal la pèrdua de neurones dopaminèrgiques a la SN s'ha reduit en un 50% pel tractament continuat durant uns 20 dies amb PF9601N administrat per via enteral. No deixa de resultar sorprenent l'efecte de la inhibició de la MAO-B, ja que no afecta el metabolisme de la DA, en el que està implicada especialment la MAO-A. La MAO-B, com s'ha esmentat anteriorment es va descriure com a necessària per a l'efecte tòxic del MPTP, però va resultar que la seva inhibició protegia no tan sols dels efectes in vivo del MPTP sinó també, al menys parcialment, dels efectes del MPP⁺ en cultius cel·lulars (Wu, 2000). La MAO és un enzim que, per la seva mateixa funció fisiològica, dona com a productes no tan sols el sobstrat monoamino oxidat sinó també amoníac i peròxid d'hidrogen, essent per tant una font de radicals lliures d'oxigen. A més la MAO-B, al menys en rosegadors, no està present en les neurones catecolaminèrgiques però el cert és que la seva inhibició té un efecte neuroprotector sobre aquestes neurones.

A través d'esbrinar els mecanismes pels que determinades toxines destrueixen la neurona dopaminèrgica, preteníem acostar-nos a una explicació de com deu degenerar aquesta neurona en una situació patològica. La 6-OHDA simplement al dissoldre's en solució aquosa a pH neutre i temperatura fisiològica es va alliberant d'un hidroxil i va oxidant el grup catecol a quinona. Així doncs l'acció de la 6-OHDA sembla prou clarament associada a una situació d'estrès oxidatiu (Olanow, 1999). Quedava per esbrinar quines alteracions moleculars es produien en l'estriat per acció del MPP⁺. Ja haviem comprovat in vivo que l'efecte de l'MPP+ intraestriatal quedava bastant limitat a l'estriat. Per anar més enllà es van utilitzar talls d'estriat de 300 µm de gruix que s'incubaven a 37°C en una solució oxigenada i en agitació. Mantinguts d'aquesta manera els talls estriatals sobreviuen bé durant unes dues hores. L'anàlisi dels talls per aquest procediment ens indica que ja a una concentració de MPP+ 2µM les concentracions de DA es redueixen a aproximadament la meitat, lo qual es pot interpretar com que aquestes concentracions són suficients per depletar la meitat de la DA. Concentracions creixents de MPP⁺, fins a 10 mM, ens redueixen la DA a un 20%, però hi ha un remanent de DA que no s'arriba a depletar. Les terminacions dopaminèrgiques no semblen comportar-se de forma homogènia front al MPP⁺. De fet sembla que les terminacions de la matriu o dels illots estriatals tenen una sensibilitat diferent front al MPP⁺ i possiblement també es pot trobar un diferent efecte topològic des de l'estriat dorsal a l'estriat ventral (Turner, 1988). Quan en aquestes slices es mesura la peroxidació lipídica mitjançant la formació de malodialdehid es troba un augment significatiu solament per sobre de concentracions 1 mM de MPP⁺. En aquestes concentracions es perd l'efecte selectiu de la DA sobre les terminacions dopaminèrgiques, el que es pot determinar per la mesura de l'activitat glutamina sintetasa (GS), d'origen especialment glial. Disminuint la formació de radicals lliures, per exemple amb un quelant de radicals com és el DMSO, es redueix l'efecte inespecífic (activitat GS) però no es redueix la pèrdua de DA ni de tirosina hidroxilasa (TH). A més a més, amb DMSO i amb salicilat també es protegeix l'efecte del MPP⁺ com a inhibidor de la MAO (producció de DOPAC), que pot ser doncs atribuible a una modificació enzimàtica mediada pels radicals lliures.

Diferents inhibidors de la NOS, més o menys específics per a la nNOS, com el 7-Nitroindazol (7-NI, NO-Arg, NAME) bloquejen l'efecte depletor del MPP⁺ a les concentracions més baixes (2-5 μ M), l'atenuen a 10 μ M i ja no tenen efecte a 25 μ M. Sembla doncs que la producció de NO té un paper amplificador en l'efecte del MPP⁺, que a concentracions molt baixes, afavoreix l'alliberament de DA sense mediar una producció de radicals lliures quantificable. Els inhibidors de la nNOS no atenuaven els efectes provocats per l'inhibició mitocondrial amb rotenona, usada en els slices per reproduir una depleció de DA similar a la del MPP⁺ a dosis baixes. Aquest era ja un primer indici de que el mitocondri no intervenia en la toxicitat del MPP⁺ a les concentracions que ja eren suficients per depletar la DA.

Les concentracions 5-10 µM de MPP⁺ resultaven particularment interessants ja que eren les que es podia esperar que s'assolissin en el cervell d'animals (ratolins C-57) tractats amb dosis de MPTP suficients per depletar la DA cerebral (30 mg/Kg i.p. en Przedborki, 1996). Per aconseguir concentracions cerebrals superiors, els animals s'haurien de tractar amb dosis més elevades que reduirien molt la seva supervivència. Era doncs important establir si veritablement en aquestes concentracions el MPTP/MPP+ podia estar alterant l'activitat mitocondrial. Restringint cada cop més el camp d'actuació del MPP⁺ varem estudiar el seu efecte directament sobre els mitocondris aïllats de fetge de rata. El paràmetre inicialment estudiat per valorar l'activitat mitocondrial va ser la capacitat de consumir oxigen per part d'aquests orgànuls en una càmera de Clark.

Els mitocondris obtinguts a partir del cervell o del fetge de rata mostren una sensibilitat semblant front al MPP⁺ (Vyas et al., 1986). A partir d'aquí es va continuar l'estudi amb mitocondris hepàtics per comoditat de procediment i perquè les suspensions eren més homogènies, ja que en les preparacions de mitocondris a partir de cervell resulta més difícil acabar de separar els mitocondris dels sinaptosomes.

La viabilitat dels mitocondris front a MPP⁺ es va detectar per citometria de flux, per calorimetria i per assaig amb MTT, compost que ens dona una mesura del potencial reductor i per tant de la capacitat d'utilitzar el NADH. Utilitzant succinat i ADP com a substrats energètics del mitocondri es va comprovar que una concentració de MPP⁺ 5 µM no era suficient per alterar l'activitat o la viabilitat mitocondrial. Es necessitava augmentar les concentracions de MPP⁺ fins a 1 mM per a tenir una disminució de l'activitat NADH-DH d'un 50%. És difícil saber quines concentracions de MPP⁺ es poden assolir a l'interior mitocondrial si la toxina és transportada cap a l'interior en mitocondris polaritzats actius (Liu et al., 1992). Caldria però que l'acumulació intramitocondrial fos de 200 vegades per arribar a explicar l'efecte de l'MPP⁺ per aquest camí.

En les terminacions dopaminèrgiques, poc o molt, hem de considerar que els mitocondris estaran també en contacte amb la dopamina, entre altres motius perquè la dopamina s'ha de metabolitzar en els mitocondris per acció de la MAO i no oblidem que a partir de la MAO es poden produir peròxid d'hidrogen i radicals lliures. Es va assajar per tant què li passava a un mitocondri posat en contacte amb una concentració de dopamina 70 µM. Aquesta és la concentració màxima tissular que es podria assolir en un nucli estriat si tota la dopamina es depletés. La concentració citosòlica al voltant d'un mitocondri seria en tal cas superior i difícil de precissar, però podria arribar a 1 mM. Per evitar els efectes addicionals de la MAO metabolitzant la DA es va afegir tranilcipromida (TCP) a les mostres d'estudi. Aquestes concentracions de DA no afectaven la viabilitat, el consum d'oxigen, la dissipació de calor ni l'activitat del complex I mitocondrial. En canvi, quan s'incubaven els mitocondris en presència de MPP⁺ i de DA a les concentracions esmentades (que per sí soles no feien res), la viabilitat i la dissipació de calor es reduien en aproximadament un 50%. A més a més varem comprovar que MPP⁺ més DA provocaven una inflor dels mitocondris (swelling mitocondrial) i una reducció significativa del potencial mitocondrial. L'efecte del MPP⁺ a concentracions baixes resultava doncs potenciat per la presència de dopamina. La dopamina podia tenir bona part de la culpa de la toxicitat del MPP⁺ i possiblement de la mateixa degeneració dopaminèrgica. Els efectes eren encara més marcats utilitzant dopamina deixada oxidar espontàniament, és a dir una barreja d'aminocroms, quinones i polímers de neuromelanina. La oxidació de la dopamina podia tenir un paper clau en la toxicitat del MPP⁺ malgrat que la formació de radicals lliures no augmentava significativament en les concentracions utilitzades.

La tendència de la dopamina a partir autooxidació espontània a pH fisiològic i la seva capacitat per a produir radicals lliures, quan no es troba dins les vesícules acídiques que normalment l'emmagatzemen dins els terminals dopaminèrgics, poden ser responsables de la neurodegeneració nigroestriatal de la PD (Barzilai, 2001; Barzilai, 2003). La toxicitat de la DA a concentracions fisiològiques ha estat demostrada tant en línies cel·lulars (Lai, 1997) i cultius primaris (MacLaughlin, 1998) com in vivo, en lesions intraestriatals (Filoux, 1993; Hattori 1998).

Buscant paral·lelismes fisiològics a la injecció de dopamina a la SN que encara no s'havia provat, pensàvem en l'ús de la levodopa pel tractament de la PD o les drogues d'abús tipus amfetamina que augmenten les concentracions extracel·lulars nigrals de DA en un 1.500% (Bustamente, 2002).

Nosaltres, treballant amb una sola dosi equimolar de dopamina o de 6-OHDA injectada directament a la SN de les rates, trobàvem que ambdues eren neurotòxiques a les tres setmanes de la injecció, però en distint grau, de manera que la depleció de DA estriatal (35-40%) i la pèrdua de cèl·lules TH+ nigrals (40% aprox.) provocada per la injecció de la DA era bastant menor que les corresponents alteracions induïdes per la de 6-OHDA, 93% i 90%. Aquesta diferencia era ja previsible a partir del resultat del test rotacional amb

apomorfina que sols era positiu en les rates tractades amb 6-OHDA. Així, no podíem considerar la lesió amb dopamina com un model de parkinsonisme però sí que podíem afirmar que la DA és un compost endogen potencialment perillós.

La concentració de DA administrada en aquests experiments era de 25 mM (com la que s'administra de 6-OHDA en el model animal clàssic de parkinsonisme de Ungerstedt, 1968). De entrada, tanta dopamina podia semblar poc fisiològica, donat que en la SNc dels mamífers s'estima en 0.01 mM i de 10-100 mM en el interior de les vesícules sinàptiques (Kopin, 1993). Però, segons els nostres càlculs, a 2 mm del punt de injecció, distancia a la que realment podem veure els efectes específics de qualsevol toxina administrada, la concentració de DA seria de 0,2 mM, molt més real. Hi ha autors que injecten DA 1M a l'estriat de les rates per mimetitzar les que se suposen que apareixen en situacions de isquemia/hipoxia.

Per una altra banda, la Dopamina intranigra feia aparèixer cèl·lules apoptòtiques una mica allunyades del punt de lesió, com ja havíem comprovat in vitro pel MPP⁺ (Gómez et al., 2001) i també estava descrit per la 6-OHDA (Liang et al., 2004) i per la pròpia DA (Junn et al., 2001). In vivo amb 6-OHDA intraestriatal també ho havíem descrit (Cutillas et al., 1999). En canvi desprès de l'administració de DA, la substancia nigra no mostrava cèl·lules reactives per GADD153. Aquesta proteïna, que sí vèiem augmentada en la lesió per 6-OHDA, es relaciona amb l'estrès del reticle endoplasmàtic lligat a un augment dels radicals lliures de l'oxigen (Conn et al., 2002) que seria coherent amb el mecanisme d'acció i el grau de lesió provocat per aquesta neurotoxina.

A pesar que distintes mutacions en el gen de la α -sinucleïna s'han relacionat amb les formes familiars de la PD i que aquesta proteïna polimeritzada és el principal component dels característics cossos de levy de la malaltia esporàdica, encara no està clara ni la seva funció fisiològica ni el seu paper en la patogènica de la malaltia. En animals tractats amb MPTP (Vila et al. 2000) i en el nostre laboratori, amb línies cel·lulars de neuroblastoma humà (Gómez et al., 2001) s'havia vist un increment de l'expressió de la proteïna. Després de la lesió puntual de la SN amb DA, nosaltres observàvem un augment transitori, no permanent, de la expressió de la α -sinucleïna en algunes neurones TH+ i sobre tot en fibres de la SN reticulata no reactives al immuno marcatge amb TH, que interpretàvem com una resposta a l'agressió cel·lular (Sidhu et al. 2004) més que la causa de la neurodegeneració dopaminèrgica. S'ha de dir que la part reticulada de la SN és pobre en transportadors de DA, però rep aferències de la part compacta, de manera que l'augment de la α -sinucleïna possiblement estaria mediat per receptors.

Per últim, incubant α -sinucleïna i DA in vitro, volíem apropar-nos al que succeiria en el medi intracel·lular si ambdues augmentaven, altres autors (Conway et al. 2001) descrivien la formació d'adductes després de varius dies de incubació, en el nostre cas, després de 12

hores de incubació, el que observàvem per western blot era l'aparició d'una banda que podia correspondre a un dímer de α -sinucleïna, quelcom més marcada amb la dopaminocrom que amb dopamina y que es prevenia si incubàvem amb l'antioxidant NAC. D'acord amb Norris et al., 2005, nosaltres suggeríem que la DA oxidada podia catalitzar la dimerització de la α -sinucleïna, el que interrompria la seva normal polimerització com mecanisme protector front a l'agressió.

Amb la lesió estereotàctica unilateral de l'estriat de la rata amb 6-OHDA s'aconsegueix reproduir els següents trets anatomopatològics de la PD:

- 1) La pèrdua local de terminals dopaminèrgiques.
- 2) La disminució de la DA, DOPAC i HVA a l'estriat lesionat i a la SN ipsilateral.
- 3) L'afectació tissular, retrògrada dels nuclis accumbens, SNc i VTA ipsilaterals i lleugerament, la SNc i VTA contralaterals a l'estriat lesionat, observat per autorradiografia.
- 4) La reducció moderada de receptors dopaminèrgics D1 (postsinàptics) a la zona medial de l'estriat lesionat i a la SNc corresponent i l'augment compensador dels receptors dopaminèrgics D₂ (pre i postsinàptics) a la regió lateral de l'estriat lesionat (Cadet et al., 1992).
- 5) Degeneració de cossos neuronals en la SNc, observada per microscòpia electrònica i immunocitoquímiques, permanent quan la lesió és extensa (>95%).
- 6) Resposta inflamatòria amb activació de la micròglia al llarg de la via nigroestriatal i detectable a SNc, fins i tot abans que la màxima degeneració assoleixi els cossos neuronals de la mateixa, al voltant de la 4^a setmana postadministració de la toxina, (Armentero et al., 2006).
- 7) Canvis metabòlics dels GB ipsilaterals a la lesió, mesurats per l'activitat de la citocrom oxidasa mitocondrial com a marcador de l'activitat metabolica neuronal que es concreta a les 4 setmanes de la lesió en un augment d'activitat al GP, nucli entopeduncular, SNr i STN. (Blandini, 2008).

Quan als efectes del MPP⁺ són múltiples i molt depenents de les concentracions utilitzades, com varem publicar en una revisió a Current Trends Neurochem. (1997):

- A concentracions suficientment baixes (2-5 μ M) el MPP⁺ estimula l'alliberament de DA sense afectar l'activitat mitocondrial, possiblement afectant l'estructura citoesquelètica o les proteïnes sinàptiques, en un procés que necessita nNOS.
- L'alliberament de dopamina pot proporcionar la suficient dopamina lliure en el citosol per incrementar l'efecte del MPP⁺ i revertir en dany mitocondrial.
- A concentracions superiors a 25 μ M el MPP⁺ no requereix nNOS i possiblement s'acumula suficientment en el mitocondri com per reduir l'activitat NADH-DH.

 - A concentracions superiors a 1 mM l'acció del MPP⁺ és poc selectiva: es produeixen radicals lliures, el mateix MPP⁺ pot ser la font d'un cicle que produeix MPP. I en resulten afectades tota una sèrie d'activitats enzimàtiques tant en la neurona dopaminèrgica com fora d'ella.

Validesa dels models amb 6-OHDA i MPTP per assajar teràpies simptomàtiques

De cara al desenvolupament de teràpies noves, el model animal ideal ha de tenir la mateixa etiologia i patogènia que la malaltia humana que vol reproduir. Quan la causa de la malaltia humana és desconeguda o multifactorial com sembla ser la de la malaltia de Parkinson, si el tal model ens apropa a la comprensió dels processos que poden estar involucrats en la corresponent malaltia humana, es pot considerar rellevant i vàlid. De fet, molts dels abordatges in vitro, incubacions ex vivo de seccions de teixits, preparacions de sinaptosomes o cultius tissulars i cel·lulars, que tanta informació aporten al coneixement bioquímic, deixarien de fer-se si en ciència sols es treballés amb models homòlegs totalment rellevants, però massa escassos. (Heikkila, 1986).

Els assajos clínics amb drogues antiparkinsonianes en humans han d'anar precedits dels mateixos en models animals, però es dona la paradoxa que molts farmacs estudiats (inhibidors no selectius de la recaptació de monoamines, agonistes parcials dels receptors dopaminèrgics D_2 , antagonistes dels receptors de adenosina A2A, antagonistes α_{2A} adrenèrgics i agonistes de 5-HT_{1A} redueixen el dèficit motor i les discinèsies tardanes per L-dopa en els model animals i en canvi en el humà han produït una millora funcional molt limitada o nul·la i molts efectes col·laterals, en alguns casos empitjorant la simptomatologia i les discinèsies motores (Linazasoro, 2004). Problemes amb la biodisponibilitat, la tolerància o la manca de especificitat han estat raons esgrimides per justificar aquests errors, però és probable que les diferències que es donen entre els models i la malaltia puguin, en part, ser-ne responsables.

Els aspectes més problemàtics dels models neurotòxics de la malaltia de Parkinson són:

- El perfil temporal o cronològic. En la PD hi ha un deterior crònic, lent i progressiu del sistema dopaminèrgic amb mecanismes compensadors des del inici clínic (60% de dèficit DA) fins les etapes finals (dèficit DA del 90%), els models neurotòxics, en canvi, reprodueixen les etapes finals de forma aguda, estàtica, no compensada i permanent a partir de la segona setmana post lesió, en el cas de la 6-OHDA i després d'uns pocs dies en el model de MPTP. Per aconseguir quadres més restrictius o més graduals són necessaris distints règims de intoxicació.
- 2) Els models animals neurotòxics recreen una lesió dopaminèrgica molt selectiva men-

tre que l'afectació neuropatològica de la malaltia humana és més heterogènia amb altres dèficits monoaminèrgics a nivell estriatal, com el de serotonina per pèrdua neuronal en el nucli dorsal del Rafe i el de noradrenalina per neurodegeneració del locus coeruleus. L'afectació d'aquests sistemes per les neurotoxines és molt variable. En canvi en la PD, la seva alteració podria cronològicament precedir la dels nuclis mesencefàlics responsables dels símptomes motors característics (Braak et al., 2002; Pan-Montoj et al, 2010)

- 3) La manca de reproductibilitat dels LB, que són la marca anatomopatológica característica de la PD, és un altre inconvenient. Ni la 6-OHDA, ni l'MPP⁺ en rosegador, ni el de MPTP en mico indueixen l'aparició de LB, tot i que en aquest últim hi ha una certa acumulació de α-sin sense morfologia dels LB, en els animals vells. La diferència d'edat entre els afectats per la PD i l'edat dels animals d'experimentació pot ser la responsable. Els animals emprats solen ser adults joves, per facilitar l'estabulació, la cura i la supervivència, sobre tot si les lesions són completes i molt limitants.
- 4) La recuperació progressiva de l'activitat motora en els animals amb lesions neurotòxiques parcials és un altre inconvenient de cara a determinar l'efectivitat dels fàrmacs per revertir la pèrdua funcional.
- 5) La dificultat en reproduir alguns signes motors com la tremolor i els dèficits cognitius i psiquiàtrics com la depressió o l'alteració de la son.
- 6) La dificultat en reproduir i caracteritzar les complicacions motores (discinèsies) degudes al tractament crònic amb L-DOPA, sobre tot en el model 6-OHDA en rata són altres inconvenients que s'han de tenir en compta a l'hora de (Lane and Dunnet, 2008).

Conclusions

1. L'administració intranigra d'un volum de 3 μ l de 6-OHDA (21 μ g) o MPP⁺ (9 μ g) provoca una lesió de forma més o menys específica que abasta unes 3/4 part de la SN.

La rotació assoleix els nivells acceptables (40 girs en 10 min) quan la destrucció de les neurones amb 6-OHDA supera el 50 % (amb pèrdua de DA estriatal superior al 70 %). La destrucció inferior al 50 % no repercuteix en rotació acceptable pel test rotacional.

La lesió amb MPP⁺ produeix una lesió d'abast semblant però menys selectiva, ja que les rates responen només al test amb amfetamina.

El temps mínim per a evidenciar l'efecte de la 6-OHDA és de 14 dies, però no hi ha recuperació estriatal.

L'efecte de l'MPP⁺ s'observa ja als 7 dies, a partir dels quals s'observa una lleugera recuperació estriatal.

2. Les lesions en el nucli estriat amb 32 μ g/4 μ l de 6-OHDA ó 12 μ g/4 μ l de MPP⁺ repercuteixen al cap d'unes dues setmanes en la SN, en una regió topològicament corresponent a la part central d'aquest nucli. La lesió amb 6-OHDA és força selectiva a la SN (no així a l'estriat) i avança gradualment fins a un 50% de pèrdua neuronal. En el cas de les lesions estriatals amb MPP⁺, la reducció de neurones nigrals tot just era significativa i la lesió estriatal molt poc selectiva.

Per microdiàlisi també es va demostrar una major selectivitat de la 6-OHDA i una recuperació en el cas del MPP^{+.}

3. L'aplicació de MPP⁺ per cànules de microdiàlisi va resultar un bon procediment per depletar de forma immediata i dràstica el contingut de dopamina estriatal, resultant aquesta resposta proporcional al nombre de terminacions supervivents i podent-se relacionar doncs amb el grau de lesió.

4. Les cèl·lules CFM extretes d'embrions E14 són fiables durant unes 4h en condicions òptimes. La seva supervivència al cap de 7 dies en el nucli estriat (tant lesionat amb 6-OHDA com MPP⁺) és mínima (1-2%) però augmenta fins a un 10-20% quan són tractades amb factors tròfics del tipus NT3, GDNF i BMP-2. La implantació cel·lular va sempre acompanyada d'una reacció immunitària amb infiltració de macròfags i una important reacció astrocitària.

El GDNF va ser el factor més efectiu en estimular la plasticitat neuronal.

5. La degeneració retrògrada de les neurones dopaminèrgiques condueix a una lenta i progressiva degeneració de la SN per activació de caspases i conseqüent apoptosi, procés que es pot reduir amb inhibidors no selectius de caspases.

6. La lesió menys selectiva del MPP⁺ a l'estriat provoca a nivell immunològic perifèric un augment lleuger però significatiu del marcador limfocitari CD4CD25, indicant una implicació de l'eix neuro-endocrí-immunològic en la patologia.

7. L'MPP⁺ en contacte amb el teixit estriatal te un efecte depletor de DA per sobre de concentracions de 2 μ M. L'especificitat sobre les neurones dopaminèrgiques es manifesta fins a unes concentracions de 0,1 mM. A concentracions de 1 mM perd especificitat sobre els cossos neuronals (GABA) i astròcits (GS) i es manifesta un augment de ROS. En canvi, per sota de 25 μ M ja hi ha una producció de NO que contribueix a la lesió.

8. L'activitat mitocondrial no s'afecta seriosament fins a concentracions de MPP⁺ de aproximadament 1mM, és a dir que el MPP⁺ s'ha d'arribar a concentrar en el mitocondri a aquestes concentracions per exercir la seva inhibició sobre el complex mitocondrial NADH-DH. És doncs un mal inhibidor d'aquesta activitat. Tot i el sistema de transport actiu demostrat quan el mitocondri és funcional, s'ha de tenir en compte que aquestes són concentracions difícils d'assolir in vivo amb els tractaments perifèrics habituals amb MPTP (30 mg/Kg i.p. en ratolí).

9. La presència de DA i especialment de DA oxidada (aminocrom, dopaquinona) tendeix a augmentar la toxicitat del MPP⁺ quan tots dos s'utilitzen a dosis subtòxiques: es disminueix el potencial mitocondrial, es redueix el consum d'oxigen, el poder reductor i la dissipació de calor per part del mitocondri. La DA mateixa pot jugar un paper en la degeneració dopaminèrgica.

10. La DA introduïda en la SN amb una dosi equimolar a la de 6-OHDA produeix una lesió mesurable en l'estriat, amb una pèrdua de DA d'un 40-60%, insuficient per respondre al test rotacional.

Aquesta lesió va acompanyada de paràmetres d'autofàgia i d'un increment de la α-sinucleïna en neurones dopaminèrgiques i no dopaminèrgiques.

11. La incubació de α -sinucleïna purificada amb DA marcada fa aparèixer una banda estable corresponent a un pes doble del de la α -sinucleïna, que es pot relacionar amb la formació del dímer estabilitzat per un pont de Tyr desencadenant de l'agregació anòmala de α -sinucleïna en les sinucleïnopaties. Conclusions
Capítol 5: Bibliografia, annexes i altres publicacions

- Abou-Sleiman PM, Muqit MMK. and Wood W. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. Nature Rev. Neurosc. 2006; 7: 207-219.
- Acadèmia de Ciències Mèdiques de Catalunya i Balears. Índex farmacològic. 5ª edició, Barcelona: 2000: 100.
- Adams JD, Klaidman LK, Leung AC. MPP+ and MPDP⁺ induced oxygen radical formation with mitochondrial enzimes. Free Rad. Biol. Med. 1993; 15: 181-186.
- Adell A. and Artigas F. Effects of clomipramine on extracellular serotonin in the rat frontal cortex. Adv. Exp. Med. Biol. 1991; 294: 451-454.
- Ahlskog JE. Challenging conventional wisdom: the etiologic role of dopamine oxidative stress in Parkinson's disease. Mov. Dis. 2005; 20: 271–282.
- Algeri S, Ambrosio S, Garofalo P, Gerli P. Peripheral effects of 1-Methyl-4-phenyl-1-,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and its main metabolite 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) in the rat. Eur. J. Pharmacol. **1987**; 141: 309-312.
- Ambani LM, Van Woert MH, Murphy S. Brain peroxidase and catalase in Parkinson disease. Arch. Neurol. 1975; 32(2): 114-8.
- Ambrosio S, Gerli P, Perego C. and Algeri S. Different toxicity of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine (MPTP) on the nigrostriatal and mesolimbic pathways. Eur. J. Pharmacol. 1987; 133: 239-241.
- Ambrosio S, Espino A, Cutillas B, Bartrons R. MPP⁺ toxicity in rat striatal slices: relationship between non-selective effects and free radical production. Neurochem. Res. 1996; 21: 73-78.
- Andressoo JO, Saarma M. Signalling mechanisms underlying development and maintenance of dopamine neurons. Curr. Op. Neurobiol. 2008; 18: 297–306.

- Arai N, Misugi K, Goshima Y, Misu Y. Evaluation of a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6tetrahydropyridine (MPTP)-treated C57 black mouse model for parkinsonism. Brain Res. 1990; 515: 57-63.
- Arai R, Horiike K. And Hasegawa Y. Dopamine-degrading activity of monoamine oxidase is not detected by histochemistry in neurons in the substantia nigra pars compacta of the rat. Brain Res. 1998; 812: 275- 278.
- Arenas E. Stem cells in the treatment of Parkinson's disease. Brain Res. Bull. 2002; 57: 795–808.
- Armentero MT, Levandis G, Nappi G, Bazzini E, Blandini F. Peripheral inflammation and neuroprotection: systemic pretreatment with complete Freund's adjuvant reduces 6-hydroxydopamine toxicity in a rodent model of Parkinson's disease. Neurobiol. Dis. 2006; 24: 492-505.
- Aroca P, Solano F, Garcia-Borrón JC. and Lozano JA. A new spectrophotometric assay for dopachrome tautomerase. J. Biochem. Biophys Methods. 1990; 21: 35-46.
- Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, Ogawa N. Quinone formation as dopaminergic neuron-specific oxidative stress in the pathogenesis of sporadic Parkinson's disease and neurotoxin-induced parkinsonism. Acta Med. Okayama. 2004; 58: 221-233.
- Au WL, Adams JR, Troiano AR, Stoessl AJ. Parkinson's disease: in vivo assessment of disease progression using positron emission tomography. Mol. Brain Res. 2005; 134: 24-33.
- Bannon MJ. The dopamine transporter: role in neurotoxicity and human disease. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2005; 204: 355-360.
- Barone P. Neurotransmission in Parkinson's disease: beyond dopamine. Eur. J. Neurol. 2010; 17: 364–376.
- Barzilai A, Melamed E, Shirvan A. Is there a rationale for neuroprotection against dopamine toxicity in Parkinson's disease? Cell Mol. Neurobiol. 2001; 21: 215-235.
- Barzilai A, Daily D, Zilkha-Falb R, Ziv I, Offen D, Melamed E, Shirvan A. The molecular mechanisms of dopamine toxicity. Adv. Neurol. 2003; 91: 73-82

- Bas J, Calopa M, Mestre M, Molleví DG, Cutillas B, Ambrosio S, Buendia E. Lymphocyte populations in Parkinson's disease and in rat models of parkinsonism. J. Neuroimmunol. 2001; 113(1): 146-152.
- Beal MF. Experimental models of Parkinson's disease. Nature Rev. Neurosci. 2001; 2: 325-334.
- Becker T, Becker G, Seufert J, Hofmann E, Lange KW, Naumann M. Parkinson's disease and depression: evidence for an alteration of the basal limbic system detected by transcranial sonography. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 1997; 63: 590-596.
- Ben-Jonathan N. and Hnasko R. Dopamine as a Prolactin (PRL) inhibitor. Endocrine Rev. 2001; 22(6): 724-763
- Benabid AL, Pollak P, Louveau A, Henry S and de Rougemont J. Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. Appl Neurophysiol. 1987; 50: 344-346.
- Benito-León J, Bermejo-Pareja F, Morales-González JM, Porta-Etessam J,Trincado R, Vega S, Louis ED. Neurological Disorders in Central Spain (NEDICES)Study Group. Incidence of Parkinson disease and parkinsonism in three elderly populations of central Spain. Neurology. 2004; 62: 734-41
- BenMoyal-Segal L, Soreq H. Gene–environment interactions in sporadic Parkinson's disease. J. Neurochem. 2006; 97: 1740–1755.
- Bennet DA, Beckett LA, Murray AM, Shannon KM, Goetz CG, Pilgrim DM, and Evans DA. Prevalence of parkinsonian signs and associated mortality in a community population of older people. N. Engl. J. Med. 1996; 334:71-76.
- Ben-Shachar D., Zuk R., Glinka Y. Dopamine neurotoxicity: inhibition of mitochondrial respiration. J. Neurochem.1995; 64: 718-723.
- Benveniste H. and Hüttemeier P. Microdialysis Theory and application. Prog. Neurobiol. 1990; 35: 195-215.
- Berg D, Youdim MBH, Riederer P. Redox imbalance. Cell Tissue Res. 2004; 318: 201–213.

- Bertler A, Rosengren E. Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues. Experientia 1959; 15: 10-11.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. Nature Neurosci. 2000; 3:1 301-1306.
- Birkmayer W, Hornykiewicz O. Der L- Dioxyphenylalanin effect bei der Parkinson Akinese. Wien Klin. Wschr. 1961; 73: 787-788.
- Björklund A. and Lindvall O. Dopamine-containing systems in the CNS, A Björklund, T Hökfelt, Editors , Handbook of Chemical Neuroanatomy, Elsevier, Amsterdam. 1984. 55-122.
- Bjorklund A. and Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. Nat. Neurosci. 2000; 3: 537-544
- Blandini F, Armentero MT, Martignoni E. The 6-hydroxydopamine model: News from the past. Parkinsonism. Relat. D. 2008; 14: S124-S129.
- Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. Progr. Neurobiol. 2000; 62: 63-88.
- Blesa J, Juri C, Collantes M, Peñuelas I, Prieto E, Iglesias E, Martí-Climent J, Arbizu J, Zubieta JL, Rodríguez-Oroz MC, García-García D, Richter JA, Cavada C, Obeso JA. Progression of dopaminergic depletion in a model of MPTP-induced Parkinsonism in non-human primates. An 18F-DOPA and 11C-DTBZ PET study. Neurobiol. Dis. 2010; 38: 456–463.
- Bloom FE. Overview: A personal view of the dopamine neuron in historical perspective. En: Iversen L, Iversen D, Dunnet SB and Björklund A. editors. Dopamine handbook. Oxford: 2010. p. 3-7.
- Bogerts B, Hantsch J, Herzer M. A morphometric study of the dopamine-containing cell groups in the mesencephalon of normals, Parkinson patients, and schyzophrenics. Biol. Psychiat. 1983; 18(9): 951-969.

- Borta A, Höglinger GU. Dopamine and adult neurogenesis. J. Neurochem. 2007; 100: 587-595.
- Böttcher H., Fürst P. Direct microcalorimetry as a technique in cell cultures. Baillieres Clin. Endocrinol. Metab. 1997;11: 739-752.
- Bourne JT., Raynor W., Verrier Jones J. Studies of mononuclear phagocyte function in the rat. I. Saturation and recovery following intravenous administration of soluble human serum albumin (HSA)-anti-HSA complexes. Clin. Exp. Immunol. 1983; 51: 69-76.
- Bourne JA. Handbook of immunoperoxidase staining methods. En Immunochemistry laboratory Dako Corporation editors. 1983; Barcelona: Atom S.A.
- Bove J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Toxin-Induced Models of Parkinson's Disease. NeuroRx. 2005; 2: 484-494.
- Boyce S, Kelly E, Reavill C, Jenner P and Marsden CD. Repeated administration of Nmethyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine to rats is not toxic to striatal dopamine neurones. Biochem. Pharmacol. 1984; 33: 1747-52.
- Bradbury AJ, Costall B, Domeney AM, Jenner P, Kelly ME. Marsden CD, Naylor RJ. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine is neurotoxic to the nigrostriatal dopamine pathway. Nature 1986; 319: 56-57.
- Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN and Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. Neurobiol Aging. 2003; 24(2): 197-211.
- Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jakobowitz DM and Kopin IJ. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Proc. Nath. Acad. Sci. USA. 1983; 80: 4546-4550.
- Bustamante D, You Z.B, Castel MN, Johansson S, Goiny M, Terenius L, HÖkfelt T, Herrera- Marschitz M. Effect of single and repeated methanphetamine treatment on neurotransmitter release in substantia nigra and neostriatum of the rat. J. Neurochem. 2002; 83: 645-654.

- Cadet JL, Zhu SM and Angulo JA. Quantitative in situ hybridization evience for differential regulation of proenkephalin and dopamine D2 receptor mRNA levels in the rat striatum: Effect of unilateral intrastriatal injections of 6-hydroxy-dopamine. Mol. Brain Res. 1992; 12: 59-67.
- Calne DB, Lanstong JW, Martin WRW, Stoessl AJ, Ruth TJ, Adam MJ, Pate BD, Schulzer M. Positron emission tomography after MPTP: observations relating to the cause of Parkinson's disease. Nature. 1985; 246: 246-248.
- *Candy JM, Perry RH, Perry EK, Irving D, Blessed G, Fairbairn AF et al.* Pathological changes in the nucleus of Meynert in Alzheimer's and Parkinso's diseases. J. Neurological Sciences. 1983; 59 : 277-289.
- Carlsson A, Lindquist M, Magnusson T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. Nature. 1957; 180: 1200.
- Carlsson A, Lindquist M, Magnusson T, Waldeck B. On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. Science. 1958; 127: 471.
- Caudle WM, Colebrooke RE, Emson PC, Miller GW. Altered vesicular dopamine storage in Parkinson's disease: a premature demise. Trends Neurosci. 2008; 31: 303-308.
- Chefer VI, Thompson AC, Zapata A. and Shippenberg TS. Overview of Brain Microdialysis. Curr. Protoc. Neurosci. 2009; 47: 7.1.1-7.1.28.
- Chen H, Zhang SM, Hernan MA, Schwarzschild MA, Willett WC, Colditz GA, Speizer FE. and Ascherio A, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. Arch. Neurol. 2003; 60: 1059–1064.
- Chiba K, Trevor A, Castagnoli N Jr. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. Biochem. Bioph. Res Co. 1984; 120: 574-578.
- Chiueh CC, Markey SP, Burns RS, Johannessen JN, Pert A, Kopin IJ. Neurochemical and behavioral effects of systemic and intranigral administration of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the rat. Eur J Pharmacol. 1984; 100: 189-194.
- Chiueh CC, Mikaye H, Peng MT. Role of dopamine autoxidation, hydroxyl radical ge-

neration and calcium overload in underlying mechanism involved in MPTP-induced parkinsonism. En: Narabayashi H, Nagatsu T, Yanogisawa N, Mizuno Y, editors. Advances in Neurology. Parkinson's disease: from Basic research to Treatment. New York: Raven Press, 1993. p. 251-258.

- Chinta SJ, Andersen JK. Dopaminergic neurons. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2005; 37: 942–946.
- Chinta SJ, Andersen JK. Redox imbalance in Parkinson's disease. Biochim. Biophys. Acta 2008; 1780 (11): 1362–1367.
- Cho J, Kholodilov NG, Burke RE. The developmental time course of glial cell linederived neurotrophic factor (GDNF) and GDNF receptor alpha-1 mRNA expression in the striatum and substantia nigra. Ann NY Acad. Sci. 2003; 991: 2284-287.
- Chung KKK, Dawson VL, Dawson TM. New insights into Parkinson's disease. J. Neurol. 2003; 250 (supl.3): 15–24.
- Clarke PGH. Neuronal death in the development of the vertebrate nervous system. Trends Neurosci. 1985; 8: 345-349.
- Clarkson ED, Zawada WM, Freed CR. GDNF improves survival and reduces apoptosis in human embryonic dopaminèrgic neurons in vitro. Cell Tissue Res. 1997; 289: 207-210.
- Cohen G., Heikkila RE. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents.J. Biol. Chem. 1974; 249: 2447-2452.
- Cohen G, Farooqui R. and Kesler N. Parkinson disease: a new link between monoamine oxidase and mitochondrial electron flow. Proc Natl. Acad. Sci. USA. 1997; 94: 4890-4894.
- Colosimo C, Granata R, Del Zompo M, Piccardi MP, Perretta G, and Albanese A. Chronic administration of MPTP to monkeys: behavioural morphological and biochemical correlates. Neurochem. Int. 1992; 20: 279S-285S.

- Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, Landsbury PT Jr. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both α-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implication for pathogenesis and therapy. Proc. Natl. Acad. Sci, USA 2000; 97: 571-576.
- Conway KA, Rochet JC, Bieganski RM, Landsbury PT. Kinetic stabilization of the α -synuclein protofibril by a dopamine- α -synuclein adduct. Science. 2001; 294: 1346-1349.
- Coon KJ, Gao WW, Ullman MD, McKeon-O'Malley C, Eisenhauer PB, Fine RE, Wells JM. Specific up-regulation of GADD153/CHOP in 1-methy-4-phenylpyridinium-treated SH-SY5Y cells. J. Neurosci. Res. 2001; 68: 755-760
- Cookson MR, Van der Brug M. Cell systems and the toxic mechanism(s) of -synuclein. Exp. Neurol. 2008; 209: 5–11.
- Cotzias GC, Papavasiliou PS, Fehling S. Modification of parkinsonism: chronic treatment with L-DOPA. N. England. J. Med. 1969; 280: 337-345.
- Cummings JL. Depression and Parkinson's disease: a review. Ann J Psychiatry 1992; 149: 443-454.
- Dagher A, Robbins TW. Personality, addiction, dopamine: insights from Parkinson's disease. Neuron. 2009; 61: 502-510.
- Dalstrom A. and Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. Acta Physiol Scand. 1964; 62 (supl 232): 1-55.
- D'Amato RJ, Lipman ZP, Snyder SH. Selectivity of the parkinsonian neurotoxin MPTP: toxic metabolite MPP+ binds to neuromelanin. Science. 1986; 231(4741):9 87-9.
- Davey GP, Tipton KF and Murphy MP. Uptake and accumulation of 1-methyl-4-phenylpyridinium by rat liver mitochondria measured using an ion –selective electrode. Biochem. J. 1992; 288: 439-443.
- Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. Psych. Res. 1979; 1: 249-254.

- Dawson TM, Dawson VL. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. Science. 2003; 302: 819-822.
- de Rijk MC, Tzourio C, Breteler MM, Dartigues JF, Amaducci L, Lopez-Pousa S, Manubens-Bertran JM, Alpérovitch A, Rocca WA. Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1997; 62(1):10-15.
- Dexter DT, Wells FR, Agid F, Agid Y, Lees AJ, Jenner P, Marsden CD. Increased nigral iron content in postmortem parkinsonian brain (letter). Lancet. 1987; 2: 1219-1220.
- Di Monte D, Sandy MS, Ekström G and Smith MT. Comparative studies on the mechanisms of paraquat and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) cytotoxicity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986; 137: 303-309.
- Di Monte DA, Lavasani M, Manning-Bog AB. Environmental factors in Parkinson's disease. NeuroToxicol. 2002; 23 (4-5): 487–502.
- Drucker-Colín R., Verdugo-Díaz L. Cell transplantation for Parkinson's disease: present status. Cell. Mol. Neurobiol. 2004; 24: 301-316.
- Dunnett SB. and Bjöklund A. Basic neural transplantation techniques. I. Dissociated cell suspension grafts of embryonic ventral mesencephalon in the adult rat brain.Brain Res. Protoc. 1997; 1(1): 91-99.
- Ebadi M, Sharma S, Shavali S, El Refaey H. Neuroprotective actions of selegiline. J. Neurosci. Res. 2002; 67(3): 285-289.
- Ehringer H, Hornykiewicz O. Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3- hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und irn verhalten beí Ekrankungen des extrapyramidalen Systems. Klin. Wschr. 1960; 38: 1236-1239.
- **Emborg ME.** Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. J. Neurosci. Meth. **200**4; 139: 121–143.
- Enz A, Hefti F, Frick W. Acute administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-

pyridine (MPTP) reduces dopamine and serotonin but accelerates norepinephrine metabolism in the rat brain. Effect of chronic pretreatment with MPTP. Eur. J. Pharmacol. **1984**; 101: 37-44.

- Eriksen JL, Wszolek Z, Petrucelli L. Molecular Pathogenesis of Parkinson Disease. Arch. Neurol. 2005; 62: 353-357.
- Espejo M, Ambrosio S, Llorens J, Cutillas B. Intrastriatal grafts of foetal mesencephalic cell suspensions in MPP+-lesioned rats: a microdialysis study in vivo. Neurochem. Res. 1998; 23: 1217-1223.
- Fahn S and Elton ER. Unified Parkinson's Disease Rating Scale In: Fahn S, Marsden CD, Calne D, Goldstein M, eds. Recent Developments in Parkinson's Disease. Florham Park, NJ: Macmillan Press; 1987:293-304.
- Fahn S. and The Parkinson Study Group. Does levodopa slow or hasten the rate of progression of Parkinson's disease? J. Neurol. 2005; 252 (4): IV/37–IV/42.
- Falck B, Hillarp NA, Thieme G. Torp A. Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. J. Histochem. Cytochem. 1962; 10 : 348-354.
- Fasano M, Bergamasco B, Lopiano L. Modifications of the iron–neuromelanin system in Parkinson's disease. J. Neurochem. 2006; 96: 909–916.
- Faucheux BA. Nillesse N. Damier P. Spik G. Mouatt-Prigent A. Pierce A. Leveugle B. Kubis N. Hauw JJ. Agid Y. Expression of lactoferrin receptors is increased in the mesencephalon of patients with Parkinson disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995; 92(21): 9603-7.
- Faull RL, Mehler WR. The cells of origin of nigrotectal nigrothalamic and nigrostriatal projections in the rat. Neuroscience. 1978; 3: 989-1002.
- Feany MB. and Bender WW. A Drosophila model of Parkinson's disease. Nature. 2000; 404: 394-298.
- Fedorow H, Tribl F, Halliday G, Gerlach M, Riederer P, Double KL. Neuromelanin in human dopamine neurons: Comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. Progr. Neurobiol. 2005; 75: 109–124.

- Ferré S, Fuxe K, Fredholm BB, Morelli M and Popoli P. Adenosine–dopamine receptor–receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. Trends in Neurosciences. 1997;20 (10): 482- 487.
- Filloux F, Townsend J. Pre- and post-synaptic neurotoxic effects of dopamine demonstrated by intrastriatal injections. Exp. Neurol. 1993; 119: 79-88.
- Fiszer U, Mix E, Fredrikson S, Kostulas V. and Link H. Parkinson's disease and immunological abnormalities: increase of HLA-DR expressions on monocytes in cerebrospinal fluid and of CD45RO+ T cells in peripheral blood. Acta Neurol. Scand. 1994; 90: 160-166.
- Fleming SM, Fernagut PO, Chesselet MF. Genetic Mouse Models of Parkinsonism: Strengths and Limitations. NeuroRx. 2005; 2: 495–503.
- Foix Ch. Les lésions anatomiques de la maladie de Parkinson. Revue Neurologique. Paris 1921; 28: 593-600.
- Ford B. Deep brain stimulation for Parkinson's disease. Parkinson's Disease Foundation. 2005. New York, NY 10018. Disponible a www.pdf.org/pdf/DBS2008.pdf
- Fournel S, Genestier L, Robinet E, Flacher M, Revillard JP. Human T cells require IL-2 but not GI/S transition to acquire susceptibility to Fas-mediated apoptosis. J. Immunol. 1996; 157: 4309-4315.
- Freed CR, Breeze RE, Rosenberg NL, Schneck SA, Kriek E, Qi JX, et al. Survival of implanted fetal dopamine and neurologic improvement 12 to 46 months after transplantation for Parkinson's disease. N. Engl. J. Med. 1992; 327: 1549-1555.
- Freed CR, Green PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Dillon S, et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. N. Engl. J. Med. 2001; 344: 710-719.
- **Fuller RW**, **Steranka LR**. Central and peripheral catecholamine depletion by 1-methyl-4phenyl-tetrahydropyridine (MPTP) in rodents. Life Sci. **1985**; 36: 243-247.
- Fuxe K, Dahlström A, Höistad M, Marcelino D, Jansson A, Rivera A. et al. From the Golgi-Cajal mapping to the transmitter-based characterization of the neuronal ne-

tworks leading to two modes of brain communication: wiring and volume transmission". Brain Res. Rev. 2007; 55 (1): 17-54.

- Gao HM, Liu B, Zhang W, Hong JS. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. Trends Pharmacol. Sci. 2003; 24: 395-401.
- Gao X, Chen H, Schwarzschild MA and Ascherio A. Use of ibuprofen and risk of Parkinson disease. Neurology. 2011; 76 (10) 863-869.
- García-Cabezas MA, Martínez-Sánchez P, Sánchez-González MA, Garzón M, Cavada C. Dopamine Innervation in the Thalamus: Monkey versus Rat. Cereb. Cortex. 2009; 19: 424-434.
- Garcia-Ruiz P, Fontan A. ¿Cómo se hace el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson en momentos precoces, Continua Neurológica. 2000; 3: 13-24.
- Gasser T, Wszolek ZK, Trofatter J, Ozelius L, Uitti RJ, Lee CS, Gusella J, Pfeiffer RF, Calne DB, Breakefield XO. Genetic linkage studies in autosomal dominant parkinsonism: evaluation of seven candidate genes. Ann. Neurol. 1994;36: 387-396.
- Gerfen CR. Basal ganglia en G. Paxinos, Editors. The Rat Nervous System, Elsevier Academic Press, Amsterdam. 2004: 445–508.
- Gerfen CR. Functional Neuroanatomy of Dopamine in the Striatum. En Iversen LL, Iversen SD, Dunnet SB and Björklung A, editors. Dopamine Handbook. Oxford. 2010. p. 11-21.
- Giasson BI, Lee VMY. A new link between pesticides and Parkinson's disease. Nature Neurosci. 2000; 3: 1227 1228.
- Giasson BI, Duda JE, Murray IVJ, Chen Q, Souza JM, Hurtig HI, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ, Lee VMY. Oxidative damage to neurodegeneration by selective α-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. Science. 2000; 290: 985-989.
- Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, et al. Direct brain infusion of glial cell derived-neurotrofic factor in Parkinson's disease. Nat. Med. 2003; 9: 589-595.

- Giménez-Xavier P, Gómez-Santos C, Castaño E, Francisco R, Boada J, Unzeta M, Sanz E, Ambrosio S. The decrease of NAD(P)H has a prominent role in dopamine toxicity. Biochem. Biophys. Acta (Mol. Bases Dis.). 2006; 1762: 564-574.
- Glick SD, Cox RD. Nocturnal rotation in normal rats: Correlation with amphetamineinduced rotation and effects of nigro-striatal lesions. Brain Res. 1978; 150: 149-161.
- Glick SD, Ross DA. Right-sided population bias and lateralization of activity in normal rats. Brain Res. 1981; 205: 222-225
- Glinka Y, Tipton KF, Youdim MBH. Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-hydroxydopamine. J. Neurochem. 1996; 66: 2004-2010.
- Glover V., Gibb C., Sandler M. The role of MAO in MPTP toxicity-a review. J. Neural. Transm. 1986; 20: 65-76.
- Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. Nat. Rev. Neurosci. 2001; 2 (7): 492–501.
- Golbe Li, Di Iorio G, Bonavita V, Miller DC, Duvoisin RC. A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease. Ann Neurol. 1990; 27(3): 276-282.
- Gomez C, Ferrer I, Reiriz J, Viñals F, Barrachina M, Ambrosio S. Low concentrations of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion induce caspase-mediated apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. Brain Res. 2001; 935: 32-39
- Good PF, Olanow CW, Hsu A, Gordon J. SOD-1 G86R transgenic mice have decreased striatal dopamine and a greater sensitivity to MPTP than control mice. Soc. Neurosci. 1997; 23: 1877 (Abstr.).
- Gorell JM, Ordidge RJ, Brown GG, Deniau JC, Buderer NM, Helpern JA. Increased iron-related MRI contrast in the substantia nigra in Parkinson's disease. Neurology. 1995; 45: 1138-1143.
- Goridis C and Rohrer H. Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. Nature Reviews Neuroscience. 2002; 3: 531-541.

- Guridi J. y Obeso JA. Nuevas perspectivas de la cirugia estereotàctica en la enfermedad de Parkinson. Neurocirugia. 1995; 6: 32-43.
- Guridi J, Rodriguez-Oroz MC y Manrique M. Tratamiento quirúrgico de la enfermedad de Parkinson. Neurocirugia. 2004; 15: 5-16.
- Grace AA. Physiology of the normal and dopamine-depleted basal ganglia: insights into levodopa pharmacotherapy. Mov. Dis. 2008; 23 (Suppl. 3): S560–S569.
- Grace AA and Bunney BS. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. J. Neurosci.1984; 4(11): 2877-2890.
- Graham DG. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. Mol. Pharmacol. 1978; 14: 633.
- Graham DG, Tiffany SM, Bell Jr WR and Gutknecht WF. Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. Mol. Pharmacol. 1978; 14: 644.
- Graumann R, Paris I, Martinez-Alvarado P, Rumanque P, Perez-Pastene C, Cardenas SP, Marin P, Diaz-Grez F, Caviedes R, Caviedes P, Segura-Aguilar J. Oxidation of dopamine to aminochrome as a mechanism for neurodegeneration of dopaminergic systems in Parkinson's disease. Possible neuroprotective role of DT-diaphorase. Pol. J. Pharmacol. 2002; 54: 573-579.
- Graybiel AM, Aosaki T, Flaherty AW. and Kimura M. The basal ganglia and adaptive motor control. Science. 1994; 265: 1826–1831.
- Graybiel AM. The bassal Ganglia. Current Biology. 2000; 10 (14): 509-511.
- Greenwood CE, Tatton WG, Seniuk NA and Biddle FG. Increased dopamine synthesis in aging substantia nigra neurons. Neurobiol. Aging. 1991; 12: 557-565.
- Gu M, Cooper JM, Taanmam JW and Schapira AH. Mitochondrial DNA transmission of the mitochondrial defect in Parkinson's disease. Ann. Neurol. 1998; 44: 177-186.

- Hallman H., Lange J., Olson L., Stromberg I and Jonsson G. Neurochemical and histochemical characterization of neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on brain catecholamine neurons in the mouse. J. Neurochem. 1985; 44: 117-127.
- Hartmann A, Hunot S, Hirsch EC. Inflammation and dopaminergic neuronal loss in Parkinson's disease: a complex matter. Exp. Neurol. 2003; 184: 561–564.
- Harvey BK, Wang Y, Hoffer BJ. Transgenic rodent models of Parkinson's disease. Acta Neurochir Suppl. 2008; 101: 89–92.
- Hattori N, Wanga M, Takab H, Fujimura T, Yoritaka A, Kuboa SI., Mochizukia H. Toxic effects of dopamine metabolism in Parkinson's disease. Parkins. Rel. Dis. 2009; 15 (1): \$35-\$38.
- Hattori A, Luo Y, Umegaki H, Muñoz J, Roth GS. Intrastriatal injection of dopamine results in DNA damage and apaptosis in rats. Neuroreport. 1998; 9: 2569-2572.
- Hawkes CH, Del Tredici K and Braak H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. Neuropath. Appl. Neuro. 2007; 33 (6): 599-614.
- Heikkila RE, Hess A. and Duvoisin RC. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mice. Science. 1984; 224: 1451-1453.
- Heikkila RE. Animal models of MPTP toxicity: A panel discusion. En: Markey SP, Castagnoli N, Trevor AJ. and Kopin I, editors. MPTP: A neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome. Academic Press. 1986. p. 9-21.
- Hernandez DG, Paisan-Ruiz C, McInerney-Leo A, Jain S, Meyer-Lindenberg A, Evans EW. et al. Clinical and positron emission tomography of parkinson's disease caused by LRRK2. Ann. Neurol. 2005; 57(3): 453-456.
- Hill MP, Hille CJ, Brotchie JM. Delta-opioid receptor agonists as a therapeutic approach in Parkinson's disease. Drug News Perspect. 2000;13(5): 261-8.
- Hyman SE. and Malenka RC. Addiction and the brain: The neurobiology of compulsion and its persistence. Nature Reviews Neuroscience. 2001; 2 : 695-703.

- Hirata Y, Nagatsu T. Early and late effects of systemically administered 1-methyl-4phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on tyrosine hydroxylase activity in vitro and on tyrosine hydroxylation in tissue slices of mouse striatum. Neurosci. Lett. 1986; 68: 245-248.
- Holman RB. Theoretical and practical aspects of high performance liquid chromatography. En: Holman RB, Cross AJ and Joseph MJ, editors. HPLC in neuroscience research. England: Wiley and Sons. 1993; 1.1, 3-12.
- Hornykiewicz O. Chemical neuroanatomy of the basal ganglia normal and in Parkinson's disease. J. Chem. Neuroanat. 2001; 22: 3–12.
- Hortelano S, Genaro AM. and Boscà L. Phorbol esters induce nitric oxide synthase and increase arginina influx in cultured peritoneal macrophages. FEBS lett. 1993; 320: 135-139.
- Houghton PJ, Howes MJ. Natural products and derivatives affecting neurotransmission relevant to Alzheimer's and Parkinson's disease. Neurosignals. 2005; 14: 6–22.
- Hughes AJ, Daniel SE, Blankson S. and Lees AJ. A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease. Arch Neurol. 1993; 50: 140-148.
- Huot P. and Parent A. Dopaminergic neurons intrinsic to the striatum. J. Neurochem. 2007; 101: 1441-1447.
- Hurley MJ. and Jenner P. What has been learnt from study of dopamine receptors in Parkinson's disease?. Pharmacology & Therapeutics. 2006; 111: 715-728.
- Hutchinson M and Raff U. Structural changes of the substantia nigra in Parkinson's disease as revealed by MR imaging. Am. J. Neuroradiol. 2000; 21: 697-701.
- Iacono RP, Shima F, Lonser RR, Kuniyoshi S, Maeda G and Yamada S. The results, indications, and physiology of posteroventral pallidotomy for patients with Parkinson's disease. Neurosurgery. 1995; 36: 1118-27.
- Jacobs H, Heberlein I, Vieregge A, Vieregge P. Personality traits in young patients with Parkinson's disease. Acta Neurol. Scand. 2001; 103: 82-87.

- Jakowec MW. and Petzinger GM. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned model of Parkinson's disease, with emphasis on mice and nonhuman primates. Comp Med. 2004; 54: 497-513.
- Jankovic J, Chen S, Le WD. The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease. Progr. Neurobiol. 2005; 77: 128–138.
- Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM and Snyder SH. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: Uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985; 82: 2173-2177.
- 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: 131-137.
- Jonsson G. Studies on the mechanisms of 6-hydroxydopamine cytotoxicity. Med. Biol.1976; 54(6): 406-420.
- Junn E, Mouradian MM. Apoptotic signaling in dopamine-induced cell death: the role of oxidative stress, p38 mitogen-activated protein kinase, cytochrome c and caspases. J. Neurochem. 2001; 78: 374-383.
- Juri C. and Chaná P. Levodopa en la enfermedad de Parkinson. ¿Qué hemos aprendido?. Rev Méd Chile. 2006; 134: 893-901
- Jurkowsky A. and Stacy M. Classification i Clinical features of movement disorders. En Mark Ledoux editors. Animal models of movement disorders. Elsevier Academic Press. 2005; A1: p. 1-2.
- Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Muller V, Jacobsen H et al. Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha-synuclein in human and transgenic mouse brain. J. Neurosci. 2000; 20: 6365-6373.
- Katzenschlager R, Evans A, Mason A, Patsalos PN, Ratnaraj N, Watt H. et al. Mucuna pruriens in Parkinson's disease: a double blind clinical and pharmacological study. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 2004; 75: 1672-1677.

- Kidd PM. Parkinson's disease as multifactorial oxidative neurodegeneration: implications for integrative management. Alt. Med. Rev. 2000; 5: 502-529.
- Kholodilov NG, Oo TF, Burke RE. Synuclein expression is decreased in substantia nigra following induction of apoptosis by intrastriatal 6-hydroxydopamine. Neusosci. Lett. 1999; 275: 105-108.
- Kholodilov NG, Yarygina O, Oo TF, Zhang H, Sulzer D, Dauer W, and Burke RE. Regulation of the development of mesencephalic dopaminergic systems by the selective expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in their targets. J. Neurosci. 2004; 24(12): 3136-3146.
- Kitai ST. Electrophysiology of the corpus striatum and brain stem integrating systems. En: Brooks VB, editors. Handbook of Physiology: The nervous system. II vol. 1. Washington DC: American Physiological Society. 1981: 997-1015.
- Kitamura Y, Shimohama S, Akaika A, Taniguchi T. The parkinsonian models: invertebrates to mammals. Jpn. J. Pharmacol. 2000; 84: 237-243.
- Klivenyi P, St Clair D, Wermer M, Yen HC, Oberley T, Yang L, Flint Beal M. Manganese superoxide dismutase overexpression attenuates MPTP toxicity. Neurobiol Dis 1998; 5: 253-258.
- Koller WC. How accurately can Parkinson's disease be diagnosed?. Neurology. 1992, 42: 6-16.
- Kopin IJ. Neurotransmitters and disorders of the basal ganglia. En: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB, editors. Basic Neurochemistry. Raven Press, New York. 1993. p.93
- Kostrzewa RM, Kostrzewa JP, Brus R. Neuroprotective and neurotoxic roles of levodopa (L-DOPA) in neurodegenerative disorders relating to Parkinson's disease. Amino Acids 2002; 23: 57–63.
- Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Gaeber M, Kösel S, Przuntek H, Epplen JT, Schöls L and Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. Nat Genet.1998; 18:106-108.

- Lai CT, Yu PH. Dopamine and 1-β-3,4-dihydroxyphenylalanine hydrochloride (l-dopa)induced cytotoxicity towards catecholaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. Biochem. Pharmacol. 1997; 53: 363-372.
- Lane E and Dunnett S. Animal models of Parkinson's disease and L-dopa induced dyskinesia: How close are we to the clinic? Psychopharmacol. 2008; 199:303–312.
- Lang A.E. 2008 Advances in Brain Research. DANA foundation, (consultat el 20 novembre 2011) disponible en: http://www.dana.org/news/publications/detail.aspx?id=12236
- Lang AE, Obeso JA. Challenges in Parkinson's disease: restoration of the nigrostriatal dopamine system is not enough. Lancet Neurol. 2004; 3: 309–16.
- Lange ECV, Danhof M, deBoer AG, Breimer DD. Methodological considerations of intracerebral microdialysis in pharmacokinetic studies on drug transport across the blood-brain barrier. Brain Res. Rev. 1997; 25(1): 27-49.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW. and Irwin I. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine analog synthesis. Science. 1983; 219: 979-980.
- Langston JW, Forno LS, Rebert CS. and Irwin I. Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. Brain Res. 1984; 292: 390-394.
- Langston JW, Irwim I, Langston EB, Delanney LE and Ricaurte GA. MPTP-induced parkinsonism in humans: a review of the syndrome and observations relating to the phenomenon of tardive toxicity en MPTP: A neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome editat per Markey, Castagnoli, Trevor and Kopin en Academic Press. 1986; 9-21.
- 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 exposur. Ann Neurol . 1999; 46 (4): 598–605.
- Langston JW, Tanner CM. Selegiline and Parkinson's disease: it's déjà vu—again. Neurology. 2000; 55: 1770–1771.

- Lawrence AD, Evans AH, Lees AJ. Compulsive use of dopamine replacement therapy in Parkinson's disease: reward systems gone awry? Lancet Neurol. 2003; 2: 595–604.
- Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM and McKay RD. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. Nature Biotechnology. 2000; 18: 675-679.
- Lees AJ, Hardy J and Revesz T. Parkinson's disease. Lancet. 2009; 373: 2055–2066.
- Lennox BR and Lennox GG. Mind and movement: The Neuropsychiatry of movement disorders. J. Neurol. Neurosurg. Psych. 2002; 72: 128-131.
- Leong SL, Cappai R, Barnham KJ, Pham CLL. Modulation of α-synuclein aggregation by dopamine: a review. Neurochem. Res. 2009; 34: 1838–1846.
- Lewis SJG, Barker RA. Understanding the dopaminergic deficits in Parkinson's disease: Insights into disease heterogeneity. J. Clin. Neurosci. 2009; 16: 620–625.
- LeWitt PA. Levodopa for the Treatment of Parkinson's Disease. N. Engl. J. Med. 2008; 359: 2468-2476.
- Li JY, Christophersen NS, Hall V, Soulet D and Brundin P. Critical issues of clinical human embryonic stem cell therapy for brain repair. Trends Neurosci. 2007; 31: 146-153.
- Liang Q, Liou AK, Ding Y, Cao G, Xiao X, Perez RG, Chen J. 6-Hydroxydopamine induces dopaminergic cell degeneration caspase-9-mediated apoptotic pathway that is attenuated by caspase-9dn expression. J. Neurosci. Res. 2004; 77: 747-761.
- Lim SY, Fox SH and Lang AE. Overview of the extranigral aspects of Parkinson disease. Arch. Neurol. 2009; 66: 167-172.
- Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, Hoffmann D, Broussolle E, Perret JE and Benabid AL. Bilateral subthalamic nucleus stimulation for severe Parkinson's disease. Mov. Disord. 1995; 10: 672-674
- Lindvall O and Kokaia Z. Prospects of stem cell therapy for replacing dopamine neurons in Parkinson's disease. Trends Pharmacol. Sci. 2009; 30: 260-267.

- Lindvall O and Kokaia Z. Stem cells in human neurodegenerative disorders time for clinical translation? J. Clin. Invest. 2010; 120: 29-40.
- Liss B i Roeper J. Individual dopamine midbrain neurons: Functional diversity and flexibility in health and disease. Brain Res. Rev. 2008; 58: 314 321.
- Liss B i Roeper J. Ion Channels and Regulation of Dopamine Neuron Activity. En: Iversen LL, Iversen SD, Dunnet SB, Björklund A, editors. Dopamine Handbook. Oxford University Press, 2010; 3.4. p. 118-140.
- Liu B, Gao HM, Hong JS. Parkinson's Disease and Exposure to Infectious Agents and Pesticides and the Occurrence of Brain Injuries: Role of Neuroinflammation. Env. Health Persp. 2003; 111:1065–1073.
- Liu B and Hong JS. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegeneration. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2003; 304: 1-7.
- Liu Y, Roghani A. and Edwards RH. Gene transfer of a reserpine-sensitive mechanism of resistance to N-methyl-4-phenylpyridinium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992: 89(19): 9074-9078.
- Llorens J, Suñol C, Tusell JM. Microcomputer adaptation of the wheel-shape activity monitor: effects of lindane. Pharmacol Biochem Behav. 1990; 35: 1003-1006.
- Loewi O. Über humerole übertragbarkeit der herznervenwirkung. I. Mitteilung. Pflugers Arch. 1921; 189: 239- 242.
- López del Val LJ. y Navas Vinagre I. Objetivo: Dirigir la atención a la calidad de vida del paciente con enfermedad de Parkinson desde los primeros momentos. Continua neurológica. 2000; 3: 25-42.
- Luquin MR. Modelos experimentales de enfermedad de Parkinsion. Rev. Neurol. 2000; 31(1): 60-66.
- Luquin MR, Montoro RJ, Guillén J, Saldise L, Insausti R, Del Rio, J y cols. Recovery of chronic parkinsonian monkeys by autotransplants of carotid body cell aggregates into putamen. Neuron. 1999; 22: 743-750.

- Machado A, Herrera AJ, Venero JL, Santiago M, De Pablos RM, Villarán RF, Espinosa-Oliva AM, Argüelles S, Sarmiento M, Desgado-Cortés MJ, Mauriño R and Cano J. Inflamatory animal model for Parkinsons's disease: The intranigral injection of LPS induced the inflamatory processa long with the selective degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons. ISRN Neurology. 2011; vol 2011: 1-16.
- McGeer PL, Itagaki S, Boyes B and McGeer EG. Reactive microgila are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer disease brains. Neuro-logy. 1988; 38: 1285-1291.
- McGeer PL and McGeer EG. The inflamatory response system of the brain: implications for therapy of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. Brain Res. Rev. 1995; 21: 195-218.
- MacLaughlin BA, Nelson D, Erecinska M, Chesselet MF. Toxicity of dopamine to striatal neurons in vitro and potentiation of cell death by mitochondrial inhibitors. J. Neurochem. 1998; 70: 2406- 2415.
- McNaught KS, Jenner P. Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. Neusosci Lett. 2001; 297(3): 191-194.
- McNaught KS, Perl DP, Brownell AL. and Olanow CW. Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. Ann Neurol. 2004; 56: 149-162.
- Maguire-Zeissa KA, Shortb DW, Federoff HJ. Synuclein, dopamine and oxidative stress: co-conspirators in Parkinson's disease? Mol. Brain Res. 2005; 134: 18–23.
- Manfredsson FP, Lewin AS, Mandel RJ. RNA knockdown as a potential therapeutic strategy in Parkinson's disease. Gene Ther. 2006; 13: 517–524.
- 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: 333-342.
- Manzano A, Roig T, Bermúdez J. and Bartrons R. Effects of taxol on isolated rat hepatocyte metabolism. Am.J.Physiol. 1996; 271: C1957-C1962.

- Markey SP, Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS. and Herkenham MA. Intraneural generation of a piridinium metabolite may cause drug induced parkinsonism. Nature. 1984; 311: 464-467.
- Marsden CD. Parkinson's disease. Lancet. 1990; 335: 948-995.
- Matsubara K, Aoyama K, Suno M, Awaya T. N-methylation underlying Parkinson's disease. Neurotoxicol. Teratol. 2002; 24: 593–598.
- Mayeux R, Chen J, Mirabello E, Marder K, Bell K, Dooneief G, Stern Y. An estimate of de incidence of dementia in patients with idiopathic Parkinson's disease. Neurology. 1990; 40: 1513-1517.
- Meister A. Glutamine synthetase from mammalian tissues. Methods Enzymol. 1985; 113: 185-199.
- Meredith GE, Totterdell S, Potashkin JA, Surmeier DJ. Modeling PD pathogenesis in mice: Advantages of a chronic MPTP protocol. Parkins. Rel. Dis. 2008; 14: S112-S115.
- Merims D. and Giladi N. Dopamine dysregulation syndrome, addiction and behavioral changes in Parkinson's disease. Parkins. Rel. Dis. 2008; 14: 273-280.
- Micheli F and Scorticati MC. Convivir con la Enfermedad de Parkinson. 1ª ed. Madrid: Médica Panamericanna, S.A. 2000: 50-74.
- Mitchell IJ, Cross AJ, Sambrook MA.and Crossman AR. Sites of the neurotoxic action of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the macaque monkey include the ventral tecmental area and the locus coeruleus. Neurosci. Lett. **1985**, 61: 195-200.
- Miyazaki I. and Asanuma M. Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. Acta Med. Okayama 2008; 62: 141-150.
- Mogi M, Harada M, Kondo T, Riederer P, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T. Interleukin-1 beta, interleukin 6, epidermal growth factor and transforming growth factoralpha are elevated in the brain from Parkinson's patients. Neurosci. Lett. 1994; 180: 147-°150.

- Montagu KA. Catechol compounds in rat tissues and in brains of different animals. Nature. 1957; 80: 244-245.
- Moore RY. Organization of midbrain dopamine systems and the pathophysiology of Parkinson's disease. Parkins. Rel. Dis. 2003; 9: S65–S71.
- Morens DAM, Davis JW, Grandinetti A, Ross GW, Popper JS, White LR. Epidemiologic observations on Parkinson's disease: incidence and mortality in a prospective study of middle-aged men. Neurology. 1996; 46: 1044-1050.
- Muramutsu S, Tsukada H, Nakano I, Ozawa K. Gene therapy for Parkinson's disease using recombinant adeno-associated viral vectors. Expert Opin. Biol. Ther. 2005; 5: 663-671.
- Mytilineou C. and Cohen G. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine destroys dopamine neurons in explants of rat embryo mesencephalon. Science. 1984; 225: 529-531.
- Mytilineou C, Cohen G, Heikkila RE. 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) is toxic to mesencephalic dopamine neurons in culture. Neurosci. Lett. 1985, 57: 19-24.
- Mytilineou C, Radcliffe P, Leonardi EK, Werner P, Olanow C. L-deprenyl protects mesencephalic dopamine neurons from glutamate receptor-mediated toxicity in vitro. J. Neurochem. 1997; 68: 33–39.
- Nagatsu T and Sawada M. Biochemistry of postmortem brains in Parkinson's disease: historical ovrview and future prospects. J. Neural. Transm. Suppl. 2007; 72: 113-120.
- Naoi M, Maruyama W, Yi H, Inaba K, Akao Y, Shamoto-Nagai M. Mitochondria in neurodegenerative disorders: regulation of the redox state and death signaling leading to neuronal death and survival. J. Neural. Transm. 2009; 116:1371–1381.
- Nicklas WJ, Vyas I and Heikkila RE. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Life Sci. 1985; 36: 2503-2508.
- Nicklas WJ, Saporito MS, Basma A, Geller HM. and Heikkila RE. Mitochondrial mechanisms of neurotoxicity. Ann. N.Y. Acad Sci. 1992; 648:28-36.

- Norris EH, Giasson BI, Hodara R, Xu S, Trojanowski JQ, Ischiropoulos H, Lee VM. Reversible inhibition of α-synuclein fibrillization by dopaminochrome-mediated conformational alterations. J. Biol. Chem. 2005; 280: 21212-21219.
- Nunes I, Tovmasian LT, Silva RM, Burke RE, Goff SP. Pitx3 is required for development of substantia nigra dopaminergic neurons. Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100: 4245-4250.
- Offen D, Ziv I, Barzilai A, Gorodin S, Glater E, Hochman A. and Melamed E. Dopamine-melanin induces apoptosis in PC12 cells; possible implication for the etiology of Parkinson's disease.Neurochem. Int. 1997; 31: 207-216.
- Ogawa N, Hirose Y., Ohara S., Ono T. and Watanabe Y. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 1985, 50: 435-441.
- Olanow CW. A radical hypotesis for neurodegeneration. TINS. 1993; vol 16 (11): 439-443.
- Olanow CW and Tatton WG. Etiology and pathogenesis of parkinson's disease. Annu. Rev. Neurosc. 1999. 22:123-44.
- Olanow CW, Goetz Ch, Kordower J, Stoessl J, Sossi W, Brin M, et al. A double controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. Ann Neurol. 2003; 54: 403-414.
- Olanow CW. The Pathogenesis of Cell Death in Parkinson's Disease 2007. Mov. Dis. 2007; 22, Supl.17: S335–S342.
- Oo TF, Kholodilov NG. and Burke RE. Regulation of natural cell death in dopaminergic neurons of the substantia nigra by striatal GDNF in vivo. J. Neurosci. 2003; 23: 5141-5148.
- Orr CF, Rowe DB, Halliday GM. An inflammatory review of Parkinson's disease. Progr. Neurobiol. 2002; 68: 325–340.
- Ostrowski N. Liposome size measurements by photon correlation spectroscopy. Chem. Phys. Lipids. 1993; 64: 45-56.

- Pan-Montojo F, Anichtchik O, Dening Y, Knels L, Pursche S, Jung R, Jackson S, Gille G, Spillantini MG, Reichmann H, Funk RHW. Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. PLoS ONE 2010; 5: e8762: 1-10.
- Parkinson J. An assay of the shaking palsy. Sherwood Neely and Jones. London 1817. Parkinson Study Group.Impact of deprenyl and tocopherol treatment on Parkinson's disease in DATATOP patients requiring levodopa. Ann. Neurol. 1996; 40(6) 946-8.
- Parkinson Study Group. A randomized controlled trial comparing pramipexole with levodopa in early Parkinson's disease: design and methods of the CALM-PD Study. Parkinson Study Group. Clin Neuropharmacol. 2000; 23(1): 33-34.
- Paxinos G. and Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. New York: Academic Press, 1982.
- **Perez RG, Hastings TG.** Could a loss of α-synuclein function put dopaminergic neurons at risk? J. Neurochem. 2004; 89: 1318–1324.
- Peterson AL and Nutt JG. Treatment of Parkinson's disease with trophic factors. Neurotherapeutics. 2008; 5: 270–280.
- Pezzoli G, Canesi M , Antonini A, Righini A, Perbellini L, Barichella M, Mariani CB, Tenconi F, Tesei S, Zecchinelli A. and Leenders KL. Hydrocarbon exposure and Parkinson's disease. Neurology. 2000; 55: 667-673.
- Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe Ll., Johnson WG, Ide SE, Di Iorio G et al. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. Science. 1996; 274(5290):1197-1199.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C., Leroy E., Ide SE., Dehejia A., Dutra A., et al. Mutation in the α-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science 1997; 276: 2045-2047.
- Prasad KN, Cole WC, Kumar B. Multiple antioxidants in the prevention and treatment of Parkinson's disease. J. Am. Coll. Nutr. 1999; 18 (5): 413-423.

- Przedborski S, Kostic V, Jackson-Lewis V, Naini A, Simonetti S, Carlson E, Epstein CJ, Cadet JL. Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity are resistant to N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. J Neurosci. 1992; 12: 1658-1667.
- Przedborki S, Jackson-Lewis V, Yokohama R, Shibata T, Dawson VL and Dawson TM. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93: 4565–4571.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS. and McNamara JO. Invitación a la Neurociencia. 1ª ed. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana; 2001: cap 16 i 17.
- Quik M. Smoking, nicotine and Parkinson's disease. Trends Neurosci. 2004; 27: 561-568.
- Ramsay RR, Youngster SK, Nicklas WJ, McKeown, Jin YZ, Heikkila RE and Singer T. Structural dependence of the inhibition of mitochondrial respiration and of NADH oxidase by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) analogs and their energized accumulation by mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989; 86: 9168-9172.
- Ramson BR, Kunis DM, Irwin I, and Langston JW. Astrocytes convert the parkinsonism inducing neurotoxin MPTP to its active metabolite MPP+. Neurosc. Lett. 1987; 75: 323-328.
- Ravina B, Fagan S, Hart R, Hovinga C, Murphy D, Dawson T, et al. Neuroprotective agents for clinical trials in Parkinson's disease: a systematic assessment. Neurology. 2003; 60:1234-1240.
- Riederer P, Sofic E, Rausch WD, Schmidt B, Reynolds GP, Jellinger K and Youdim MB. Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. J Neurochem. 1989; 52: 515-520.
- **Robinson PA.** Protein stability and aggregation in Parkinson's disease. Biochem. J. 2008; 413: 1–13.

- Roig T, De Oliveira JR, Bartrons R and Bermúdez J. Fructose 1,6-bisphosphate protects against D-galactosamine toxicity in isolated rat hepatocytes. Am. J. Physiol. 1994; 266: C1722-C17-28.
- Sánchez-González MA, García-Cabezas MA, Rico B, Cavada C. The primate thalamus is a key target for brain dopamine. J. Neurosci. 2005; 25: 6076–6083.
- Sano I, Gamo T, Takimoto Y, Taniguchi K, Takesada M and Nishimura K. Distribution of catechol compounds in human brain. Biochim. Biophys. Acta 1959; 32: 586-587.
- Sanz E, Quintana A, Battaglia V, Toninello A, Hidalgo J, Ambrosio S, Valoti M, Marco JL, Tipton KF, Unzeta M. Anti-apoptotic effect of MAO-B inhibitor PF9601N [N-(2-propynyl)-2-(5-benzyloxy-indolyl) methylamine] is mediated by p53 pathway inhibition in MPP+- treated SH-SY5Y human dopaminergic cells. J. Neurochem. 2008; 105: 2404-2417.
- Sauer H. and Oertel WH. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: A combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. Neuroscience. 1994; 59 (2): 401-415.
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P. and Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. Journal of Neurochemistry. 1990; 54(1):823-827.
- Schapira AH, Olanow CW. Neuroprotection in Parkinson Disease: Mysteries Myths, and Misconceptions. JAMA. 2004; 291: 358-364.
- Schiffmann SN, Fisone G, Moresco R, Cunha RA and Ferré S. Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. Progress in Neurobiology. 2007; 83(5)277-292.
- Schneider JS. and Markham CH. Immunohistochemical localization of monoamine oxidase-B in the cat brain: clues to understanding N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetra-hydropyridine (MPTP) toxicity. Exp. Neurol. 1987; 97: 465-481.
- Schmued LC, Albertson C, Slikker Jr. W. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. Brain Res. 1997; 751 (1): 37-46.

- Schön A, Haller T, Gnaiger E. Hexokinase induced, steady state coupled mitochondria studied by injection calorimetry and respirometry. CYCLOBIOS Newsletters. 1990; 4: 67-72.
- Schulz W. Responses of midbrain dopamine neurons to behavioral trigger stimuli in the monkey. J. Neurophysiol. 1986; 56(5): 1439-1461.
- Schultz W. Behavioral theories and the neurophysiology of reward. Ann. Rev. Psychol. 2006; 57: 87-115
- Schulz JB, Falkenburger BH. Neuronal pathology in Parkinson's disease. Cell Tissue Res. 2004; 318: 135–147.
- Seidler A, Hellenbrand W, Robra BP, Vieregge P, Nischan P, Joerg J, Oertel WH, Ulm G. and Schneider E. Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease: a case-control study in Germany. Neurology. 1996; 46(5) 1275-1284.
- Sershen H, Hashim A, Lajtha A. Beavioral and biochemical effects of nicotine in an MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. Pharmacol. Biochem. Behav. 1987, 28: 299-303.
- Shimizu K, Ohtaki K, Matsubara K, Aoyama K, Uezono T, Saito O, Suno M, Ogawa K, Hayase N, Kimura K, Shiono H. Carrier-mediated processes in blood–brain barrier penetration and neural uptake of paraquat j. Brain Research. 2001; 906 (1-2): 135-142.
- Shimohama S, Sawada H, Kitamura Y, Taniguchi T. Disease model: Parkinson's disease. Trends Mol. Med. 2003; 9: 360-365.
- Siderowf A, Stern M. Update on Parkinson Disease. Ann. Intern. Med. 2003; 138: 651-658.
- Sidhu A, Wersinger C, Moussa CEH, Vernier P. The role of α-synuclein in both neuroprotection and neurodegeneration. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2004; 1035: 250-270.
- Sillitoe RV and Vogel MW. Desire, disease, and the origins of the dpaminergic system. Schizoph. Bull. 2008; 34: 212-219.

- Smeyne RJ. and Jackson-Lewis V. The MPTP model of Parkinson's disease. Mol. Brain Res. 2005; 134: 57-66.
- Smidt MP and Burbach JPH. How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron. Nature Rev. Neurosci. 2007; 8: 21-32.
- Smith AD, Castro SL, Zigmond MJ. Stress-induced Parkinson's disease: a working hypothesis. Physiol. Behav. 2002; 77: 527-531.
- Snyder SH & D'Amato RJ. MPTP: a neurotoxin relevant to the pathophysiology of Parkinson's disease. Neurology. 1986; 36: 250-258.
- Snyder AM. and Connor JR. Iron, the substantia nigra and related neurological disorders. Biochim. Biophys. Acta. 2009; 1790: 606-614.
- Spiegel EA, Wycis HT, Marks M and Lee AJ. Stereotaxic apparatus for operations on the human brain. Science, 1947; 106: 349-350.
- Sonsalla PK, Zeevalk GD, German DC. Chronic intraventricular administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium as a progressive model of Parkinson's disease. Parkins. Rel. Dis. 2008; 14: S116-S118.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R and Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. Nature. 1997; 388: 839-840.
- Stark AK. and Pakkenberg B. Histological changes of the dopaminergic nigrostriatal system in aging. Cell Tissue Res. 2004; 318: 81-92.
- Storch A, Ludolph AC, Schwarz J. Dopamine transporter: involvement in selective dopaminergic neurotoxicity and degeneration. J. Neural Transm. 2004; 111: 1267-1286.
- Sulzer D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. Trends Neurosci. 2007; 30: 244-250.
- Strömberg I, Bickford P, Gerhardt GA. Grafted dopamine neurons: Morphology, neurochemistry, and electrophysiology. Progr. Neurobiol. 2010; 90: 190-197.

- Surmeier DJ. Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. Lancet Neurol. 2007; 6: 933-38.
- Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J. Calcium, cellular aging, and selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease. Cell Calcium 2010; 47: 175-182.
- Takada M, Li ZK, Hattori T. Intracerebral MPTP injections in the rat cause cell loss in the substantia nigra, ventral tegmental area and dorsal raphe. Neurosc. Lett. 1987, 78: 145-150.
- Takada M, Li ZK, Hattori T. Astroglial ablation prevents MPTP-induced nigrostriatal neuronal death. Brain Res. 1990, 509:55-61.
- Tanaka J, Nakamura H, Honda S, Takada K. and Kato S. Neuropathological study on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine of the crab-eating monkey. Acta Neuropathol. 1988, 75: 370-376.
- Tanner CM, Ottman R, Goldman SM, Ellenberg J, Chan P, Mayeux R, and Langston JW. Parkinson disease in twins: an etiologic study. JAMA. 1999; 281(4):341-6.
- Tatton NA. Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease. Exp. Neurol. 2000;166: 29-43.
- Terzioglu M. and Galter D. Parkinson's disease: genetic versus toxin-induced rodent models. FEBS J. 2008; 275: 1384-1391.
- Thiruchelvam M, Richfield EK, Goodman BM, Baggs RB, Coryslechta DA. Developmental exposure to the pesticides paraquat and maneb and the Parkinson's disease phenotype. Neurotoxicology. 2002; 23: 621-633.
- Thomas B. and Beal MF. Parkinson's disease. Hum. Mol. Genet. 2007; 16: 183-194.
- Tong J, Hornykiewicz O, Kish SJ. Inverse relationship between brain noradrenaline level and dopamine loss in Parkinson disease: a possible neuroprotective role for noradrenaline. Arch. Neurol. 2006; 63 (12): 1724-8.
- Turner BH, Wilson JS, McKenzie JC, Richtand N. MPTP produces a pattern of nigrostriatal degeneration which coincides with the mosaic organization of the caudate nucleus.Brain Res. 1988; 473(1):60-64.

- Úbeda JV. Revisión estructural de agentes químicos que pueden inducir parkinsonismo. Rev Neurol. 2000; 31 (5): 463-468.
- Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. Eur. J. Pharmacol. 1968; 5(1): 107-110.
- Ungerstedt U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. Acta Physiol Scand. 1971; 367: 69-93.
- Valldeoriola i Serra F y Villegas Bruguera E. Tendencias actuales en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Jano. 2007; 1.641: 27-31.
- Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA, Nelson LM. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. Am. J. Epidemiol. 2003; 157(11): 1015-1022.
- Vila M, Vukasovic S, Jackson LV, Neystat M, Jakowec M, Przedborski S. α-Synuclein up-regulation in substantia nigra of dopaminergic neurons following administration of the parkinsonian toxin MPTP. J. Neurochem. 2000; 74: 721-729.
- Vila M, Jackson-Lewis V, Guégan C, Wu DC, Teismann P, Choi DK, Tieu K, Przedborski S. The role of glial cells in Parkinson's disease. Curr. Opin. Neurol. 2001; 14: 483-489.
- Vila M. and Przedborski S. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's Disease. Nature Medicine. 2004; 10 Suppl:S58-62.
- Vila M. and Przedborski S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. Nature rev. Neurosci. 2003; 4: 365-375.
- Volkow ND, Fowlwe JS, Wang GJ. The addicted human brain viewed in the light of imaging studies: brain circuits and treatment strategies. Neuropharmacology. 2004; 47: 3-13.
- Von Euler US. A specific sympathomimetic ergone in adrenergic nerve fibres (sympathin) and its relation to adrenaline and nor-adrenaline Acta Physiol. Scand 1946; 12: 73-97.
- Vyas I, Heikkila RF, Nicklas WJ. Studies on the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1-,2,3,6-tetrahydropyridine: inhibition of NAD-linked substrate oxidation by its meta-

bolite, 1-methyl-4-phenylpyridinium. J. Neurochem 1986; 46(5): 1501-1507.

- Wallace RA, Boldry R, Schmittgen T, Miller D, Uretsky N. Effect of 1-methyl-4phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on monoamine nurotransmitters in mouse brain and heart. Life Sci. 1984, 35: 285-291.
- Westerink BH, Damsma G, Rollema H, De Vries JB, Horn AS. Scope and limitations of in vivo brain dialysis: a comparison of its application to various neurotransmitter systems. Life Sci. 1987; 41: 1763-1776.
- Westerink BH. Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour. Beavioural Brain Res. 1995; 70: 103-124.
- Westlund KN, Denney RM, Kochersperger LM, Rose RM, Abell CW. Distintc monoamine oxidase A and B populations in primate brain. Science. 1985; 230: 181-183
- Whitton PS. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. Br. J. Pharmacol. 2007; 150: 963–976.
- Whone AL, Watts RL, Stoessl AJ, Davis M, Reske S, Nahmias C et al. REAL-PET Study Group. Slower progression of Parkinson's disease with ropinirole versus levodopa: The REAL-PET study. Ann. Neurol. 2003; 54(1) 93-101.
- Wilk S. and Stanley M. Dopamine metabolites in human brain. Psychopharmacology. 1978; 57: 77-81.
- Wilms H, Rosenstiel P, Sievers J, Deuschl G, Zecca L. and Lucius R. Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. FASEB J. 2003; 17(3): 500-502.
- Willis GL. and Donnan GA. Histochemical, biochemical and behavioral consequences of MPTP treatmen in C-57 black mice. Brain Res. 1987, 402: 269-274.
- Winkler C, Kirik D, Björklund A. Cell transplantation in Parkinson's disease: how can we make it work? Trends Neurosci. 2005; 28(2): 86-92.
- Witt SN. and Flower TR. α -Synuclein, oxidative stress and apoptosis from the perspecti-

ve of a yeast model of Parkinson's disease. FEMS Yeast Res. 2006; 6: 1107-1116.

- Wolf ME. En: Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL, editors. Basic Neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects. 7^a ed. USA: Elsevier Academic Press; 2006. p.911-926.
- Wu RM, Chen RC, Chiueh CC. Effect of MAO-B inhibitors on MPP+ toxicity in vivo. Ann. NY. Acad Sci. 2000; 899: 255-261.
- Ye W, Shimamura K., Rubenstein J L, Hynes MA & Rosenthal A. FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. Cell. 1998; 93: 755-766.
- Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, et al. and de Yébenes JG. The new mutation, E46K, of α-synuclein causes parkinson and Lewy body dementia. Ann. Neurol. 2004; 55(2): 164-173.
- Zecca L, Zucca FA., Wilms H, Sulzer D. Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. Trends Neurosci. 2003; 26.
- Zecca L,Youdim MBH, Riederer P, Connor JR. and Crichton RR. Iron, brain ageing and neurodegenerative disordewrs.Nature Rev. Neurosci. 2004; 5:863-873.
- Zetterström T, Sharp T, Marsden CA, Ungerstedt U. In vivo measurement of dopamine and its metabolites by intracerebral dialysis: changes after d-amphetamine. J Neurochem. 1983; 41: 1769-1773.
- Zhang Y, Dawson VL, Dawson TM. Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. Neurobiol. Dis. 2000; 7: 240-250.
Annexes - Publicacions

ANNEX 1. "Early effects of basic fibroblast growth factor on foetal rat mesencephalic cell suspensions".

M.Espejo, T.Roig, B.Cutillas, J.Bermúdez, R.Bartrons and S.Ambrosio. Neurosci. Lett. 221: 1-4 (1996). Pag 182-185

ANNEX 2. "Increased survival of dopaminergic neurons in striatal grafts of fetal ventral mesencephalic cells exposed to neurotrophin-3 or glial cell line-derived neurotrophic factor"
M.Espejo, B.Cutillas, E.Arenas, S.Ambrosio.
Cell Transplant. 9: 45-53 (2000). Pag 186-194

ANNEX 3. "Exposure of foetal mesencephalic cells to bone morphogenetic protein-2 enhances the survival of dopaminergic neurones in rat striatal grafts".
M.Espejo, B.Cutillas, F.Ventura, S.Ambrosio.
Neurosci. Lett. 275: 13-16 (1999). Pag 195-198

ANNEX 4. "Chronic effects of single intrastriatal injections of 6-hydroxydopamine or 1-methyl-4-phenylpyridinium studied by microdialysis in freely moving rats".
A.Espino, B.Cutillas, A.Tortosa, R.Bartrons, I.Ferrer and S.Ambrosio.
Brain Res. 695: 151-157 (1995). Pag 199-205

ANNEX 5. "Caspases inhibition protects nigral neurons against 6-hydroxydopamine-induced retrograde degeneration".
B.Cutillas, M.Espejo, J.Gil, I.Ferrer, S.Ambrosio.
NeuroReport 10: 2605-2608 (1999. Pag 206-209)

ANNEX 6. "Neuroprotective effect of PF 9601N [N-(2-propynyl)-2-(5-benzyloxyindo-lyl) methylamine] on rat nigral neurons after 6-hydroxydopamine-striatal lesion.
B. Cutillas, S. Ambrosio, M. Unzeta.
Neurosci. Lett. 329: 165-168 (2002. Pag 210-213)

ANNEX 7. "Intrastriatal grafts of fetal mesencephalic cell suspensions in MPP+-lesioned rats: a microdialysis study in vivo".
M.Espejo, S.Ambrosio, J.Llorens, B.Cutillas.
Neurochem. Res. 23: 1217-1223 (1998). Pag 214-220

ANNEX 8. "Lymphocyte populations in Parkinson's disease and in rat models of parkinsonism"J.Bas, M.Calopa, M.Mestre, D.G.Molleví, B.Cutillas, S.Ambrosio, E.Buendía.J. Neuroimmunol. 113: 146-152 (2001). Pag 221-227

ANNEX 9. "MPP+ toxicity in rat striatal slices: relationship between non-selective effects and free radical production".

S.Ambrosio, A.Espino, B.Cutillas and R.Bartrons. Neurochem. Res. 21: 73-78 (1996). Pag 228-233

ANNEX 10. "7-Nitroindazole prevents dopamine depletion caused by low concentrations of MPP+ in rat striatal slices".
B.Cutillas, M.Espejo, S.Ambrosio.
Neurochem. Int. 33: 35-40 (1998). Pag 234-239

ANNEX 11. "MPP+-induced mitochondrial dysfunction is potentiated by dopamine" J.Boada, B.Cutillas, T.Roig, J.Bermúdez, S.Ambrosio. Biochem. Biophys. Res. Commun. 268: 916-920 (2000). Pag 240-244

ANNEX 12. "Intracerebral applications of MPP+: why so many different responses versus MPTP-treatment?".
S.Ambrosio, A.Espino, B.Cutillas, M.Espejo, R.Bartrons.
Curr. Top. Neurochem. 1: 113-121 (1997). Pag 245-253

Altres publicacions

 Effect of co-trimoxazole in drug metabolism. del Villar JA, Salvá P, Cutillas B, Salvá JA.
 Arch. Farmacol. Toxicol. 7: 249-252 (1981).

2. Characterization of D2-dopamine receptor modification in rat striatum after calcium channel blocker treatment.

Casellas N, Ferrani A, Cutillas B, Mahy N.
Methods Find. Exp Clin. Pharmacol. 12:609-611 (1990).
3. Effect of age and cinnarizine treatment on brain dopamine receptors.
Camps M, Ambrosio S, Reiriz J, Ballarin M, Cutillas B, Mahy N.
Pharmacology.46:9-12 (1993).

4. Fas and Fas-L expression in Huntington's disease and Parkinson's disease.Ferrer I, Blanco R, Cutillas B, Ambrosio S.Neuropathol. Appl. Neurobiol. 26(5):424-433 (2000).

5. Adenosine monophosphate-activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat.

Peralta C, Bartrons R, Serafin A, Blázquez C, Guzmán M, Prats N, Xaus C, Cutillas B, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Hepatology 34:1164-1173 (2001).

6.Nervous and vestibular toxicities of acrylonitrile and iminodipropionitrile. Llorens J, Soler-Martín C, Cutillas B, Saldaña-Ruíz S. Toxicol. Sci.110:244-245 (2009).

7. The targets of acetone cyanohydrin neurotoxicity in the rat are not the ones expected in an animal model of konzo.

Soler-Martín C, Riera J, Seoane A, Cutillas B, Ambrosio S, Boadas-Vaello P, Llorens J. Neurotoxicol Teratol. 32:289-294 (2010).

8. A new unifying hypothesis for lathyrism, konzo and tropical ataxic neuropathy: Nitriles are the causative agents.

Llorens J, Soler-Martín C, Saldaña-Ruíz S, Cutillas B, Ambrosio S, Boadas-Vaello P. Food Chem. Toxicol. 49(3):563-7 (2011).

ANNEX 1





Early effects of basic fibroblast growth factor on foetal rat mesencephalic cell suspensions

Neuroscience Letters 221 (1996) 5-8

Mónica Espejo^a, Teresa Roig^b, Blanca Cutillas^c, Jordi Bermúdez^b, Ramon Bartrons^a, Santiago Ambrosio^{a.*}

^aUnitat de Bioquímica, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, c/.Feixa Llarga s/n, Hospitalet del Llobregat 08907, Barcelona, Spain ^bUnitat de Biofísica, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Hospitalet del Llobregat 08907, Barcelona, Spain ^cEscola d'Infermeria, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Hospitalet del Llobregat 08907, Barcelona, Spain

Received 7 August 1996; revised version received 21 October 1996; accepted 15 November 1996

Abstract

Mesencephalic cell suspensions are used, experimentally but also clinically, to compensate for neurological deficiencies, by implantation into the striatum. Here, we have studied the metabolism of mesencephalic cell suspensions obtained from rat embryos by measuring heat dissipation, oxygen consumption, ATP and lactate production. The effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) at a 50 ng/ml concentration on these parameters was studied in order to assess the effect of in vitro exposure of cell suspensions to this trophic factor. Heat production and oxygen consumption were low, as could be expected from an immature nervous tissue, and they further decreased after addition of bFGF. This trophic factor decreased the total ATP concentration and increased the lactate production. The viability of the cell suspensions was reduced by nearly a half, 2 h after the addition of bFGF, and numerous fragmented nuclei were observed. It seems that, in contrast to the neuroprotective effect of bFGF on mesencephalic cultures and nigrostriatal neurons, this factor could have an initial sorting effect in the development of mesencephalic structures. © Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved

Keywords: Basic fibroblast growth factor; Mesencephalic cells; Neuronal grafts; Neuronal metabolism; Calorimetry; Apoptosis

Basic fibroblast growth factor (bFGF) has a neurotrophic effect on several nervous structures and neuronal cultures. It stimulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells [16] and, more in particular, promotes the survival [15] and, in some cases, proliferation [14] of cultures of embryonic ventral mesencephalic dopaminergic neurons, which could be accompanied by an initial delay in the differentiation of these neurons [1]. In hippocampal and cortical neurons it has a prominent effect on the differentiation of neurons, alone or in conjunction with other neurotrophins [23]. The neurotrophic effects of bFGF on dopaminergic cells seem to be mediated by mesencephalic glia [6]. bFGF is also a potent promoter of astrocyte proliferation and glioma growth [8]. On the basis of its neurotrophic effects, and since a decrease in bFGF production has been found in the substantia nigra

neurons in Parkinson's disease [21], this factor has been assayed in animal models of neurodegenerative diseases [11]. Indeed, bFGF has a protective effect against MPTP and MPP⁺ toxicity on cultured mesencephalic neurons [17] and in MPTP-treated mice, when administered into the striatum [4] or the cerebral ventriculum [2].

Mesencephalic cell suspensions are often transplanted into the striatum of nigrostriatal lesioned rats in order to study the recovery of dopaminergic function. These cells, implanted into the striatum of 6-hydroxydopamine denervated rats, increase their survival when bFGF is administered via an intracerebral cannula [14] or when it is produced by transfected fibroblasts, capable of synthesizing bFGF, co-implanted in the striatum [19].

In the present work we have studied the effect of bFGF on the survival and metabolism of mesencephalic cell suspensions prepared as described for their striatal implantation in rat models of Parkinson's disease [5]. Cell suspensions were prepared from ventral mesencephalon of 14- to

^{*} Corresponding author. Tel.: +34 3 4024281; fax.: +34 3 4024212; e-mail: ambrosio@bellvitge.bvg.ub.es

6



Fig. 1. Heat dissipation and oxygen consumption of foetal mesencephalic cell suspensions. The arrows show the addition of bFGF to a final concentration of 50 ng/ml. The discontinuous lines indicate the effect of the addition of medium without bFGF.

15-day-old rat embryos (E14-E15). The mesencephalic areas were dissected as described by Dunnett and Björklund [5], incubated at 37°C for 20 min in RPMI medium (Seromed, Biochrom) supplemented with 2 mM glutamine, and containing 0.05% DNase and 0.1% trypsin. The cell suspensions were gently disgregated, washed in medium and centrifuged at 600 rev./min for 10 min. Cells were resuspended in 5 µl of RPMI per piece and embryo with or without bFGF (50 ng/ml). bFGF was validated by its ability to differentiate PC12 cells [10] at the concentrations used. The cell suspensions were stirred at 37°C during the experiments. Viability and metabolic parameters were measured at different times in the presence of bFGF and without it, in order to assess how long these cells could be maintained in suspension. To evaluate the viability, a sample of cell suspension was counted in a Coulter counter and the percentage of surviving cells was determined by fluorescence microscopy with orange acridine/ethidium bromide (50:50), as described previously [5]. The initial concentration of the cell suspensions was about 10⁸ cell/ ml, corresponding to the concentrations normally used to implant 2–4 μ l into a lesioned striatum. Samples of 10 μ l were treated with 1 N perchloric acid and disrupted by freezing and thawing. The homogenates were centrifuged, and supernatants, neutralized with 1 N NaOH, were used for ATP or lactate analysis. ATP was fluorimetrically measured by a procedure adapted from Traudscholt et al. [22]. Lactate was spectrophotometrically measured as described by Gutman and Wahlefeld [9]. Values refer to the protein content, measured using Bradford's procedure. Heat production of cell suspensions was assessed in stirred cells at

M. Espejo et al. / Neuroscience Letters 221 (1996) 5-8

 37° C using two channels of a thermal activity monitor (LKB) [18]. The cell concentration for calorimetric experiments was 10^{6} cell/ml. Heat dissipation was monitored until stabilization and then bFGF was added in one of the channels to a final concentration of 50 ng/ml. An equal volume of RPMI medium was added in the control channel. The rate of oxygen consumption was measured with a Clark oxygen electrode [18], using about 750 000 cell/ml of the same sample. bFGF was added at 90% of oxygen concentration saturation value.

Calorimetric studies of heat dissipation are indicative of the whole cell metabolism. These measures showed that these cell suspensions have a low metabolic activity (6.0 \pm 0.3 pW/cell) compared with results published on different cell types (300 pW/cell in hepatocytes, [18]). Heat dissipation decreased to nearly half (3.8 \pm 0.2 pW/ cell) in 1–2 h after exposure to bFGF and stayed low for several hours (Fig. 1). The addition of an equal volume of RPMI to the control cells allowed, after a brief perturbation, the heat dissipation reading to return to control values. The basal oxygen consumption was also very low (3.5 \pm 0.1 fmol O₂/min per cell) in these cell suspensions, indicating prominent anaerobic behaviour, corre-



Fig. 2. Time course of the concentration of ATP and lactate in mesencephalic cell suspensions with (+) and without bFGF (–). Each point is the mean of three different experiments \pm SEM. *P < 0.05, **P < 0.01(Wilcox test) with respect to the corresponding control values.

M. Espejo et al. / Neuroscience Letters 221 (1996) 5-8



Fig. 3. Percentage of viability of rat mesencephalic foetal cells with (+) and without (-) bFGF (50 ng/ml). Each point is the mean of three different experiments \pm SEM. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 (Wilcox test) with respect to the corresponding control values.

sponding to the developmental stage of these cells. bFGF further reduced the oxygen uptake to 2.3 ± 0.2 fmol/min per cell (Fig. 1, corner). The increase in lactate production and the decrease in ATP concentrations (Fig. 2) were consistent with a loss of cell viability and a decrease in oxygen consumption, indicating a probable involvement of reduction in mitochondrial respiration. Moreover, using orange acridine and Hoechst-33342 fluorescence dyes, numerous fragmented nuclei could be observed in cell suspensions 1-2 h after addition of bFGF, but not in those without bFGF. The measurement of cell viability showed a marked decrease after 2 h of incubation with bFGF (Fig. 3). However, no differences were found between control and bFGF cell content after 18 h of incubation, the viability being markedly decreased (near 40%) in both samples. At this time, numerous cells in contact with bFGF showed a differentiated aspect with clear prolongations, whereas control cells maintain a spherical feature (not shown). Such effects of bFGF on metabolism and nuclear fragmentation were not observed in suspensions of foetal striatal cells.

It has been suggested [3] that exposure of cells to trophic factors, prior to transplantation, could enhance their level of differentiation and integration into the host brain. However, the present results, taken together, suggest a bFGF effect on a cell population in the central nervous system (CNS) that is different from those previously described. As mentioned above, bFGF has been described to act on neuronal or neuronal-like cells as a proliferative, differentiating or survival factor. bFGF has also been reported to protect PC12 cells [13] and neuronal cortical cultures [20] against apoptosis. Many of the neurons which migrate to the cortex die by apoptosis at an early stage of development. It seems that if the axon of the cell does not make contact with the dendrites of a cell in its target area it dies. In cell suspensions this effect could be made evident by the action of an external growth regulating factor. bFGF might have a specific effect on the development of mesencephalic cell populations, inducing a limited programmed death by mitochondrial blockade. As is well documented, molecules that participate in apoptotic events may cause a perturbation of the mitochondrial function in certain cells and, at the same time, exert functions that are vital for survival and differentiation in other cells [12]. Indeed, bFGF has also been reported to increase peroxynitrite-induced apoptosis in PC12 cells [7]. The results here presented suggest a sorting effect of bFGF, at least at some developmental stages. Mesencephalic cell cultures treated with bFGF at different times, or cell suspensions seeded after exposure or not to bFGF, will probably lead to different proportions in the amounts of the three main cell types present in these suspensions: i.e. dopaminergic and GABAergic neurons and glial cells. This and other strategies will be necessary to clarify which mesencephalic cell populations die due to bFGF action at early stages of development.

This work was supported by grants from the Spanish government, F.I.S. (95/0188), F.I.S. (94/1238) and S.G.R. (95/427). M. Espejo is recipient of a fellowship from Fundació August Pi i Sunyer.

- Bouvier, M.M. and Mytilineou, C., Basic fibroblast growth factor increases division and delays differentiation of dopamine precursors in vitro, J. Neurosci., 15 (1995) 7141–7149.
- [2] Chadi, G., Moller, A., Rosén, L., Janson, L.A., Goldstein, M., Ögren, S.O., Petterson, R.F. and Fuxe, K., Protective actions of human recombinant basic fibroblast growth factor on MPTPlesioned nigrostriatal dopamine neurons after intraventricular infusion, Exp. Brain Res., 97 (1993) 145–148.
- [3] Chen, X.L., Roisen, F.J. and Gupta, M., The effect of in vitro exposure of donor cells to trophic factors in neurotransplantation, Exp. Neurol., 138 (1996) 64–72.
- [4] Date, I., Yoshimoto, Y., Imaoka, T., Miyoshi, Y., Gohda, Y., Furuta, T., Asari, S. and Ohmoto, T., Enhanced recovery of the nigrostriatal dopaminergic system in MPTP-treated mice following intrastriatal injection of basic fibroblast growth factor in relation to aging, Brain Res., 621 (1993) 150–154.
- [5] Dunnett, S.B. and Björklund, A., Staging and dissection of rat embryos. In S.B. Dunnett and A. Björklund (Eds.), Neural Transplantation – A Practical Approach, IRL, Oxford, 1992, pp. 1–19, 57–78.
- [6] Engele, J. and Bohn, M.C., The neurotrophic effects of fibroblast growth factors on dopaminergic neurons in vitro are mediated by mesencephalic glia, J. Neurosci., 11 (1991) 3070–3078.
- [7] Estevez, A.G., Radi, R., Barbeito, L., Shin, J.T., Thompson, J.A. and Beckman, J.S., Peroxynitrite-induced cytotoxicity in PC12 cells: evidence for an apoptotic mechanism differentially modulated by neurotrophic factors, J. Neurochem., 65 (1995) 1543– 1550.
- [8] Gately, S., Soff, G.A. and Brem, S., The potential role of basic fibroblast growth factor in the transformation of cultured primary human fetal astrocytes and the proliferation of human glioma cells, Neurosurgery, 37 (1995) 723–730.
- [9] Gutman, I. and Wahlefeld, A.W., L-(+)-Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD. In H.U. Bergmeyer (Ed.), Meth-

ods of Enzymatic Analysis, Vol. III, Academic Press, New York, 1974, pp. 1464–1468.

- 10] Hondermarck, H., McLaughlin, C.S., Patterson, S.D. and Bradshaw, R.A., Early changes in protein synthesis induced by basic fibroblast growth factor, nerve growth factor, and epidermal growth factor in PC12 pheochromocytoma cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91 (1994) 9377–9381.
- 11] Kawakami, N., Kashiwagi, S., Kitahara, T., Yamashita, T. and Ito, H., Effect of local administration of basic fibroblast growth factor against neuronal damage caused by transient intracerebral mass lesion in rats, Brain Res., 697 (1995) 104–111.
- 12] Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssière, J.L. and Mignotte, B., The biochemistry of programmed cell death, FASEB J., 9 (1995) 1277–1287.
- 13] Lindenboim, L., Haviv, R. and Stein, R., Inhibition of drug induced apoptosis by survival factors in PC12 cells, J. Neurochem., 64 (1995) 1054–1063.
- 14] Mayer, E., Fawcett, J.W. and Dunnett, S.B., Basic fibroblast growth factor promotes the survival of embryonic ventral mesencephalic dopaminergic neurons – effects on nigral transplants in vivo, Neuroscience, 56 (1993) 389–398.
- 15] Mayer, E., Dunnett, S.B. and Fawcett, J.W., Mitogenic effect of basic fibroblast growth factor on embryonic ventral mesencephalic dopaminergic neurone precursors, Dev. Brain Res., 72 (1993) 253– 258.
- 16] Murphy, M., Drago, J. and Barlett, P.F., Fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells in vitro, J. Neurosci. Res., 25 (1990) 463–475.

- [17] Otto, D. and Unsicker, K., FGF-2-mediated protection of cultured mesencephalic dopaminergic neurons against MPTP and MPP⁺: specificity and impact of culture conditions, non-dopaminergic neurons, and astroglial cells, J. Neurosci. Res., 34 (1993) 382– 393.
- [18] Roig, T., de Oliveira, J.R., Bartrons, R. and Bermúdez, J., Fructose 1,6-bisphosphate protects against D-galactosamine toxicity in isolated rat hepatocytes, Am. J. Physiol., 266 (1994) C1722–C1728.
- [19] Takayama, H., Ray, J., Raymon, H.K., Baird, A., Hogg, J., Fisher, L.J. and Gage, F.H., Basic fibroblast growth factor increases dopaminergic graft survival and function in a rat model of Parkinson's disease, Nature Med., 1 (1995) 53–58.
- [20] Takei, N., Ogaki, H. and Endo, Y., Basic fibroblast growth factor inhibited Ca²⁺ ionophore-induced apoptotic cell death of cultured cortical neurons from embryonic rats, Neurosci. Lett., 192 (1995) 124–126.
- [21] Tooyama, I., Kawamata, T., Walker, D., Yamada, T., Hanai, K., Kimura, H., Iwane, M., Igarashi, K., McGeer, E.G. and McGeer, P.L., Loss of basic fibroblast growth factor in substantia nigra neurons in Parkinson's disease, Neurology, 43 (1993) 372–376.
- [22] Trautscholt, I., Lamprecht, W. and Schweitzer, G., ATP. UVmethod with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In H.U. Bergmeyer (Ed.), Methods of Enzymatic Analysis, Vol. III, Academic Press, New York, 1974, pp. 347–357.
- [23] Vicario-Abejón, C., Johe, K.K., Hazel, T.G., Collazo, D. and McKay, R.D.G., Functions of basic fibroblast growth factor and neurotrophins in the differentiation of hippocampal neurons, Neuron, 15 (1995) 105–114.

ANNEX 2

Cell Transplantation, Vol. 9, pp. 45-53, 2000 Printed in the USA. All rights reserved. 0963-6897/00 \$20.00 + .00 Copyright © 2000 Cognizant Comm. Corp. www.cognizantcommunication.com

Increased Survival of Dopaminergic Neurons in Striatal Grafts of Fetal Ventral Mesencephalic Cells Exposed to Neurotrophin-3 or Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor

Mónica Espejo,* Blanca Cutillas,*† Ernest Arenas,‡ and Santiago Ambrosio*

 *Unitat de Bioquímica, Departament de Ciències Fisiològiques II and †Escola Universitària d'Infermeria, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, 08907-Hospitalet del Llobregat, Spain
 ‡Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Laboratory of Molecular Neurobiology, Karolinska Institute, Stockholm, S-171 77, Sweden

The transplantation of fetal mesencephalic cell suspensions into the brain striatal system is an emerging treatment for Parkinson's disease. However, one objection to this procedure is the relatively poor survival of implanted cells. The ability of neurotrophic factors to regulate developmental neuron survival and differentiation suggests they could be used to enhance the success of cerebral grafts. We studied the effects of neurotrophin-3 (NT-3) or glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) on the survival of dopaminergic neurons from rat fetal ventral mesencephalic cells (FMCs) implanted into the rat striatum. Two conditions were tested: (a) incubation of FMCs in media containing NT-3 and GDNF, prior to grafting, and (b) cografting of FMCs with cells engineered to overexpress high levels of NT-3 or GDNF. One week after grafting into the rat striatum, the survival of TH+ neurons was significantly increased by pretreatment of ventral mesencephalic cells with NT-3 or GDNF. Similarly, co-graft of ventral mesencephalic cells with NT-3- or GDNF-overexpressing cells, but not the mock-transfected control cell line, increased the survival of graft-derived dopaminergic neurons. Interestingly, we also found that co-grafting of GDNF-overexpressing cells was less effective than NT-3 at improving the survival of fetal dopaminergic neurons in the grafts, and that only GDNF induced intense TH immunostaining in fibers and nerve endings of the host tissue surrounding the implant. Thus, our results suggest that NT-3, by strongly enhancing survival, and GDNF, by promoting both survival and sprouting, may improve the efficiency of fetal transplants in the treatment of Parkinson's disease.

Key words: Fetal ventral mesencephalic cells; Transplant; Neurotrophin-3; GDNF; Dopamine; Tyrosine hydroxylase; Parkinson's disease

INTRODUCTION

Intrastriatal grafting of fetal mesencephalic cells (FMCs) containing dopaminergic neurons has been proposed as treatment to alleviate dopaminergic cell loss in Parkinson's disease (10,18,23). However, the low survival of the transplanted dopaminergic neurons (12) indicates that this procedure should be considered with caution. The identification of growth factors that improve the survival and activity of nigral dopaminergic neurons has suggested that these molecules may improve the survival of transplanted FMCs (22).

Here we focus on growth factors of two different families: the neurotrophins and the glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) family. The neurotrophin family is formed by nerve growth factor (NGF), brainderived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), -4/5 (NT-4/5), and -6 (NT-6). They bind and activate two different types of receptor: a common p75 neurotrophin receptor, and a specific tyrosine kinase receptor: trkA for NGF, trkB for BDNF and NT-4/5, and trkC for NT-3 (28).

The GDNF family of neurotrophic factors is formed by GDNF (37), neurturin (NTN) (33), persephin (PSP) (40), and artemin (ART) (6). Ligands of this family bind to high-affinity glycosylphosphatidylynolsitol (GPI)-anchored receptors, collectively named GDNF family receptor α (GFRa), to form a complex that subsequently activates the receptor tyrosine kinase, c-ret (29,31,53, 54). GFR α 1 is the high-affinity receptor that is preferen-

Accepted September 24, 1999.

Address correspondence to Santiago Ambrosio, Unitat de Bioquímica, Departament de Ciències Fisiològiques 11, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, c/. Feixa Llarga s/n, L'Hospitalet del Llobregat 08907, Barcelona, Spain. Tel: 343 93 402 90 94; Fax: 343 93 402 42 68; E-mail: ambrosio@bellvitge.bvg.ub.es

46

tially bound by GDNF (31), GFR α 2 by NTN (31), GFR α 4 by PSP (16), and GFR α 3 by ART (6).

A large number of growth factors stimulate the survival and differentiation of dopaminergic neurons in primary cultures. This includes members of the neurotrophin family, such as BDNF, NT-3, and NT-4 (26,27,35,58), and members of the GDNF family, such as GDNF (8,14,24,37), NTN (25), PSP (40), and ART (6). In vivo, endogenous dopaminergic neurons also respond to several of these factors, including the neurotrophins BDNF, NT-3, and NT-4 (2,20,35), and GDNF (7-9,11,13,45). In addition, fetal dopaminergic neurons grafted into the rat striatum respond to BDNF (44,59), NT-4 (21), and GDNF (3,19,43,46,48,50,51,56). Because of the peptidic nature of growth factors and the presence of extracellular peptidases and uptake systems, a steady production of neurotrophic factors is required. One procedure for the continuous administration of growth factors is to implant genetically modified stable cells that produce them. This strategy has shown that factors of the neurotrophin (4,35) and GDNF families (1.5) enhance the survival and differentiation of central catecholaminergic neurons in vivo.

Here we studied the effects of NT-3 and GDNF on fetal mesencephalic dopaminergic neurons grafted into the striatum. FMCs were either pretreated with NT-3 or GDNF prior to grafting or were co-grafted with stable cell lines overexpressing NT-3 or GDNF (1,5). Our results show that both GDNF and NT-3 treatments improved the viability of fetal dopaminergic neurons in the graft.

MATERIALS AND METHODS

Animals and 6-Hydroxydopamine Lesions

Male Sprague-Dawley rats, weighing about 250 g, were housed and treated according to the policy on the use of animals in neuroscience research published by the Society for Neuroscience. The experimental protocols were approved by a review committee of the University of Barcelona under supervision of the Government of Catalunya. Animals were anesthetized with ketamine hydrochloride (100 mg/kg, IP) + 5,6-dihydro-2-(2,6-xylidino)-4h-1,3-thiazine hydrochloride (Rompun®, Bayer) (2 mg/kg, IP), and placed in a stereotaxic instrument with the upper incisor bar set 3.3 mm under the interaural line. Animals were unilaterally injected with 6-hydroxydopamine (4 µg/µl in saline with 0.02% ascorbic acid) into the right medial forebrain bundle (A: -4.4, L: -1.3, H: -7.8, from bregma) (42), in a volume of 2 μ l and a rate of 1 µl/min. Animals injected with an equal volume of saline + ascorbate were used as controls.

ESPEJO ET AL.

Preparation of Fetal Mesencephalic Cell (FMC) Suspensions

Cell suspensions were prepared from the ventral mesencephalon of 14-day-old embryos. The mesencephalic area was dissected out as described by Dunnett and Björklund (15), incubated at 37°C for 20 min in Dulbecco's modified essential medium (DMEM) supplemented with 2 mM glutamine, containing 0.05% DNase and 0.1% trypsin. The cell suspensions were gently disagregated, washed in DMEM, and sedimented by centrifugation. Cells were resuspended in 5 µl of DMEM per piece and embryo (17). The final concentration was adjusted to 100,000 cell/µl with DMEM. In some experiments, suspensions of FMC were preincubated for 3 h with NT-3 or GDNF (both at 50 ng/ml, from RBI, Natick, MA) or in medium without neurotrophins. To evaluate the viability of the cell suspensions, the percentage of surviving cells was determined by fluorescence microscopy with acridine/ethidium bromide (1:1), as described (15).

Transfected Fibroblasts

Rat 3T3 fibroblasts (American Type Culture Collection, Manassas, VA) overexpressing NT-3 (4) or GDNF (5), and mock-transfected fibroblasts were used. Transfected 3T3 cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 1 mg/ml penicillin/streptomycin, 1 mg/ml glutamine, and 200 μ g/ml G-418 at 37°C and 5% CO₂. Cells in active growth phase were washed and collected in serum-free medium at a concentration between 0.5 and 2.0 × 10⁵ cells per microliter for grafting.

Grafting

Three weeks after the 6-OHDA lesion of the medial forebrain, animals were grafted with a suspension of fetal mesencephalic cells introduced into the right striatum (coordinates A: +0.7, L: -3.2; H: -5, from bregma) with a flow rate of 1 µl/min, according to one of the following procedures:

- a. 3 µl of suspensions containing about 400,000 FMC was implanted after preincubation for 3 h at 37°C in a shaking bath with or without NT-3 or GDNF (50 ng/ml in both cases). Four animals were used in each group: FMC without neurotrophins, FMC + NT-3, and FMC + GDNF
- b. 4 μ l of a mixture containing FMC and 3T3 was implanted in the right striatum. Different proportions of FMC and 3T3 were assayed ($1.5 \times 10^5 : 2 \times 10^5$ and 3 $\times 10^5 : 1.5 \times 10^5$), in a final injected volume of 4 μ l. Four animals were used in each group. Animals implanted only with FMC, mock-transfected 3T3, and FMC + mock-transfected 3T3 were used as controls.

NEUROTROPHINS IN MESENCEPHALIC STRIATAL GRAFTS

Animals were processed in all cases for the study of dopaminergic cell survival, 7 days after grafting, in order to avoid excessive proliferation of the fibroblasts.

TH Immunocytochemistry

The animals were anesthetized and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer. The brains were rapidly removed and postfixed for 24 h, and selected coronal sections were embedded in paraffin. Sections (5 μ m) through the substantia nigra or the striatum were processed for tyrosine hydroxylase immunocytochemistry and developed with the avidin-biotin-peroxidase method (Vectastain, ABC Kit from Vector). Briefly, tissue sections of rat brain were treated with 0.05% saponin, followed by methanol and hydrogen peroxide, and finally normal horse serum. The sections were incubated overnight at 4°C with an anti-TH monoclonal antibody (Sigma), at a dilution 1:200. The peroxidase reaction was visualized with 0.05% diaminobenzidine and 0.01% hydrogen peroxide.

Cell Counts and Statistics

TH-positive neurons were counted in the ipsilateral striatum in six sections per animal and in four animals

per condition, at a $\times 250$ magnification in a Zeiss-Jenalumar microscope. The total number of cells was calculated according to the volume of the graft: approx. 0.06 mm³. For statistical evaluation, data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) and DMS post hoc test.

RESULTS

All studies were carried out in 6-OHDA-lesioned animals. The extent of the lesion was assessed in each animal by TH immunostaining. All animals included in the study showed almost complete loss of TH+ cells in the ipsilateral substantia nigra.

Viability of FMC Suspensions Before Grafting

Because FMCs are known to survive poorly after preparation of cell suspensions, we first examined whether preincubation of FMCs with neurotrophic factors known to promote the survival of dopaminergic neurons could prevent the loss of TH+ cells. Preincubation of FMCs at a concentration of 100,000 cells/µl in DMEM at 37°C for 6 h resulted in a decrease in the cell viability from 85% to 60%. In contrast, preincubation of FMCs in the same medium with NT-3 or GDNF (at 50



Figure 1. Effects of neurotrophin-3 (NT-3) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) on the percentage of viable rat fetal mesencephalic cells in suspension, as assessed by acridine orange (see Materials and Methods). Each point is the mean \pm SEM of three separate experiments. *p < 0.05, **p < 0.01 with respect to the corresponding control values.

ESPEJO ET AL.

ng/ml) for 6 h maintained the viability of mesencephalic cell suspensions at about 85% (Fig. 1).

Survival of Dopaminergic Cells After Preincubation With Neurotrophins and Grafting

Next, we tested whether preincubation of FMCs with NT-3 or GDNF enhanced the survival of TH+ cells in vivo, 1 week after intrastriatal grafting. Pretreatment with NT-3 or GDNF (at 50 ng/ml) increased the numbers of TH+ cells more than fourfold, compared to FMCs preincubated without the factor (Figs. 2 and 3), suggesting an early neuronal survival promoting effect of NT-3 and GDNF on TH+ cells grafted in the host striatum.

Survival of Dopaminergic Cells Co-Grafted With Transfected Fibroblasts

To examine whether constantly delivered NT-3 or GDNF in vivo was more efficient in preventing the loss of TH+ cells grafted in the host striatum, we performed co-grafts of FMCs and fibroblast cell lines known to express high levels of recombinant, biologically active NT-3 (4) and GDNF (5). One week after grafting a mixture of FMCs and transfected 3T3 fibroblasts (2:1), the survival of TH+ cells in the striatum was significantly increased by both GDNF- and NT-3-transfected fibroblasts, compared with mock-transfected fibroblasts or FMCs alone (Fig. 4). All the measures were performed 1 week after grafting, when only small tumors and focal damage were caused by the fibroblasts. Figure 5A shows the appearance of an implant of FMCs plus fibroblasts, 1 week after intrastriatal grafting. The survival of dopaminergic cells was much higher in co-grafts with NT-3producing fibroblasts. This effect was also observed when different ratios of FMCs and 3T3 cells were cografted (Table 1). Grafting of a larger number of 3T3-NT-3 cells resulted in a slightly higher number of surviving TH+ cells compared to the total number of cells grafted (0.9% and 0.6% when 200,000 or 150,000 3T3-NT-3 cells were grafter, respectively). In GDNF-producing grafts, the number of TH+ cells was lower than in NT-3-producing grafts, but a marked increase in TH+ fibers was observed in the host striatal tissue surrounding the implant (Fig. 5C) at a distance of about 525 µm from the border of the graft.

DISCUSSION

Many studies have suggested that graft survival in a host brain depends, among other parameters, on the access of transplanted neurons to growth factors (34). Here we describe, by two different procedures, a significant improvement in TH+ FMC survival mediated by two neurotrophic factors—NT-3 and GDNF—at relatively short times after transplantation (1 week). This period



Figure 2. Preincubation of fetal mesencephalic cells for 3 h with NT-3 (50 ng/ml) or GDNF (50 ng/ml), but not vehicle (DMEM, control), increased the number of tyrosine hydroxylase-positive neurons 7 days after striatal grafting. The results are the mean \pm SEM of four animals for each group. Significances were determined by ANOVA, F(3, 12) = 4.08, p = 0.03, and post hoc DMS test (*p < 0.05, **p < 0.01 compared with controls).

NEUROTROPHINS IN MESENCEPHALIC STRIATAL GRAFTS

Figure 3. Microphotographs of tyrosine hydroxylase-positive neurons in striatal grafts of fetal mesencephalic cells, 7 days after grafting and preincubation with (A) DMEM without neurotrophic factors, (B) medium containing neurotrophin-3 (50 ng/ml), or (C) medium containing glial cell line-derived neurotrophic factor (50 ng/ml). Sections were counterstained with hematoxylin. Scale bar = 50 µm.

has been chosen to avoid an excessive proliferation of the transfected fibroblasts and compression of the FMC. Thus, our results suggest that cells other than fibroblasts might be better suited to implement for clinical use and to exploit the beneficial effect of GDNF and NT-3 on fetal cells after transplantation.

The expression of both NT-3 (38) and its receptor, trkC (30), is high during fetal development (between E14 and E16) but reduced in the adult brain. NT-3 is expressed in many brain areas, including the mesencephalon and striatum, during the perinatal period (32). NT-3 immunoreactivity has been detected both in glia and neuronal populations of developing substantia nigra (58), and it has been shown to increase the survival of ventral mesencephalic dopaminergic neurons in primary cultures (27). Our data also suggest that NT-3 is a survival factor for embryonic dopaminergic neurons in vivo, because preincubation of immature dopaminergic cells with NT-3, or direct supply of NT-3 to grafted FMCs in vivo, enhances the survival of TH+ cells in the host brain.

In addition, GDNF was initially characterized by its ability to promote the survival of mesencephalic dopaminergic neurons in vitro (37), and more recently, it was reported to reduce the apoptosis of dopaminergic neurons (14). Because GDNF is also expressed in the developing striatum and mesencephalon (49,52,54), and because its receptors, the proto-oncogene c-ret and the coreceptor GFRal, are present in developing nigral neurons (54,55,57), it has been suggested that GDNF plays a trophic role in the developing nigrostriatal system. In the adult brain, GDNF mRNA is expressed at low levels both in the substantia nigra and in the striatum (5,47), suggesting a possible local and target-derived role of GDNF in the support of striatal and dopaminergic neurons. Interestingly, mechanical injury increases GDNF expression in the striatum (36), and administration of GDNF in vivo protects striatal neurons (41). Moreover, the degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons can also be prevented in vivo by direct injection of GDNF protein (20,45,52), adenovirus-mediated GDNF gene transfer (7,9,13,39), or cell-mediated delivery of GDNF (1.41).

Our results show that treatment of FMCs with NT-3 or GDNF prior to or during grafting enhanced the survival of dopaminergic neurons in the striatum. Indeed, the exposure of FMCs to trophic factors maintains in vitro their viability at least 6 h (Fig. 1), and the in vivo survival of the dopaminergic cells, 1 week after grafting into the brain, was fourfold higher than that of non-preincubated cells (Fig. 2). That indicates that prior treatment of a cell suspension at early stages with trophic factors is crucial for the late survival of these cells.

Although both neurotrophic factors were beneficial, surprisingly, continuous administration of NT-3 in vivo was more effective than GDNF in maintaining the survival of dopaminergic neurons after grafting. Many studies have examined the beneficial effects of pretreatment or treatment of FMCs with neurotrophic factors in vivo. Coadministration of GDNF and FMCs (3,19,50) or administration of GDNF in the vicinity of the intrastriatal (19,43,46,48) or nigral (51,56) FMC grafts has been shown to: (a) promote the survival and sprouting of TH+ neurons from FMCs grafted either in the stria-



ESPEJO ET AL.



Figure 4. Co-grafting of 300.000 fetal mesencephatic cells (FMC) and 150,000 fibroblasts overexpressing neurotrophin-3 (NT3-3T3) or glial cell line-derived factor (GDNF-3T3), but not mock-transfected fibroblasts (mock-3T3), increased the number of surviving tyrosine hydroxylase-positive neurons in the rat striatum compared to the grafting of FMCs alone. The results are the mean \pm SEM of four animals for each group. Significances were determined by ANOVA, *F*(3, 12) = 6.3, p = 0.005, and post hoc DMS test (*p < 0.05, **p < 001, compared with FMC values).



Figure 5. Distribution of TH immunostaining in striatal co-grafts of 300,000 fetal mesencephalic cells (FMCs) and (A) 150,000 mock-transfected fibroblasts, (B) NT-3-producing fibroblasts, or (C) GDNF-producing fibroblasts. Arrow in (A) indicates the position of the graft. Asterisks and arrowheads in (B) indicate the position of fibroblasts and high density of TH+ neurons, respectively. Note in (C) the increase in TH immunoreactive fibers (brackets) surrounding the graft of FMCs and GDNF-producing fibroblasts. Sections were taken 7 days after grafting and were counterstained with hematoxylin. Scale bars = 100 μ m.

NEUROTROPHINS IN MESENCEPHALIC STRIATAL GRAFTS

Table 1. Number of TH+ Neurons in the Rat Striatum After Co-Grafting of Different Amounts of Fetal Mescephalon Cells (FMC) and Neurotrophin-3 (NT-3) or Mock-Transfected-3T3 Cells per Graft

| | FMC + 3T3/NT-3 | FMC + 3T3/Mock |
|---------------------------|---------------------|-----------------|
| 150,000 FMC + 200,000 3T3 | 1303 ± 233* (10.8%) | 92 ± 30 (0.8%) |
| 300,000 FMC + 150,000 3T3 | 1905 ± 387* (7.9%) | 287 ± 92 (1.2%) |

Percentages refer to surviving TH+ cells with respect to the dopaminergic cells grafted (8% of the total FMCs).

*p < 0.01 compared with mock-transfected 3T3 co-grafts; n = 4 for each group.

tum or in the substantia nigra, and (b) to improve motor asymmetry in 6-OHDA-lesioned animals. Although other neurotrophic factors, such as BDNF, improve behavioral performance, they have not shown increased survival or sprouting from TH+ FMCs (44,51,59). It has also been reported that NT-4, but not NT-3, induces sprouting and behavioral recovery from 6-OHDA lesions (21). However, there is a discrepancy concerning the effects of NT-3 as a survival factor for TH+ neurons derived from FMCs (21,27). While treatment of FMCs with NT-3 promotes the survival of TH+ cells in vitro (27) and in vivo (present results), intraparenchymal injections of NT-3 failed to enhance the survival of the TH+ cells in the grafts (21). Thus, our results suggest that the constant and local delivery of NT-3, newly made and delivered by the cell line, is more effective at maintaining TH+ FMCs.

Interestingly, and unlike the effects of NT-3, our results also show that GDNF is able to induce sprouting of TH+ fibers in the host striatal tissue surrounding the graft of FMC + GDNF-3T3. These findings are consistent with previous reports showing the induction of sprouting of TH+ FMCs by GDNF (3,19,43,45,48, 50,51,56), but not by NT-3 (21). Similar effects on dopaminergic neuron sprouting have been described for GDNF-expressing fibroblasts grafted either in the striatum or the substantia nigra (1,41). Moreover, because high doses of GDNF (or proximity to the GDNF graft) are required for the induction of sprouting of TH+ fibers (1,5), our results suggest that high levels of GDNF were available in the tissue, and that differences between GDNF and NT-3 reflect either differences in the responsiveness of TH+ cells at a certain development stage or diverse biological activities of these molecules. Both GDNF and NT-3 may act sequentially on developing dopaminergic neurons to sculpt their final mature phenotype. In that case, strategies including a sequential treatment of FMCs with neurotrophic factors or exposure of FMCs to a combination of factors, including GDNF, NT-3, and probably others like BDNF (2,35,44,59), either before and during the early phases of transplantation, may enhance the survival, integration, and performance of dopaminergic cells in the host brain. In that way, NT-3 and GDNF could thus be candidates for the transplantational treatment of Parkinson's disease.

ACKNOWLEDGMENTS: This study was financed by FIS 95/ 0188 and FIS 97/0642. The authors are grateful to all the members of the Unitat de Bioquímica, Campus de Bellvitge and the group of Dr. J. Alberch, Dep. Biologia Cellular, Fac. Medicina (U.B.) for valuable discussions, support, and delivering of transfected fibroblasts. They are also grateful to Robin Rycroft for English language revision. M. Espejo was the recipient of a grant from Fundació Pi i Suñer, Bellvitge, Barcelona.

REFERENCES

- Åkerud, P.; Alberch, J.; Eketjäll, S.; Wagner, J.; Arenas, E. Differential effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin on developing and adult substantia nigra dopaminergic neurons. J. Neurochem. 73:70– 78; 1999.
- Altar, C. A.; Boylan, C. B.; Jackson, C.; Hershenson, S.; Miller, J.; Wiegand, S. J.; Lindsay, R. M.; Hyman, C. Brain-derived neurotrophic factor augments rotational behavior and nigrostriatal dopamine turnover in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11347–11351; 1992.
- Apostolides, C.; Sanford, E.; Hong, M.; Mendez, I. Glial cell line-derived neurotrophic factor improves intrastriatal graft survival of stored dopaminergic cells. Neuroscience 83:363–372; 1998.
- Arenas, E.; Persson, H.; Neurotrophin-3 prevents the death of adult central noradrenergic neurons in vivo. Nature 367:368–371; 1994.
- Arenas, E.; Trupp, M.; Åkerud, P.; Ibañez, C. F. GDNF prevents the degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. Neuron 15:1465– 1473; 1995.
- Baloh, R. H.; Tansey, M. G.; Lampe, P. A.; Fahrer, T. J.; Enomoto, H.; Simburger, K. S.; Leitner, M. L.; Araki, T.; Johnson, E. M., Jr.; Milbrandt, J. Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRe3–RET receptor complex. Neuron 21:1291–1302; 1998.
- Baumgartner, B. J.; Shine, H. D. Targeted transduction of CNS neurons with adenoviral vectors carrying neurotrophic factor genes confers neuroprotection that exceeds the transduced population. J. Neurosci. 17:6504–6511; 1997.
- Beck, K.; Valverde, J.; Alexi, T.; Poulsen, K.; Moffat, B.; Vandlen, R.; Rosenthal, A.; Hefti, F. Mesencephahc dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-in-

52

duced degeneration in the adult brain. Nature 373:339-341; 1995.

- Bilang-Bleuel, A.; Revah, F.; Cohn, P.; Locquet, I.; Robert, J. J.; Mallet, J.; Horellou, P. Intrastriatal injection of an adenoviral vector expressing glial-cell-line-derived neurotrophic factor prevents dopaminergic neuron degeneration and behavioral impairment in a rat model of Parkinson disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:8818– 8823; 1997.
- Björklund, A. Dopaminergic transplants in experimental parkinsonism: Cellular mechanisms of graft-induced functional recovery. Curr. Opin. Neurobiol. 2:683–689; 1992.
- Bowencamp, K. E.; Hoffman, A. F.; Gerhardt, G. A.; Henry, M. A.; Biddle, P. T.; Hoffer, B. J.; Granholm, A. C. E. Glial cell line-derived neurotrophic factor supports survival of injured midbrain dopaminergic neurons. J. Comp. Neurol. 355:479–489; 1995.
- Brundin, P.; Duan, W-M.; Sauer, H. Functional effects of mesencephahc dopamine neurons and adrenal chromaffin cells grafted to the rodent striatum. In: Dunnett, S. B.; Björklund, A., eds. Functional neural transplantation. New York: Raven Press; 1994:9–46.
- Choi-Lundberg, D. L.; Lin, Q.; Chang, Y-N.; Chiang, Y. L.; Hay, C. M.; Mohajeri, H.; Davidson, B. L.; Bohn, M. C. Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF therapy. Science 275:838–841; 1997.
- Clarkson, E. D.; Zawada, W. M.; Freed, C. R. GDNF improves survival and reduces apoptosis in human embryonic dopaminergic neurons in vitro. Cell Tissue Res. 289: 207–210; 1997.
- Dunnett, S. B.; Björklund, A. Staging and dissection of rat embryos. In: Dunnett, S. B.; Björklund, A., eds. Neural transplantation—a practical approach. London: IRL; 1992:1–19, 57–78.
- Enokido, Y.; de Sauvage, F.; Hongo, J. A.; Ninkina, N.; Rosenthal, A.; Buchman, V. L.; Davies, A. M. GFR alpha-4 and the tyrosine kinase Ret form a functional receptor complex for persephin. Curr. Biol. 8:1019–1022; 1998.
- Espejo, M.; Ambrosio, S.; Llorens, J.; Cutillas, B. Intrastriatal grafts of fetal mesencephalic cell suspensions in MPP*-lesioned rats: A microdialysis study in vivo. Neurochem. Res. 23:1217–1223; 1998.
- Freed, W. J.; Perlow, M. J.; Karouni, F.; Sieger, A.; Olson, L.; Hoffer, B. J.; Wyatt, R. J. Restoration of dopaminergic function by grafting of fetal rat substantia nigra to the caudate nucleus: Long-term behavioral, biochemical, and histochemical studies. Ann. Neurol. 8:510–519; 1980.
- Granholm, A. C.; Mott, J. L.; Bowenkamp, K.; Eken, S.; Henry, S.; Hoffer, B. J.; Lapchak, P. A.; Palmer, M. R.; van Home, C.; Gerhardt, G. A. Glial cell line-derived neurotrophic factor improves survival of ventral mesencephalic grafts to the 6-hydroxydopamine lesioned striatum. Exp. Brain Res. 116:29–38; 1997.
- Hagg, T. Neurotrophins prevent death and differentially affect tyrosine hydroxylase of adult rat nigrostriatal neurons in vivo. Exp. Neurol. 149:183–192; 1998.
- Haque, N. S.; Hlavin, M. L.; Fawcett, J. W.; Dunnett, S. B. The neurotrophin NT4/5, but not NT3, enhances the efficacy of nigral grafts in a rat model of Parkinson's disease. Brain Res. 712:45-52; 1996.
- Hefti, F. Neurotrophic factor therapy for nervous system degenerative diseases. J. Neurobiol. 25:1418–1435; 1994.
- 23. Herman, J. P.; Abrous, N. D. Dopaminergic neural grafts

after fifteen years: Results and perspectives. Prog. Neurobiol. 44:1-35; 1994.

- Hoffer, B. J.; Hoffman, A.; Bowenkamp, K.; Huettl, P.; Hudson, J.; Martin, D.; Lin, L. F. H.; Gerhardt, G. A. Glial cell-line-derived neurotrophic factor reverses toxininduced injury to midbrain dopaminergic neurons in vivo. Neurosci. Lett. 182:107-111; 1994.
- Horger, B. A.; Nishimura, M. C.; Armanini, M. P.; Wang, L. C.; Poulsen, K. T.; Rosenblad, C.; Kirik, D.; Moffat, B.; Simmons, L.; Johnson, E., Jr.; Milbrandt, J.; Rosenthal, A.; Björklund, A.; Vandlen, R. A.; Hynes, M. A.; Phillips, H. S. Neurturin exerts potent actions on survival and function of midbrain dopaminergic neurons. J. Neurosci. 18:4929–4937; 1998.
- Hyman, C.; Hofer, M.; Barde, Y. A.; Juhasz, M.; Yancopoulos, G.; Squinto, S. P.; Lindsay, R. M. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. Nature 350:339–341; 1991.
- Hyman, C.; Juhasz, M.; Jackson, C.; Wright, P.; Lp, N. Y.; Lindsay, R. M. Overlapping and distinct actions of the neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4/5 on cultured dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalon. J. Neurosci. 14:335–347; 1994.
- Ibañez, C. F. Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. Trends Neurosci. 21:438–444; 1998.
- 29. Jing, S.; Wen, D.; Yu, Y.; Holst, P. L.; Luo, Y.; Fang, M.; Tamir, R.; Antonio, L.; Hu, Z.; Cupples, R.; Louis, J. C.; Hu, S.; Altrock, B. W.; Fox, G. M. GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-α, a novel receptor for GDNF. Cell 85:1113– 1124; 1996.
- Jung, A. B.; Bennett, J. P., Jr. Development of striatal dopaminergic function. Pre- and postnatal development of striatal and cortical mRNAs for the neurotrophin receptors trkBTK+ and trkc and their regulation by synaptic dopamine. Dev. Brain Res. 94:133-143; 1996.
- 31. Klein, R. D.; Sherman, D.; Ho, W. H.; Stone, D.; Bennett, G. L.; Moffat, B.; Vandlen, R.; Simmons, L.; Gu, Q.; Hongo, J. A.; Devaux, B.; Poulsen, K.; Armanini, M.; Nozaki, C.; Asai, N.; Goddard, A.; Phillips, H.; Henderson, C. E.; Takahashi, M.; Rosenthal, A. A GPI-linked protein that interacts with Ret to form a candidate neurturin receptor. Nature 387:717–720; 1997.
- Kntisel, B.; Rabin, S. J.; Hefti, F.; Kaplan, D. R. Regulated neurotrophin receptor responsiveness during neuronal migration and early differentiation. J. Neurosci. 14: 1542–1554; 1994.
- Kotzbauer, P. T.; Lampe, P. A.; Heuckeroth, R. O.; Golden, G. P.; Creedon, D. J.; Johnson, E. M.; Milbrandt, J. D. Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. Nature 384:467–470; 1996.
- Kupsch, A.; Oertel, W. H. Neural transplantation, trophic factors and Parkinson's disease. Life Sci. 55:2083–2095; 1994.
- 35. Levivier, M.; Przebdborski, S.; Bencsics, C.; Kang, U. J. Intrastriatal implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. J. Neurosci. 15:7810–7820; 1995.
- Liberatore, G. T.; Wong, Y. F.; Porritt, M. J.; Donnan, G. A.; Howens, D. W. Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA following mechanical injury to mouse striatum. Neuroreport 8:3097–3101; 1997.

ESPEJO ET AL.

NEUROTROPHINS IN MESENCEPHALIC STRIATAL GRAFTS

- Lin, L. F. H.; Doherty, D. H.; Lile, J. D.; Bektesh, S.; Collins, F. GDNF: A glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. Science 260: 1130–1132; 1993.
- Maisonpierre, P. C.; Belluscio, L.; Squinto, S.; Ip, N. Y.; Furth, M. E.; Lindsay, R. M.; Yancoploulos, G. D. Neurotrophin-3: A neurotrophic factor related to NGF and BDNF. Science 247:1146–1151; 1990.
- Mandel, R. J.; Spratt, S. K.; Snyder, R. O.; Leff, S. E. Midbrain injection of recombinant adeno-associated virus encoding rat glial cell line-derived neurotrophic factor protects nigral neurons in a progressive 6-hydroxydopamine-induced degeneration model of Parkinson's disease in rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:14083-14088; 1997.
- 40. Milbrandt J.; de Sauvage, F. J.; Fahrner, F.; Baloh, R. H.; Leitner, M. L.; Tansey, M. G.; Lampe, P. A.; Heuckeroth, R. O.; Kotzbauer, P. T.; Simburger, K. S.; Golden, J. P.; Davies, J. A.; Vejsada, R.; Kato, A. C.; Hyners, M.; Sherman, D.; Nishimura, M.; Wang, L. C.; Vandlen, R.; Moffat, B.; Klein, R. D.; Poulsen, K.; Gray, C.; Garces, A.; Johnson, E. M., Jr. Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. Neuron 20:245–253; 1998.
- Pérez-Navarro, E.; Arenas, E.; Reiriz, J.; Calvo, N.; Alberch, J. Glial cell line-derived neurotrophic factor protects striatal calbindin-immunoreactive neurons from excitotoxic damage. Neuroscience 75:345–352; 1996.
- Paxinos, G.; Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd ed. New York: Academic Press; 1982.
- Rosenblad, C.; Martinez-Serrano, A.; Björklund, A. Glial cell line-derived neurotrophic factor increases survival, growth and function of intrastriatal fetal nigral dopaminergic grafts. Neuroscience 75:979–985; 1996.
- 44. Šauer, H.; Fischer, W.; Nikkhah, G.; Wiegand, S. J.; Brundin, P.; Lindsay, R. M.; Björklund, A. Brain-derived neurotrophic factor enhances function rather than survival of intrastriatal dopamine cell-rich grafts. Brain Res. 626: 37–44: 1993.
- 45. Sauer, H.; Rosenblad, C.; Björklund, A. Glial cell linederived neurotrophic factor but not transforming growth factor β3 prevents delayed degeneration of nigral dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:8935–8939; 1995.
- 46. Sautter, J.; Tseng, J. L.; Braguglia, D.; Aebischer, P.; Spenger, C.; Seiler, R. W.; Widmer, H. R.; Zum, A. D. Implants of polymer-encapsulated genetically modified cells releasing glial cell line-derived neurotrophic factor improve survival, growth, and function of fetal dopaminergic grafts. Exp. Neurol. 149:230–236; 1998.
- Schaar, D. G.; Sieber, B. A.; Dreyfus, C. J.; Black, I. B. Regional and cell-specific expression of GDNF in rat brain. Exp. Neurol. 124:368–371; 1993.
- Sinclair, S. R.; Svendsen, C. N.; Torres, E. M.; Martin, D.; Fawcett, J. W.; Dunnett, S. B. GDNF enhances dopaminergic cell survival and fibre outgrowth in embryonic nigral grafts. Neuroreport 7:2547–2552; 1996.

- Strömberg, I.; Björklund, L.; Johansson, M.; Tomac, A.; Collins, F.; Olson, L.; Hoffer, B.; Humpel, C. Glial cell line-derived neurotrophic factor is expressed in the developing but not adult striatum and stimulates developing dopamine neurons in vivo. Exp. Neurol. 124:401–412; 1993.
- Sullivan, A. M.; Pohl, J.; Blunt, S. B. Growth/differentiation factor 5 and glial cell line-derived neurotrophic factor enhance survival and function of dopaminergic grafts in a rat model of Parkinson's disease. Eur. J. Neurosci. 10: 3681–3688; 1998.
- Tang, F. I.; Tien, L. T.; Zhou, F. C.; Hoffer, B. J.; Wang, Y. Intranigral ventral mesencephalic grafts and nigrostriatal injections of glial cell line-derived neurotrophic factor restore dopamine release in the striatum of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. Exp. Brain Res. 119:287– 296; 1998.
- Tomac, A.; Linquist, B.; Lin, L. F. H.; Ogren, S. O.; Young, D.; Hoffer, B. J.; Olson, L. Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. Nature 373:335–339; 1995.
- 53. Treanor, J.; Goodman, L.; Desauvage, F.; Stone, D. M.; Poulsen, K. T.; Beck, C. D.; Gray, C.; Armanini, M. P.; Pollock, R. A.; Hefti, F.; Phillips, H. S.; Goddard, A.; Moore, M. W.; Buj-Bello, A.; Davies, A. M.; Asai, N.; Takahashi, M.; Vandlen, R.; Henderson, C. E.; Rosenthal, A. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. Nature 382:80–83; 1996.
- Trupp, M.; Arenas, E.; Fainzilber, M.; Nilsson, A. S.; Sieber, B. A.; Grigoriou, M.; Kilkenny, C.; Salazar-Grueso, E.; Pachnis, V.; Arumae, U. Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto oncogene. Nature 381:785-788; 1996.
- 55. Trupp, M.: Belluardo, N.; Funakoshi, H.; Ibañez, C. F. Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-oncogene, and GDNF receptor-α indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS. J. Neurosci. 17:3554–3567; 1997.
- Wang, Y.; Tien, L. T.; Lapchak, P. A.; Hoffer, B. J. GDNF triggers fiber outgrowth of fetal ventral mesencephalic grafts from nigra to striatum in 6-OHDA-lesioned rats. Cell Tissue Res. 286:225–233; 1996.
- 57. Widenfalk, J.; Nosrat, C.; Tomac, A.; Westphal, H.; Hoffer, B.; Olson, L. Neurturin and glial cell line-derived neurotrophic factor receptor-β (GDNFR-β), novel proteins related to GDNF and GDNFR-α with specific cellular patterns of expression suggesting roles in the developing and adult nervous system and in peripheral organs. J. Neurosci. 17:8506–8519; 1997.
- Zhou, X. F.; Rush, R. A. Localization of neurotrophin-3like immunoreactivity in the rat central nervous system. Brain Res. 643:162–172; 1994.
- Zhou, X. F.; Bradford, H. F.; Stern, G. M. Influence of BDNF on the expression of the dopaminergic phenotype of tissue used for brain transplants. Dev. Brain Res. 100: 43-51; 1997.

ANNEX 3



Neuroscience Letters 275 (1999) 13-16

Neuroscience Letters

www.elsevier.com/locate/neulet

Exposure of foetal mesencephalic cells to bone morphogenetic protein-2 enhances the survival of dopaminergic neurones in rat striatal grafts

Mónica Espejo^a, Blanca Cutillas^b, Francesc Ventura^a, Santiago Ambrosio^{a,*}

^aUnitat de Bioquímica, Departament de Ciències Fisiològiques II, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, E-08907-L' Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

^bEscola Universitària d'Infermeria, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, E-08907-L' Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

Received 28 July 1999; received in revised form 24 August 1999; accepted 26 August 1999

Abstract

The transplantation of foetal mesencephalic cells (FMC) into the brain striatal system is an emerging treatment for Parkinson's disease, despite of the relatively poor survival of implanted cells. The ability of neurotrophic factors to regulate neurone survival and differentiation suggests they could be used to enhance the success of cerebral grafts. We analyzed the effect of pre-treatment of FMC suspensions with bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) (50 ng/ml) prior to grafting into the striatum of 6-hydroxydopamine lesioned rats. The viability of a FMC suspension was enhanced in vitro by BMP-2. Four weeks after transplantation, the number of dopaminergic neurones was higher and their morphology more developed in grafts pre-treated with BMP-2, compared with non-pre-treated grafts and rats showed a significant reduction in the turning behaviour test. Thus, the pre-treatment of FMCs with BMP-2 should be considered, together with other neurotrophic factors, as a procedure for transplantational treatment of Parkinson's disease. © 1999 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Bone morphogenetic protein-2; Foetal mesencephalic cells; Neuronal grafts; Dopamine; Tyrosine hydroxylase; Parkinson's disease

Transplantation of foetal neurones into a damaged adult brain is an increasing experimental and clinical practice. Parkinson's disease is one of the main targets for such a procedure, through the implantation of a suspension of foetal ventral mesencephalic cells (FMC) into the caudate/ putamen [8]. However, this procedure still runs up against several difficulties, such as the low survival rate of foetal neurones after grafting, due to many factors such as an unsuitable environment for the transplant [11,16]. There is general agreement that lack of neurotrophic support for these cells may be one of the reasons for failure [8]. Several growth factors have been described as potent survival and/or differentiation factors for ventral mesencephalic cells in culture (brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 and -4/5 (NT-3, NT-4/5), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and others) [6].

Exposure of cell suspensions to neurotrophic factors

before transplantation into a host brain could enhance the survival, differentiation and integration of grafted cells in an adult brain. PC12 cells previously exposed to nerve growth factor showed increased differentiation after transplantation [4]. It has also been described that the pre-treatment of nigral dopaminergic neurones with BDNF may improve their functional performance in transplants [20]. Since the addition of conditioned media from glia of the mesencephalon and striatum results in higher survival of dopaminergic cell survival is predominantly affected by as yet unknown growth factors derived from striatal and mesencephalic glia during development [7].

We [15] and others [10] have recently shown that bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) is a potent survival factor for ventral mesencephalic dopaminergic neurones in culture. BMPs are soluble factors that belong to the transforming growth factor superfamily [13]. They control a number of biological phenomena such as tissue repair, cell growth and differentiation during development. The brain

^{*} Corresponding author. Tel.: +34-393-402-9094; fax: +34-93-402-4268.

E-mail address: ambrosio@bellvitge.bvg.ub.es (S. Ambrosio)

^{0304-3940/99/\$ -} see front matter ${\ensuremath{\mathbb O}}$ 1999 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved. PII: S0304-3940(99)00708-9

M. Espejo et al. / Neuroscience Letters 275 (1999) 13-16

expresses high levels of BMP receptor type II, the BMP-2 receptor protein [17].

Here we studied the effect of pre-treatment of foetal ventral mesencephalic cells with BMP-2 on the viability of FMCs suspensions and on the survival and functionality of these cells after grafting into the striatum of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesioned rats.

Cell suspensions were prepared from ventral mesencephalon of 14-day-old rat embryos (E14), as described for their striatal implantation in rat models of Parkinson's disease [5]. Cells were resuspended in 50 µl of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing or not 50 ng/ml of BMP-2 to a final concentration of 20 000 cell/µl. The effect of the BMP-2 on the viability of the cell suspensions was assessed by fluorescence microscopy with orange acridine/ethidium bromide (1:1). Aliquots of the cell suspensions were analyzed at different incubation times (0, 1, 2 and 6 h). In grafting assays, FMCs were incubated for 3 h at 37°C in a stirring incubator in the presence of 50 ng/ml BMP-2. After centrifugation cells were resuspended, in the same medium, to a final concentration of 100 000 cells/µl. Control cells were incubated for an equal period without BMP-2. Four microlitres of the cell suspensions was stereotaxically injected into the right striatum (coordinates; A: +0.7, L: -3.2, H: -5 from bregma [14]) of animals that had been previously unilaterally lesioned by administration into the substantia nigra (coordinates: A: -4.8, L: -1.6, H: -7.8 from bregma [14]), of 6-OHDA (3 µl of 7µg/µl in saline solution containing 0.02% ascorbate) at a rate of 1 µl/min. The turning behaviour of the animals was analyzed 3 weeks after the lesion and 1 or 4 weeks after grafting. Ten minutes after the administration of apomorphine (0.05 mg/kg, s.c.), the number of turns was counted by two observers for 5 min. Only the animals that showed a rotational behaviour after administration of apomorphine (more than six turns/min) were used for transplantation. Survival, differentiation and function of grafted cells were analyzed 1 and 4 weeks after transplantation. Brain coronal slabs, corresponding to the striatum and substantia nigra, were processed for tyrosine hydroxylase (TH) immunocytochemistry according to the avidinebiotin-peroxidase method. TH+ neurones were counted in a Zeiss-Jenalumar microscope and extrapolated to the volume of an ellipsoid, corresponding to the striatal area occupied by the graft (about 0.06 mm³). Statistical comparisons were performed using non-parametric analysis and Mann-Whitney U post-hoc test.

FMC suspensions, incubated with BMP-2, maintained their viability for at least 6 h, whereas cells incubated without the factor (controls) significantly decreased their viability during the same time by 25% (Fig. 1). When grafted into the lesioned striata, the number of surviving TH+ FMC 1 week after the transplantation was significantly higher in those animals grafted with FMCs pre-treated with BMP-2 (1039 \pm 22 TH+ cells/graft), than in control cells (543 \pm 129 TH+ cells/graft) (Fig. 2), although this effect was not



Fig. 1. Percentage of viability of rat mesencephalic foetal cells with (\bullet) and without (\bigcirc) BMP-2 (50 ng/ml). Each point is the mean of three different experiments \pm SEM. **P* < 0.05 compared with the corresponding time in non-pre-treated FCMs.

reflected in turning behaviour (Fig. 3). One month after grafting, the survival differences between control and BMP-2 pre-treated cells were lower (846 ± 206 TH+ cells/graft in BMP-2 pre-treated, vs. 501 ± 122 TH+ cells/graft in control cells) (Fig. 2); however, animals grafted with pre-treated FMC showed a significant decrease in the turning behaviour test (Fig. 3).

TH+ cells in both groups showed a similar phenotype 1 week after transplantation, although a greater number of TH+ immunoreactive cells and fibres were observed in animals grafted with FMC exposed to BMP-2 (Fig. 4A,B). Four weeks after grafting, the phenotype of TH+ cells was



Fig. 2. Number of tyrosine hydroxylase positive neurons in rat striatal grafts 1 and 4 weeks after grafting. Effects of a 3-h-preincubation of FMCs in DMEM with (**II**) or without (**II**) 50 ng/ml BMP-2. The results are the mean of four animals for each group \pm SEM. **P* < 0.05 compared with non-pre-treated FCM grafted cells.



Fig. 3. Contralateral turns in 6-OHDA lesioned rats after apomorphine treatment are expressed as the percentage of number of turns after grafting related to the turns before grafting (35 \pm 3 turns/5 min, n = 16). The results are the mean of four animals for each group \pm SEM. *P < 0.05 compared with non-pre-incubated FCM grafted animals.

more differentiated in both groups: neurones were larger with more developed prolongations (Fig. 4C,D) than 1week transplants. However, BMP-2-pre-treated TH+ neurones showed an even larger and more spherical cell body than control cells (Fig. 4D). Control grafts also showed a larger macrophagic infiltration than grafts of cells pretreated with BMP-2.

M. Espejo et al. / Neuroscience Letters 275 (1999) 13–16

Access to growth factors for the transplanted neurones is one of the critical elements that determine their survival and integration in the host brain [11]. Neurotrophic factors such as GDNF [9], or BDNF [18], have been shown to improve graft survival when infused into the brain or supplied by transfected non-neuronal cells. Here we report that a member of another family of trophic factors, bone morphogenetic protein-2, also has a beneficial effect on the survival and function of ventral mesencephalic grafts. An important role for BMP-2 in neurone survival and differentiation is suggested by the presence of BMP-2 receptors in the central nervous system, as early as at E11 [20], their expression in the substantia nigra [17] and the effect of BMP-2 in mesencephalic neuronal cultures [10,15].

BMP-2 increased cell viability for several hours compared with control suspensions, which indicates a protective role for this factor against mesencephalic cell death. A decrease in the turning behaviour has been extensively described in 6-OHDA-lesioned rats after nigral grafts without treatment with growth factors [3], but always following larger or multiple grafts. In our study, functional recovery was found with small single grafts of mesencephalic cells pre-treated with BMP-2 but not in animals grafted with non-pre-treated cells.

At 7 days postgrafting only single neurites are identified in TH+ grafted neurones, whereas at 7 weeks postgrafting the axonal and cell bodies growth are largely developed [2]. During the development of grafts, TH+ neurones are



Fig. 4. Tyrosine hydroxylase immunostaining in rat striatal grafts of foetal mesencephalic cells 1 week (A,B) and 4 weeks (C,D) after the implant. Cells were pre-incubated for 3 h in a medium without trophic factor (A,C) or in a medium containing BMP-2 (50 ng/ml) (B,D). The TH+ FMC 1 month after grafting showed more developed morphology in comparison with TH+ cells in grafts after 1 week. Moreover, grafts of FMCs pre-treated with BMP-2 show longer and more spherical cell bodies (D). The arrows in (C) indicates peroxidase positive macrophages. All pictures correspond to the same magnification (x500), as can be checked by hematoxyline counterstained cells. Scale bar, 50 µm).

M. Espejo et al. / Neuroscience Letters 275 (1999) 13-16

present as early as 1 day after grafting but significant outgrowth into the host brain occurs by 8–10 days [1].

Most transplanted neurones die within the first 24 h [19] and continue to disappear during the first 7 days after transplantation, probably as a result of an inflammatory response due to the mechanical trauma, the low oxygen availability and/or the absence of appropriate survival factors [2]. The ratio of dopamine neurones surviving in mature mesencephalic suspension grafts relative to the total number of cells implanted initially has been estimated between 0.1 and 2% [8]. The beneficial effects of neurotrophic factors may come from a reduction in apoptotic cell death [12], as it has been demonstrated for GDNF [19]. Our results showed that, 1 week after grafting, the number of TH+ neurones was significantly higher in those animals that received BMP-2 pre-treated FMC.

In conclusion, the present study shows that pre-treatment of FMC with BMP-2 enhances the survival and functional integration of the cells into the striatum of 6-OHDAlesioned rats. Thus, the pre-treatment of FMC with BMP-2 may be considered in the neural transplantation procedure for the treatment of Parkinson's disease.

This work was supported by a grant from the Spanish government (PM 98/0183). M. Espejo is recipient of a fellowship from FIS (97/0642). We also thank R. Rycroft for language assistance. We are grateful for the help and suggestions of all the members of the Biochemistry Laboratory of our Department and for the valuable collaboration of the student S. Maya.

- [1] Abrous, N., Guy, J., Vigny, A., Calas, M., LeMoal, M. and Herman, J.P., Development of intracerebral dopaminergic grafts: a combined immunohistochemical and autoradiographic study of its time course and environmental influences. J. Comp. Neurol., 273 (1988) 26–41.
- [2] Barker, R.A., Dunnett, S.B., Faissner, A. and Fawcett, J.W., The time course of loss dopaminergic neurons and the gliotic reaction surrounding grafts of embryonic mesencephalon to the striatum. Exp. Neurol., 141 (1996) 79–93.
- [3] Brundin, P., Duan, W.-M. and Sauer, H., Functional effects of mesencephalic dopamine neurons and adrenal chromaffin cells grafted to the rodent striatum. In S.B. Dunnett and A. Björklund (Eds.), Functional Neural Transplantation, Raven Press, New York, 1994, pp. 9–46.
- [4] Chen, X.L., Roisen, F.G. and Gupta, M., The effect of prior in vitro exposure of donor cells to trophic factors in neurotransplantation. Exp. Neurol., 138 (1996) 64–72.

- [5] Dunnett, S.B. and Björklund, A., Staging and dissection of rat embryos. In Dunnett, S.B., Björklund, A. (Eds.), Neural Transplantation – A Practical Approach, IRL, Oxford, 1992, pp. 1–19 /57–78.
- [6] Engele, J., Changing responsiveness of developing midbrain dopaminergic neurons for extracellular growth factors. J. Neurosci. Res., 51 (1998) 508–516.
- [7] Engele, J., Spatial and temporal growth factor influences on developing midbrain dopaminergic neurons. J. Neurosci. Res., 53 (1998) 405–414.
- [8] Herman, J.P. and Abrous, N.D., Dopaminergic neural grafts after fifteen years: results and perspectives. Prog. Neurobiol., 44 (1994) 1–35.
- [9] Johansson, M., Friedemann, M., Hoffer, B. and Strömberg, I., Effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on developing and mature ventral mesencephalic grafts in oculo. Exp. Neurol., 134 (1995) 25–34.
- [10] Jordan, J., Büttner, M., Schluesener, H.J., Unsicker, K. and Krieglstein, K., Bone morphogenetic proteins: neurotrophic roles for midbrain dopaminergic neurons and implications of astroglial cells. Eur. J. Neurosci., 9 (1997) 1699–1710.
- [11] Kupsch, A. and Oertel, W.H., Neural transplantation, trophic factors and Parkinson's disease. Life Sci., 55 (1994) 2083– 2095.
- [12] Mahalik, T.J., Hahn, W.E., Clayton, G.H. and Owens, G.P., Programmed cell death in developing grafts of foetal substantia nigra. Exp. Neurol., 129 (1994) 27–36.
- [13] Massagué, J., TGF-β signal transduction. Annu. Rev. Biochem., 67 (1998) 753–791.
- [14] Paxinos, G. and Watson, C., The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd edn., Academic Press, New York, 1982.
- [15] Reiriz, J., Espejo, M., Ventura, F., Ambrosio, S. and Alberch, J., Bone morphogenetic protein-2 promotes dissociated effects on the number and differentiation of cultured ventral mesencephalic dopaminergic neurons. J. Neurobiol., 38 (1999) 161–170.
- [16] Rosenstein, J.M., Why do neural transplants survive? Exp. Neurol., 133 (1995) 1–6.
- [17] Söderström, S., Bengtsson, H. and Ebendal, T., Expression of serine/threonine kinase receptors including the bone morphogenetic factor type II receptor in the developing and adult rat brain. Cell Tissue Res., 286 (1996) 269–279.
- [18] Yurek, D.M., Lu, W., Hipkens, S. and Wiegand, S.J., BDNF enhances the functional reinnervation of the striatum by grafted foetal dopamine neurons. Exp. Neurol., 137 (1996) 105–118.
- [19] Zawada, W.M., Zastrow, D.J., Clarkson, E.D., Adams, F.S., Bell, K.P. and Freed, C.R., Growth factors improve immediate survival of embryonic dopamine neurons after transplantation into rats. Brain Res., 786 (1998) 96–103.
- [20] Zhang, D., Mehler, M.F., Song, Q. and Kessler, J.A., Development morphogenetic protein receptors in the nervous system and possible regulating trkC expression. J. Neurosci., 1 (1998) 3314–3328.

ANNEX 4



Brain Research 695 (1995) 151-157

Research report

Chronic effects of single intrastriatal injections of 6-hydroxydopamine or 1-methyl-4-phenylpyridinium studied by microdialysis in freely moving rats

A. Espino ^a, B. Cutillas ^b, A. Tortosa ^c, I. Ferrer ^c, R. Bartrons ^a, S. Ambrosio ^{a,*}

^a Unitat de Bioquímica, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain
^b Escola d'Infermeria, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain
^c Unitat de Neuropatologia, Hospital Prínceps d'Espanya, Barcelona, Spain

Accepted 23 May 1995

Abstract

Extracellullar dopamine (DA) and its main cerebral metabolites, dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA), were measured by bilateral striatal microdialysis in rats at different times (2, 7, 15 and 60 days) after unilateral administration into the right striatum of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) or 6-hydroxydopamine (6-OHDA). In both cases the decrease in extracellullar dopamine did not exceed 40% of control values. The response of DOPAC and HVA depended on the treatment: MPP⁺ caused a marked acute decrease in the dopamine metabolites but allowed a progressive recovery that was very evident after 60 days; 6-OHDA caused a progressive decrease in the dopamine metabolites throughout the two months of the study. Tyrosine hydroxylase immunostaining revealed severe neuronal loss in substantia nigra two months after striatal administration of 6-OHDA, whereas no significant neuronal loss was found at the same time after MPP⁺ administration. A bilateral challenge infusion of MPP⁺ through the microdialysis probe was used to assess the dopaminergic capacity of both striata: at all the times studied there was a sharp depletion of DA on the non-lesioned side; both MPP⁺- and 6-OHDA-treated striata were unresponsive after a short time (2 days); after 2 months the response in MPP⁺-lesioned rats was similar on both sides, whereas the effects of 6-OHDA were not. These results suggest that neurotoxins causing striatal dopamine loss may act through different mechanisms, which could be significant for the etiopathogenic development of Parkinson's disease.

Keywords: 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion; 6-Hydroxydopamine; Microdialysis; Striatum; Rat; Parkinsonism

1. Introduction

Intracerebral administration of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) or 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) has been extensively used to induce selective lesions in catecholaminergic systems in order to mimic neurological pathologies in experimental animals. The injection of 6-OHDA in the substantia nigra or in the medial forebrain bundle of rats [15] or the injection of MPP⁺ in the substantia nigra [6] leads to degeneration of dopaminergic neurons and a subsequent loss of striatal dopamine. When 6-OHDA is injected into the rat striatum, a retrograde degeneration of nigrostriatal neurons is induced [5], most probably by free radical overproduction [8]. MPP⁺ is the main metabolite and it is responsible for most of the toxic effects of the parkinson-inducing drug MPTP [25]. The mechanisms of action of MPP⁺ appear to begin in dopaminergic nerve endings, where it is taken up [14] and retroaxonally transported to the substantia nigra [7]. Acute administration of 10 mM MPP⁺ through a microdialysis probe [21] or by direct intrastriatal injection [3,11] causes a dramatic release of dopamine and a decrease in its metabolites measured by microdialysis in vivo.

Here we report the chronic effects for two months of a single, unilateral intrastriatal injection of 6-OHDA or MPP⁺ on the release of dopamine and its main metabolites, dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA). The time-course of the lesion was studied by microdialysis in awake, unrestrained rats. Our aim was to elucidate the mechanisms of chemically induced degeneration of the nigrostriatal pathway mediated by two neurotoxins frequently used to produce experimental models of parkinsonism. Although both neurotoxins act

BRAIN RESEARCH

^{*} Corresponding author. Unitat de Bioquímica, Facultat d'Odontologia, Universitat de Barcelona, c/ Feixa Llarga s/n, 08907-Hospitalet del Llobregat (Bellvitge), Barcelona, Spain. Fax: (34) (3) 4024212.

^{0006-8993/95/\$09.50 © 1995} Elsevier Science B.V. All rights reserved SSDI 0006-8993(95)00705-9

A. Espino et al. / Brain Research 695 (1995) 151-157

on the dopaminergic system, their mechanisms of action must be different, as suggested by the study of the timecourse, the recovery from the lesions and the affectation of the substantia nigra.

2. Material and methods

2.1. Animals and treatments

Male Sprague–Dawley rats, weighing 250–350 g, were used for all the experiments. The care and use of these animals were in accordance with the policy on the use of animals in neuroscience research published by the Society for Neuroscience. The protocols were approved by a review committee of the University of Barcelona under supervision of the Government of Catalunya.

Animals were anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg i.p.) and placed in a stereotaxic instrument (David Kopf Instruments, Palo Alto, CA, USA) with the upper incisor bar set 3.3 mm under the interaural line. Different groups of animals were injected with MPP+ iodide (12 µg, Research Biochemicals, Inc., Natick, MA, USA) or 6-hydroxydopamine (32 μ g, Sigma Chemical CO., St. Louis, Mo, USA) into the right striatum (coordinates A: +0.7, L: +2.8, H: -5, according to the Atlas of Paxinos and Watson [18]), in a volume of 4 μ l at a flowrate of 1 μ l/min. These amounts cause a similar reduction of striatal dopamine measured 48 h after administration [10,11]. 6-OHDA was prepared daily, divided into aliquots and frozen until use. A group of sham-operated rats injected with saline solution was used as control. The left striatum of lesioned rats received also 4 µl of 0.9% NaCl (containing 10 mM NaI in MPP+ treated animals). The experiments were carried out in three or four rats for each time period (2, 7, 15, and 60 days) in MPP+ and 6-OHDA lesions.

2.2. Microdialysis procedure

Dialysis probes were constructed as described by Adell and Artigas [2]. Briefly they consist of two lengths of fused silica tubing (inner diameter [ID] 40 μ m; outer diameter [OD] 140 μ m) inserted into a stainless steel tube (ID 300 μ m; OD 500 μ m; A-M Systems, Everett, USA). Cuprophan hollow fibers (Enka AG, Wuppertal, Germany) were cemented into the distal end of the stainless steel tubing and used as dialysis membrane (4 mm long). The recovery of these probes in vitro, at 1.25 μ l/min and room temperature, varied between 4.0% and 8.0% depending on the compound, in accordance with published results [28].

The microdialysis recording was performed in different groups of treated animals on the established days. The probes were stereotaxically implanted 24 h before sample collection in both striatal nuclei (A: +0.7, L: ± 2.8 , H:

-0.7) under chloral hydrate anesthesia (400 mg/kg, i.p.), and they were fixed with dental cement and two screws on the skull of the rat.

At the moment of collection of the dialysis samples the rats were awake and freely moving. At 9 a.m. the inlet polyethylene tube to a 1 ml disposable syringe driven by a microinfusion pump (Harvard Apparatus 22). The outlet tubes were connected by the same kind of polyethylene tubes to small collecting eppendorfs. An artificial cerebrospinal fluid containing 119.5 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 1.27 mM CaCl₂, 1.19 mM KH₂PO₄, 1.19 mM MgSO₄, 1.6 mM Na₂HPO₄ at pH 7.2 [4], was perfused through the microdialysis probes at a constant flow of 1.25 μ l/min.

The right (lesioned) and left (contralateral) striata were perfused at the same time under identical conditions. The samples were collected on an ice-cooled bath every 20 min for 4 h, and immediately frozen until assay. To obtain stable baseline concentrations the samples were taken 30 min after perfusion began.

After the 4th sample both striata were perfused with MPP⁺ (10 mM in artificial CSF), in order to evaluate the response to a dopamine-depletor in both (lesioned and non-lesioned) sides.

Rats were killed by decapitation after receiving an overdose of chloral hydrate at the end of the experiment.

2.3. Morphological studies

Morphological studies were carried out in 6-OHDA and MPP⁺ treated animals after 60 days of the treatment. The animals were anesthetized with chloral hydrate (i.p.) and perfused through the heart with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer. The brains were rapidly removed and fixed in a similar solution for 24 h. Coronal slabs including the substantia nigra were processed for tyrosine hydroxylase immunohistochemistry following the avidin-biotin-peroxidase method (ABC Kit, Vectastain, Vector). Tissue reaction was treated with 0.05% saponin, followed by methanol and hydrogen peroxide, and finally with normal horse serum. The sections were then incubated overnight at 4°C with a well-characterized monoclonal antibody against tyrosine hydroxylase (MAB 318, Chemicon) used at a dilution of 1:200. The peroxidase reaction was visualized with 0.05% diaminobenzidine and 0.01% hydrogen peroxide. False positive results were ruled out by incubating a few tissue sections without the primary antibody.

2.4. Analytical procedures

The microdialysis samples (20 μ l) were analyzed directly by reverse-phase HPLC coupled to an electrochemical detector. To separate dopamine and its metabolites a nucleosil C-18 reverse phase column (5 μ m, 250 × 4.6 mm, Tracer) was used. The mobile phase consisted of 50 mM sodium acetate, 25 mM citric acid, 0.7 mM octanesul-



A. Espino et al. / Brain Research 695 (1995) 151-157

Fig. 1. DA, DOPAC and HVA concentrations in striatum dialysates of control rats and rats unilaterally lesioned with MPP⁺, expressed as the mean (nM) \pm S.E.M., at different times after the lesion. Values are the mean \pm S.E.M. of 4 rats for each time. For each animal, values were the average of 4 consecutive microdialysis samples. * P < 0.05, ** P < 0.01 with ANOVA and post-hoc Scheffé test.

fonic acid and 14% methanol at pH 4.1 at a flowrate of 0.65 ml/min delivered by a Pharmacia-LKB Pump 2248 working in isocratic conditions. A dual electrochemical electrode (ESA Coulochem II, Bedford, MA, USA) was used with a conditioning cell at -100 mV, an applied potential of +50 mV at the first electrode and +300 mV at the second electrode [1]. Detection was performed at 100 nA except for DA in basal dialysates, which was performed at 10 nA. All the standards were purchased

from Sigma: dopamine, homovanillic acid (HVA), dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC).

2.5. Data analysis

All measurements of the chromatograms were carried out with Nelson software coupled to HPLC-manager software (Pharmacia-LKB). Statistical comparisons were performed using analysis of variance (ANOVA) with post-hoc



Fig. 2. DA, DOPAC and HVA concentrations in striatum dialysates of control rats and rats unilaterally lesioned with 6-OHDA, expressed as the mean (nM) \pm S.E.M., at different times after the lesion. Values are the mean \pm S.E.M. of 4 animals for each time. For each rat, values were the average of 4 consecutive microdialysis samples. * P < 0.05, ** P < 0.01 with ANOVA and post-hoc Scheffé test.

A. Espino et al. / Brain Research 695 (1995) 151-157



Fig. 3. Effect of bilateral infusion of MPP⁺ in MPP⁺-lesioned rats. Profiles of DA and DOPAC concentrations in striatal dialysates in the MPP⁺-lesioned side (\bigcirc) are compared with the contralateral non-lesioned side (\bigcirc), at 2 days (A) and 60 days (B) after the lesion. Values are expressed as a percentage \pm S.E.M. (n = 3) of the mean of 4 basal dialysates, considering 100% the mean of basal values in non-lesioned sides. The beginning of bilateral infusion of MPP⁺ is indicated with an arrow. Significance of differences was calculated by non-parametric analysis and U-Mann–Whitney test ($\star P < 0.05$; $\star P < 0.01$) when referred to basal values, and by Kruskall–Wallis plus Wilcoxon test ($\Rightarrow P < 0.05$) when both sides were compared.



Fig. 4. Effect of bilateral infusion of MPP⁺ in 6-OHDA-lesioned rats. Profiles of DA and DOPAC concentrations in striatal dialysates in the 6-OHDA lesioned side (\bigcirc) compared with the contralateral non-lesioned side (\bigcirc), at 2 days (A) and 60 days (B) after the lesion. Values are expressed as a percentage ±S.E.M. (n = 3) of the mean of 4 basal dialysates, considering 100% the mean of basal values in non-lesioned sides. The beginning of bilateral infusion of MPP⁺ is indicated with an arrow. Significance of differences was calculated by non-parametric analysis and U-Mann-Whitney test (* P < 0.05; ** P < 0.01) when referred to basal values, and by Kruskall–Wallis plus Wilcoxon test ($\Rightarrow P < 0.05$) when both sides were compared.

tests (Scheffé F-test) and non-parametric analysis with U-Mann-Whitney test and Kruskall–Wallis plus Wilcoxon test to compare percentages.

3. Results

3.1. Dopamine and metabolites concentrations in striatal dialysates

Figs. 1 and 2 show the time-course of dialysate values at different times after the lesion with MPP⁺ or 6-OHDA respect to control rats given physiological saline solution. In neither 6-OHDA nor MPP⁺-treated animals did the decrease in extracellular DA exceed 40%, and such decreases were significant in only few cases. The decreases in DOPAC and HVA were very marked in MPP⁺-treated animals during the first week after treatment, but almost complete recovery was found after 2 months (Fig. 1). In contrast, in 6-OHDA-treated animals, values of extracellular DOPAC and HVA decreased progressively to 5% and 13% of control values after two months (Fig. 2).

3.2. Extracellular measurement after MPP + infusion

Two days after the neurotoxin administration bilateral perfusion of MPP⁺ caused a massive depletion of DA in the intact (left) striatum, whereas the right striatum was almost unresponsive in MPP⁺- (Fig. 3) and 6-OHDA-(Fig. 4) lesioned animals. On the other hand, in MPP⁺

treated animals both striata responded similarly to MPP⁺ after 60 days of lesion (Fig. 3), but the lesioned side was still unresponsive in 6-OHDA treated animals (Fig. 4). DOPAC and HVA were systematically lower in the contralateral side of 6-OHDA-treated animals than in shamoperated control animals (data not shown), indicating a contralateral effect of 6-OHDA or related toxic products, such as free oxygen radicals, in agreement with previous reports [5].

MPP⁺ perfusion caused a marked decrease in extracellular DOPAC in the unlesioned side, probably because of the action of MPP⁺ as monoamine oxidase inhibitor. On the lesioned side this effect was hardly evident at 48 h. After 60 days both sides showed a similar pattern for DOPAC in MPP⁺-treated animals, whereas 6-OHDA-lesioned striata showed very low DOPAC levels throughout the perfusion. Analogous results to those of DOPAC were obtained for HVA (data not shown).

In Figs. 3 and 4 curves of a complete dialysis session at 48 h and at 60 days after a MPP⁺ or 6-OHDA lesion are shown. The recovery in MPP⁺ treated rats was progressive for 7, 15 and 60 days (results not shown). The experiments were carried out in 3 rats for each time and drug.

3.3. Morphological studies

As shown in Fig. 5 a mild decrease in the number of tyrosine hydroxylase-immunoreactive cells occurred in the ipsilateral substantia nigra 2 months after intrastriatal injection of MPP⁺ (193.1 \pm 8.3 cells/mm²) when compared



Fig. 5. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra of control side (A) and at 2 months following intrastriatal injection of MPP⁺ (B) or 6-OHDA (C). Decrease numbers of immunoreactive cells, together with increased size of neurons, is seen in the substantia nigra following injection of 6-OHDA, when compared with MPP⁺-treated rats and age-matched controls (bar = 100 μ m).

with the non-lesioned side (217.5 \pm 9.6). A marked decrease in the number of immunoreactive cells was observed in the substantia nigra 2 months after intrastriatal injection of 6-OHDA (52.6 \pm 6.2). However, the cells remaining were larger in animals treated with 6-OHDA than in MPP⁺-treated rats and controls.

4. Discussion

The decreases in extracellular dopamine did not exceed 40% in either MPP⁺ or 6-OHDA treatments. The extracellular dopamine concentrations can apparently be partially maintained after a marked lesion to the dopaminergic system. Although the amount of neurotoxin injected intrastriatally is enough to cause a reduction in striatal dopamine to 30-40% in 48 h [11], the moderate decrease in extracellular DA concentration suggests that compensatory mechanisms may enhance the release of DA from the lesioned side. Similar results have been reported following lesions caused by 6-OHDA injected into the substantia nigra [19,20]. In fact, the clinical symptoms of Parkinson's disease appear only when about 90% of the striatal dopamine has been lost.

DOPAC and HVA were significantly reduced 48 h after both treatments. The greatest reduction was found in DOPAC values after MPP⁺, reflecting the action of MPP⁺ as monoamine oxidase inhibitor [24]. A progressive recovery was evident during the two months of the study in MPP⁺-treated animals, whereas dopamine function was dramatically reduced two months after 6-OHDA lesion.

The administration of MPP⁺ through the microdialysis probe in both striata caused a massive release of dopamine in non-lesioned striatum, as previously described [21], whereas the striatum lesioned with MPP⁺ or 6-OHDA was almost unresponsive, at least 48 h after the lesion. Striatal responsiveness to MPP⁺ was also described in a previous paper 1 month after intranigral administration of MPP⁺ [22]. In the present study, the response to MPP⁺ infusion in MPP⁺-lesioned striata depended on the time elapsed after the lesion, and was no different from controls after 2 months. Thus, there is a clear functional nigrostriatal recovery in MPP⁺-lesioned rats. In contrast, the release of dopamine after MPP⁺ infusion in 6-OHDA-lesioned striata was still practically negligible after 2 months.

According to our morphological results, it seems that injection of 6-OHDA into the terminal field of nigral dopaminergic neurons causes a progressive (and probably irreversible) degeneration of these cells. At 2 months only 24% of tyrosine hydroxylase immunoreactive cells remained on the lesioned side. The striatal dopamine content at this time was 16% of controls (result not shown). The larger size of the remaining cells could indicate hyperactivity of these cells as a compensatory response [29], probably responsible for the maintenance of stable concentrations of extracellular DA in the striatum. Thus, as has been described by different authors, 6-OHDA may be taken up by dopamine terminals and cause retroaxonal degeneration of substantia nigra [5,23].

MPP⁺ administered intrastriatally seems, however, to cause acute but not chronic nigrostriatal degeneration. After two months the population of immunoreactive nigral cells was near 90% (the striatal dopamine content was 67% of controls, data not shown). Contradictory results appear in the literature about the effect of intrastriatally infused MPTP or MPP+ on substantia nigra, depending mainly on the concentrations of toxin used [12,26]. MPP+ appears to be responsible for non-reversible parkinsonism in humans [16] and non-human primates [13], which seems to develop from caudate nucleus to substantia nigra. When it is applied to rats intrastriatally it causes a severe dopamine depletion and, as previously described [7], it is retroaxonally transported to the substantia nigra, but this effect might be at least partially counteracted. The results reported herein clearly show that striatal functionality in terms of dopamine and its extracellular metabolite concentrations, as measured by microdialysis, is in fact recovered 2 months after MPP⁺ but not after 6-OHDA lesions.

Inside the cell MPP⁺ may block mitochondrial activity or it may be sequestered by catecholaminergic vesicles, so that vesicular uptake may protect the substantia nigra against MPP⁺ toxicity [17,30]. In any case, whereas MPP⁺ and 6-OHDA cause a degeneration of nigrostriatal pathways, which allows the drugs to be used to reproduce experimental models of Parkinson's disease, their mechanisms of action are quite different and, in the case of MPP⁺, the reversibility of its effects together with the reported loss of selectivity [9,27] suggests that its relation with Parkinson's disease remains to be clarified.

Acknowledgements

We are indebted to Dr. F. Artigas and his team from the CSIC of Barcelona for their help in the development of microdialysis cannulae. We also thank our technician C. Ortuño, all the members of the Biochemistry Unit of our School and R. Rycroft for his language assistance. This study was supported by FIS 95-0188 and FIS 93-131 from the Spanish Government.

References

- Achilli, G., Perego, C. and Ponzio, F., Application of the dual-cell coulometric detector: a method for assaying monoamines and their metabolites, *Anal. Biochem.*, 148 (1985) 1-9.
- [2] Adell, A. and Artigas, F., Differential effects of clomipramine given locally or systemically on extracellular 5-hydroxytryptamine in raphe nuclei and frontal cortex. An in vivo microdialysis study, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 343 (1991) 237-244.
- [3] Ballarín, M., Reiriz, J., Ambrosio, S., Camps, M., Blesa, R. and Mahy, N., Acute effects of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion

A. Espino et al. / Brain Research 695 (1995) 151-157

(MPP⁺) on purine metabolism in rat striatum studied in vivo using the microdialysis technique, *Brain Res.*, 483 (1989) 184-187.

- [4] Benveniste, H. and Hüttemeier, P.C., Microdialysis Theory and application, *Prog. Neurobiol.*, 35 (1990) 195–215.
- [5] Berger, K., Przedborski, S. and Cadet, J.L., Retrograde degeneration of nigrostriatal neurons induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in rats, *Brain Res. Bull.*, 26 (1991) 301-307.
- [6] Bradbury, A.J., Costall, B., Domeney, A.M., Jenner, P., Kelly, M.E., Marsden, C.D. and Naylor, R.J., 1-Methyl-4-phenylpyridine is neurotoxic to the nigrostriatal dopamine pathway, *Nature*, 319 (1986) 56-57.
- [7] Campbell, K.J., Takada, M. and Hattori, T., Evidence for retrograde axonal transport of MPP⁺ in the rat, *Neurosci. Lett.*, 118 (1990) 151-154.
- [8] Cohen, G. and Heikkila, R.E., The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical and hydroxy radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid and related cytotoxic agents, *J. Biol. Chem.*, 249 (1974) 2447-2452.
- [9] Espino, A., Tortosa, A., Bendahan, G., Bartrons, R., Calopa, M., Ferrer, I. and Ambrosio, S., Stereotaxic administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) decreases striatal fructose 2,6-bisphosphate in rats, J. Neurochem., 62 (1994) 1913–1920.
- [10] Espino, A., Ambrosio, S., Bartrons, R., Bendahan, G. and Calopa, M., Cerebrospinal monoamine metabolites and amino acid content in patients with parkinsonian syndrome and rats lesioned with MPP⁺, J. Neural Transm. [P-D Sect], 95 (1994) 167-176.
- [11] Espino, A., Llorens, J., Calopa, M., Bartrons, R., Rodríguez-Farré, E. and Ambrosio, S., Cerebrospinal dopamine metabolites in rats after intrastriatal administraton of 6-hydroxydopamine or 1-methyl-4-phenylpyridinium ion, *Brain Res.*, 669 (1995) 19-25.
- [12] Gibb, W.R.G., Costall, B., Domeney, A.M., Kelly, M.E. and Naylor, R.J., The histological effects of intracerebral injection or infusion of MPTP and MPP⁺ in rat and mouse, *Brain Res.*, 461 (1988) 361-366.
- [13] Herkenham, M., Little, M.D., Bankiewicz, K., Yang, S.C., Markey, S.P. and Johannessen, J.N., Selective retention of MPP⁺ within the monoaminergic systems of the primate brain following MPTP administration: an in vivo autoradiographic study, *Neuroscience*, 40 (1991) 133-158.
- [14] Javitch, J.A. and Snyder, S.H., Uptake of MPP⁺ by dopamine neurons explains selectivity of parkinsonism-inducing neurotoxin MPTP, Eur. J. Pharmacol., 106 (1985) 455-456.
- [15] Jolicoeur, F.B. and Rivest, R. Rodent models of Parkinson's disease. In A.A. Boulton, G.B. Baker and R.F. Butterworth (Eds.), *Neuromethods 21, Animal Models of Neurological Diseases I*, Humana Press, Totowa, NJ, 1992, pp. 143–154.
- [16] Langston, J.W. and Irwin, I., MPTP: current concepts and controversies, *Clin. Neuropharmacol.*, 9 (1985) 485–507.
- [17] Liu, Y., Roghani, A. and Edwards, R.H., Gene transfer of a reserpine-sensitive mechanism of resistance to N-methyl-4-phenylpyridinium, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 (1992) 9074–9078.

- [18] Paxinos, G. and Watson, C., The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd edn., Academic Press, New York, 1982.
- [19] Robinson, T.E. and Whishaw, I.Q., Normalization of extracellular dopamine in striatum following recovery from a partial unilateral 6-OHDA lesion of the substantia nigra: a microdialysis study in freely moving rats, *Brain Res.*, 450 (1988) 209-224.
- [20] Robinson, T.E., Mocsary, Z., Camp, D.M. and Whishaw, I.Q., Time course of recovery of extracellular dopamine following partial damage to the nigrostriatal dopamine system, *J. Neurosci.*, 14 (1994) 2687–2696.
- [21] Rollema, H., Damsana, G., Horn, A.S., De Vries, J.B. and Westerink, B.H.C., Brain dialysis in conscious rats reveals an instantaneous massive release of striatal dopamine in response to MPP⁺. *Eur. J. Pharmacol.*, 126 (1986) 345–346.
- [22] Santiago, M., Westerink, B.H.C. and Rollema, H., Responsiveness of striatal dopamine release in awake animals after chronic 1methyl-4-phenylpyridinium ion-induced lesions of the substantia nigra, J. Neurochem., 56 (1991) 1336–1342.
- [23] Sauer, H. and Oertel, W.H., Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat, *Neuroscience*, 59 (1994) 401–415.
- [24] Singer, T.P., Salach, J.I. and Crabtree, D., Reversible inhibition and mechanism-based irreversible inactivation of monoamine oxidases by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 127 (1985) 707-712.
- [25] Singer, T.P., Castagnoli Jr., N., Ramsay, R.R. and Trevor A.J., Biochemical events in the development of parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, J. Neurochem., 49 (1987) 1-8.
- [26] Srivastava, R., Brouillet, E., Beal, M.F., Storey, E. and Hyman, B.T., Blockade of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) nigral toxicity in the rat by prior decortication or MK-801 treatment: a stereological estimate of neuronal loss, *Neurobiol. Aging*, 14 (1993) 295-301.
- [27] Westerink, B.H.C., Damsma, G., Rollema, H., De Vries, J.B. and Horn, A.S., Scope and limitations of in vivo brain dialysis: a comparison of its application to various neurotransmitter systems. *Life Sci.*, 41 (1987) 1763-1776.
- [28] Zetterström, T., Sharp, T., Marsden, C.A. and Ungerstedt, U., In vivo measurement of dopamine and its metabolites by intracerebral dialysis: changes after D-amphetamine, J. Neurochem., 41 (1983) 1769–1773.
- [29] Zigmond, M.J., Acheson, A.L., Stachowiak, M.K. and Stricker, E.M., Neurochemical compensation after nigrostriatal bundle injury in an animal model of preclinical parkinsonism, *Arch. Neurol.*, 41 (1984) 856–861.
- [30] Zuddas, A., Fascetti, F., Corsini, G.U. and Piccardi, M.P., In brown norway rats, MPP⁺ is accumulated in the nigrostriatal dopaminergic terminals but it is not neurotoxic: a model of natural resistance to MPTP toxicity, *Exp. Neurol.*, 127 (1994) 54–61.

ANNEX 5

Molecular Neuroscience

NeuroReport

NeuroReport 10, 2605-2608 (1999)

6-HYDROXYDOPAMINE (6-OHDA) administered intrastriatally to adult rats in a single injection causes neurodegeneration of the nigrostriatal pathway and loss of >50% of dopamine neurons in substantia nigra pars compacta 30 days after administration. The death of nigral neurons occurs, at least partially, by a caspasemediated mechanism. The nigral loss of dopaminergic neurons could be prevented by stereotaxical administration of zVAD.fmk, a caspase inhibitor, into the substantia nigra, indicating that 6-OHDA-induced nigrostriatal degeneration involves caspase activation. These results suggest that caspases are probably involved in neurodegenerative chronic processes such as Parkinson's disease and might be considered as possible targets in the treatment of such neurological disorders. NeuroReport 10:2605-2608 C 1999 Lippincott Williams & Wilkins.

Key words: Caspase; 6-Hydroxydopamine; Parkinson's disease; zVAD.fmk

Introduction

An emerging theory about the mechanisms involved in the progression of Parkinson's disease (PD) maintains that programmed cell death may play an important role in the pathogenesis of major neurodegenerative diseases [1]. Different reports show evidence of apoptosis in the substantia nigra pars compacta (SNpc) of post-mortem parkinsonian brains [2], but they are not conclusive in proving that an apoptotic process underlies the nigrostriatal degeneration involved in PD. In fact, other studies show no evidence of morphological apoptosis nor changes in bcl-2, bcl-x or bax protein expression in the SNpc of patients with PD [3]. This is not surprising, because PD is due to a neuronal degeneration that takes place over years, whereas apoptotic cell death takes place within a brief period of time. There is thus, in general, great difficulty in identifying cells with apoptotic morphology in a chronic degenerative disease, although they have been described in Alzheimer's and Huntington's diseases [4,5]. Increasing evidence indicates that PD degeneration proceeds in a retrograde manner [6] from caudate-putamen to SNpc. This seems particularly true for MPTP-induced parkinsonism, as assessed by PET studies [7].

The family of cysteine-aspartyl-specific proteases, known as caspases, appears to be required for the 0959-4965 © Lippincott Williams & Wilkins

Caspase inhibition protects nigral neurons against 6-OHDA-induced retrograde degeneration

Blanca Cutillas, Mónica Espejo, Joan Gil, Isidre Ferrer¹ and Santiago Ambrosio^{CA}

Unitat de Bioquímica, Departament de Ciències Fisiològiques II and ¹Unitat de Neuropatologia, Departament de Biologia Cellular i Anatomia Patològica, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Feixa Llarga s/n, Hospitalet del Llobregat-08907 (Barcelona), Spain

CACorresponding Author

execution of apoptosis [8]. These proteases have been proposed as a treatment target in neurodegenerative diseases [9]. Inhibition of caspases has been shown to reduce *in vivo* cerebral ischemic damage [10] and ALS symptoms in neurodegenerative disorders in transgenic mice expressing mutant SOD-1 [11].

N-benzoiloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe)-fluoromethylketone (z-VAD.fmk) is a broad specificity irreversible caspase inhibitor [12] which has been reported to be effective in animal models of stroke, myocardial ischemia/superfusion injury, liver disease, and traumatic brain injury [8].

In the present study we examined the role of the inhibition of caspases in the *in vivo* retrograde neurodegeneration of substantia nigra caused by intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine (6-OHDA).

Materials and Methods

Animals and treatments: Male Sprague–Dawley rats, weighing 250–300 g, were used. The care and use of these animals were in accordance with the policy on the use of animals in neuroscience research published by the Society for Neuroscience. The protocols were approved by a review committee of the University of Barcelona under the supervision of the Government of Catalonia.

NeuroReport

The animals were anesthetized with ketamine hydrochloride (Parke-Davis; 100 mg/kg, i.p.) + Rompun (Bayer; 2 mg/kg, i.p.) and placed in a stereotaxic instrument with the upper incisor bar set 3.3 mm under the interaural line. Groups of eight animals were injected with 4 μ 6-OHDA (8 μ g/ μ l in saline solution containing 0.02% ascorbate) or an equal volume of vehicle solution into the right striatum (coordinates A: + 0.7, L: -2.8, H: -5, atlas of Paxinos and Watson [13]) at a flow rate of 1 μ l/min [14]. At various times (2, 7, 15 and 30 days) after the striatal lesion, the animals were anesthetized again and perfused through the heart for 20 min with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer.

Other groups of four animals each were injected with $2 \mu l$ of $85 \mu M$ zVAD.fmk or saline solution (0.9% NaCl) into the right substantia nigra (coordinates A: -4.8, L -1.6; H -8) 11 days after the striatal lesion. The animals were perfused and killed 1, 4 and 19 days after the nigra treatment.

Morphological studies: The brains were rapidly removed, fixed in a paraformaldehyde solution for 2h and embedded in paraffin. Coronal slabs of 5 µm, including the substantia nigra, were processed for tyrosine hydroxylase immunohistochemistry following the avidin-biotin-peroxidase method (ABC Kit, Vectastain, Vector). Tissue reaction was treated with 0.05% saponin, followed by methanol and hydrogen peroxide, and finally with normal horse serum. The sections were then incubated overnight at 4°C with a well characterized monoclonal antibody against tyrosine hydroxylase (TH) (Sigma) at a dilution of 1:200. The peroxidase reaction was visualized with 0.05% diaminobenzidine and 0.01% hydrogen peroxide. Tyrosine hydroxylase positive (TH+) neurons in the SNpc were counted on both sides in at least six consecutive sections around the level -5.4 mm with respect to bregma. The criterion for delineating between the substantia nigra pars compacta and the ventral tegmental area was the localization of the oculomotor nerve root, the substantia nigra pars compacta being laterally located in relation to the root [15]. The loss of TH+ neurons on the lesion side was determined with respect to the contralateral intact side of the brain.

Experimental data were statistically analyzed by means of analysis of variance (ANOVA) and U-Mann-Whitney test.

In situ end-labelling of nuclear DNA fragmentation: The assay was carried out by Tunel-staining in striatal lesioned animals killed 1 and 4 days after receiving zVAD.fmk or saline solution in the substantia nigra. In situ labelling of nuclear DNA

2606 Vol 10 No 12 20 August 1999

B. Cutillas et al.

fragmentation of dewaxed 5 μ m tissue sections was carried out with ApopTag detection kit (Oncor), following the instructions of the supplier. The peroxidase reaction was visualized with 0.05% diaminobenzidine and 0.01% hydrogen peroxide. Sections were counterstained with hematoxylin.

Results

Figure 1 shows the time-dependent loss of nigral neurons after a single 6-OHDA injection in the rat striatum. The decrease of TH+ neurons begin to be significant 15 days after the lesion and rise to about 50% after 30 days, in agreement with our previous results [14]. These results indicate that soma destruction starts \sim 1 week after the striatal lesion, a period during which the mechanisms leading to neuronal degeneration should be triggered.

If caspases are involved in 6-OHDA-induced neural degeneration, its inhibition should also block the neuronal loss. ZVAD.fmk was then applied into the substantia nigra 11 days after the striatal 6-OHDA or vehicle administration. Figure 2 shows a 75% decrease in the number of TH+ neurons in the lesioned side compared with the contralateral nonlesioned side. An additional effect on the loss of nigral cells could be attributed to the mechanical lesion caused by the injection, so that TH+ loss was higher in animals thus injected than in those previously injected only in the striatum. The loss of nigral dopaminergic neurons in zVAD.fmk-treated animals at 30 days after the lesion was only 40% compared with the contralateral non-treated side, and 15% compared with saline-treated animals. Tunel-positive cells were observed around the injection point in the ipsilateral substantia nigra, although these cells did not show a clear apoptotic morphology. Tunel-positive cells were also observed in other parts of SNpc in 6-OHDA-lesioned animals



FIG. 1. Time-dependent loss of nigral neurons by 6-OHDA. Percentage of tyrosine hydroxylase-positive neurons in the substantia nigra pars compacta ipsilateral to the 6-OHDA-lesioned striatum in respect to the contralateral non-lesioned side at various days after the lesion. The mean number of cells counted in the control side was 100 ± 3 (n = 16 animals). * p < 0.05, ** p < 0.05 compared with controls.

Caspases in 6-hydroxydopamine lesions



FIG. 2. Effect of zVAD.fmk on nigral neuron loss. Percentage of tyrosine hydroxylase positive neurons in the substantia nigra pars compacta ipsilateral to the 6-OHDA-lesioned or saline treated striata 30 days after the lesion. Substantiae nigrae were treated with saline solution (vehicle) or zVAD.fmk 11 days after the striatal lesion. Controls refer to the contralateral non-lesioned side. *** p < 0.001 compared with controls, vehicle zVAD.fmk receiving non-lesioned animals; ## p < 0.01 compared with 6-OHDA lesioned animals treated with zVAD.fmk; * p < 0.05 compared with animals treated with zVAD.fmk; * p < 0.05 compared with animals p < 0.01 compared with p < 0.01 compared with p < 0.01 compared p < 0.01 comp

treated with saline solution, but not in zVAD.fmk-treated substantia nigra (Fig. 3).

Discussion

6-OHDA has been used to destroy the nigrostriatal pathway given the ability of this compound to enter the dopaminergic neurons and to produce oxygen free radicals which, presumably, trigger neuronal degeneration [16]. When a single injection of 6-OHDA is applied into the striatum, a progressive degeneration of substantia nigra occurs



FIG. 3. Microphotographs showing *in situ* end-labelling of nuclear fragmentation. Tunel staining in SNpc cells 12 days after a 6-OHDA striatal injection and 24 h after (A) saline or (B) zVAD.fmk administration in the SNpc. Bar = 30 um.

NeuroReport

throughout a period of 15–60 days [17]. Here, we have shown that nigral degeneration induced by striatal 6-OHDA may be substantially reduced by inhibition of a proteolytic activity of the caspase family. Assuming that caspases are the effectors in many paradigms of apoptotic cell death, our results suggest that the retroaxonal degeneration of the nigrostriatal pathway may trigger apoptosis in at least an important proportion of neurons in the SNpc, with this process being prevented by caspase inhibitors.

6-OHDA has recently been shown to induce apoptosis in cultured cerebellar neurons [18], involving caspase-3-like protease activation. This compound also induces apoptosis in PC12 cells by mechanisms involving caspases [19].

In vivo, 6-OHDA intrastriatal injections in developing animals result in the induction of apoptotic death in dopamine neurons of the SNpc [20], but this mechanism has been described as developmentally dependent, having a maximum effect during the first 2 postnatal weeks. This has been interpreted as a consequence of the lack of target support by dopaminergic nerves, leading to apoptosis during brain development. At later postnatal times, 6-OHDA seems to induce two different morphologies of cell death in SNpc: apoptotic and non-apoptotic [1]. Caspase inhibition has been shown to protect brain in vivo against acute ischemic insults [10] and acute bacterial meningitis [21]. However, the effect of caspase inhibition in chemically induced neurodegeneration of nigrostriatal pathway has not been studied previously. In the present work, we have shown that 6-OHDA-induced nigral degeneration is partially, but significantly, protected by the caspase inhibitor zVAD.fmk in adult animals. However, results from our laboratory indicate that intrastriatal or intranigral MPP+ (10 mM) does not cause detectable apoptosis in SNpc, nor is the lesion protected by caspases (results not shown). Thus, it is important that 6-OHDA, a compound closely related to dopamine in structural and mechanistic ways, might induce caspase-mediated death in SNpc by itself or through oxygen radical production. Recently, an apoptotic role has been described for dopamine in neuronal cultures [22] and in PC12 cultures [23], and a neurotoxic effect has also been shown in vivo for stereotaxically administered dopamine [24]. Therefore, levodopa and/or dopamine, like 6-OHDA, could play a relevant role in the neurogenesis of PD, as suggested by emerging theories about the oxidative processes in PD and the role of dopamine in them [25]. Nuclear DNA-fragmentation has been described in neurodegenerative disorders without showing an apoptotic morphology [26]. Although a few Tunel-positive cells have been

NeuroReport

observed in Lewy bodies, no significant changes in expression of Bcl-2 and Bax proteins [27] and no apoptotic features have been shown in them [28]. The validity of the method of in situ end-labeling of nuclear fragmentation in predicting a programmed cell death is then seriously called into question. We did not see a clear apoptotic morphology in SNpc of 6-OHDA-treated animals. However the, at least partial, prevention of TH+ neurons in SNpc indicates a role for caspases in the neurotoxic action of 6-OHDA. Caspase inhibition has already been demonstrated to increase survival of nigral transplants in animal models of PD [29].

Conclusion

The caspase inhibitor zVAD.fmk, stereotaxically administered into the SNpc can protect 6-OHDAinduced nigral retrograde degeneration in adult animals. 6-OHDA-related compounds such as levodopa or dopamine itself could play a relevant role in the neurogenesis of PD. Thus the present findings might also be relevant for the design of new drug treatments for neurodegenerative disorders.

References

- 3.
- Burke RE and Kholodilov NG. Ann Neurol 44 (Suppl. 1), S126–S133 (1998). Mochizuki H, Goto K, Mori H and Mizuno Y. J Neurol Sci 137, 120–123 (1996). Wüliner U, Kornhuber J, Weiler M et al. Acta Neuropathol 97, 408–412 (1999). Anderson AJ, Su JH and Comman CW. J Neurosci 16, 1710–1719 (1996). Portera CC, Herdreen JC, Price DL and Koliatsos VE. J Neurosci 15, 3775–3787 5 (1995).
- 6.
- (1995).
 Koller WC. Neurology 42 (Suppl. 4), 27–31 (1992).
 Brooks DJ. Neurology 43 (Suppl. 6), S6–S16 (1993).
 Thornberry NA and Lazebnik Y. Science 281, 1312–1316 (1996).
 Holizman DM and Deshmukh M. Nature Med 3, 954–955 (1997). 9.

- Cheng Y, Deshmukh M, D'Costa A et al. J Clin Invest 101, 1992–1999 (1998).
 Friedlander RM, Brown RH, Gagliardini V et al. Nature 386, 31 (1997).
 Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B et al. J Biol Chem 273, 32608–32613 (1998).
- Paxinos and Watson The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press: 1986.
- 14. Espino A, Cutillas B, Tortosa A et al. Brain Res 695, 151-157 (1995).
- 16. 17.
- Camido F, Cumido D, Micola A et al. Diam Yes 633, 101-113 (1995).
 Keams CM and Gash DM. *Brain Res* 672, 104-111 (1995).
 Cohen G and Heikkila RE. J Biol Chem 249, 2447-2452 (1974).
 Sauer H and Oertel WH. *Neuroscience* 59, 401-415 (1994).
 Dodel RC, Du Y, Bales KR, et al. Mol Brain Res 64, 141-148 (1999).

- Dodel RC, Du Y, Bales KR, et al. Mol Brain Res 64, 141-148 (1999).
 Ochu EE, Rothweil NJ and Walters CA. J Neuroschem 70, 2637-2640 (1998).
 Matti MJ, James CJ, Oo TF et al. J Neurosci 17, 2030-2039 (1997).
 Braun JS, Novak R, Herzog KH et al. Nature Med 5, 298-302 (1999).
 McLaughlin BA, Nelson D, Erecinska M and Chesselet MF. J Neurochem 70, 2637-2640 (1998).
 Often D, Ziv I, Panet H et al. Cell Mol Neurobiol 17, 289-304 (1997).
 Floux F and Townsend JJ. Exp Neurol 119, 79-88 (1993).
 Fahn S. CNS Drugs 8, 376-393 (1997).
 Ferrer I. Acta Neuropathol 97, 5-12 (1999).
 Tortosa A. López E and Ferrer I. Neurosci Lett 238, 78-80 (1997).
 Schient GS, Hansson O and Leist M. Nature Med 5, 97-100 (1999).

- 29. Schierle GS, Hansson O and Leist M. Nature Med 5, 97-100 (1999).

ACKNOWLEDGEMENTS: This work was supported by FIS 97/0642 (M.E.), 99/1118 and SAF98-0100. The authors are grateful to all the members of the Unitat de Bioquímica, Campus de Bellvitge, and the valuable help of the technician R.Blanco. They are also grateful to Robin Rycroft for English language revision.

Received 2 June 1999; accepted 22 June 1999

B. Cutillas et al.

ANNEX 6



Neuroscience Letters 329 (2002) 165-168

Neuroscience Letters

www.elsevier.com/locate/neulet

Neuroprotective effect of the monoamine oxidase inhibitor PF 9601N [*N*-(2-propynyl)-2-(5-benzyloxy-indolyl) methylamine] on rat nigral neurons after 6-hydroxydopamine-striatal lesion

Blanca Cutillas^a, Santiago Ambrosio^a, Mercedes Unzeta^{b,*}

^aUnitat de Bioquímica, Departament de Ciències Fisiològiques II, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Hospitalet del Llobregat, 08907 Barcelona, Spain

^bInstitut de Neurociència, Departament de Bioquímica y Biologia Molecular, Facultat de Medicina, Universitat Autónoma de Barcelona, Campus Universitari (Bellaterra), 08193 Barcelona, Spain

Received 13 March 2002; received in revised form 17 April 2002; accepted 6 June 2002

Abstract

Monoamine oxidase B (MAO-B) inhibitors are potentially useful in the therapeutic treatment of Parkinson's disease. L-Deprenyl has been shown to slow nigrostriatal tract degeneration in human idiopathic Parkinsonism and to be an effective neuroprotector in experimental 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity models. However, Lamphetamine and (-)methamphetamine, the metabolites generated by L-deprenyl, can have adverse and severe sideeffects. Therefore, the search for new MAO-B inhibitors without potential amphetamine-like properties is a matter of great therapeutic interest. The present report is the first to describe the neuroprotective effect—following chronic intraperitoneal (i.p.) treatment—of a novel and non-amphetaminic MAO-B inhibitor, [N-(2-propynyl)-2-(5-benzyloxyindolyl) methylamine] (PF 9601N), on the neurodegeneration of nigral dopaminergic neurons caused by administration of intrastriatal 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Two groups of six animals were unilaterally injected with 6-OHDA in the right striatum. One group was treated daily with 60 mg/kg PF 9601N i.p., starting before stereotaxic lesion and continuing for 18 days thereafter. The other group was treated with vehicle solution. Coronal slabs including the substantia nigra pars compacta (SNpc) were processed for tyrosine hydroxylase immunohistochemistry (TH). The number of TH positive (TH +) neurons in the SNpc was 60% lower in 6-OHDA lesioned rats. However, the loss of TH + neurons in the SNpc was only 30% in PF 9601N i.p.-treated animals. Therefore, treatment with the specific MAO-B inhibitor significantly reduced the 6-OHDA-induced degeneration to about 50%. © 2002 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Neuroprotection; PF 9601N; Monoamine oxidase B inhibitor; 6-Hydroxydopamine; Parkinsonism

Parkinson's disease (PD) is the most common neurological pathology caused by dopaminergic neuron degeneration of the nigrostriatal pathway. Although many hypotheses regarding the pathogenesis of PD have been proposed including genetic factors, immunological abnormality, endogenous and exogenous toxins, mitochondrial dysfunctions, and oxidative stress—the specific aetiology of PD remains unclear.

Monoamine oxidase B (MAO-B) inhibitors have a potential application in PD as blockers of dopamine metabolism. Among them, L-deprenyl (selegiline) is the only one which has so far been used as an effective adjuvant for levodopa (L-DOPA) [3,14]. The effect of L-deprenyl is a controversial issue [24], but various authors have reported that it delays degeneration of the nigrostriatal tract in human idiopathic Parkinsonism [18] and prevents the development of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) toxicity [11]. However, it is not clear whether L-deprenyl has a neuroprotective effect in Parkinsonian patients or whether the response is merely symptomatic [24]. The lifespan of rats increases significantly after chronic treatment with L-deprenyl, and cognitive improvements in Alzheimer's disease have also been reported [8]. Furthermore, neuroprotective effects of L-deprenyl, at concentrations far too low to affect MAO-B activity, have been demonstrated both in experimental animal models 'ex vivo' and in cellular systems 'in vitro' [17,26].

Although other MAO-B inhibitors also act as neuroprotectors in experimental models of Parkinsonism at concen-

^{*} Corresponding author. Tel.: +34-93-5811523; fax: +34-93-5811573. *E-mail address:* mercedes.unzeta@uab.es (M. Unzeta).

^{0304-3940/02/\$ -} see front matter © 2002 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved. PII: S0304-3940(02)00614-6

166

B. Cutillas et al. / Neuroscience Letters 329 (2002) 165-168

trations lower than those required for MAO-B inhibition [27], L-deprenyl is the only MAO-B inhibitor available for therapeutic use. Its metabolites include L-amphetamine and (-)methamphetamine, which can have adverse side-effects, and for some years there has been controversy as to whether L-deprenyl should continue to be part of DATATOP treatment for PD [16]. Therefore, the search for new MAO-B inhibitors without potential amphetamine-like properties is a matter of great therapeutic interest. Rasagiline (R(+)-Npropargyl-1-aminoindane, TV 1012), a selegiline analogue with propargyl moiety and without particular neurotoxic amphetamine-like effects, has been reported to be effective in some models of Parkinsonism. We have previously investigated a novel series of acetylenic and allenic tryptamine derivatives as potential MAO inhibitors [1]. In this series of compounds, we found the presence of a benzyloxy group at position 5 of the indole ring which changes the selectivity towards MAO-B [20]. Among this series of compounds, N-(2-propynyl)-2-(5-benzyloxy-indolyl) methylamine, or PF 9601N (previously known as FA-73), was synthesized by Cruces et al. [6] and shown to behave 'in vitro' as a suicide MAO-B inhibitor [20], such that its activity could only be overcome by de novo MAO-B synthesis. It was also shown by our group that this novel MAO-B inhibitor easily crosses the blood-brain-barrier and maintains the same selectivity as that described in vitro. PF 9601N is about 50 times more selective towards MAO-B than L-deprenyl and about five times more selective than rasagiline [20]. Due to its high selectivity towards MAO-B, the compound should not produce a 'cheese effect' as a result of MAO-A inhibition. Furthermore, PF 9601N blocks dopamine uptake in human caudate and rat synaptosomal fraction with similar potency to that of L-deprenyl [20], whereas rasagiline does not [15]. PF 9601N also enhanced the duration of L-DOPA-induced contralateral turning in 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesioned rats [22].

Parkinsonism induced by MPTP develops from a disturbance of dopaminergic nerve endings [4]. Similarly, PD has been proposed to result from a terminal axotomy that develops slowly [12]. The model of retrograde degeneration of nigrostriatal neurons induced by intrastriatal 6-OHDA injection in rats has been extensively used [2] to study the progression or protection of substantia nigra from a striatal insult. The aim of the research was to demonstrate the neuroprotective effect—following chronic intraperitoneal (i.p.) treatment—of the novel non-amphetaminic MAO-B inhibitor, PF 9601N, on the neurodegeneration of nigral dopaminergic neurons caused by intrastriatal 6-OHDA.

Sprague–Dawley rats, weighing 250–300 g, were used for this study. The care and use of these animals were in accordance with the policy on the use of animals in research published by the Society for Neuroscience. The protocols were approved by a review committee of the University of Barcelona, under supervision of the Government of Catalonia. The animals were anaesthetized with ketamine hydrochloride (100 mg/kg, i.p.) + Rompun (2 mg/kg, i.p.) and

placed in a stereotaxic instrument with the upper incisor bar set 3.3 mm under the interaural line. Two groups of six animals each were unilaterally injected with 4 µl 6-OHDA (8 mg/ml in saline solution containing 0.02% ascorbate) into the right striatum (co-ordinates: A: +0.7; L: -2.8; H: -5, Atlas of Paxinos and Watson) at a flow rate of 1 µl/min [7]. One group of six animals was treated daily with 40 mg/kg PF 9601N i.p. (diluted in 4% N,N-dimethylformamide), starting 2 days before stereotaxic lesion and continuing for 18 days thereafter. The other group of six animals was treated with vehicle solution under an identical protocol. Eighteen days after the striatal lesion, the animals were anaesthetized again and perfused through the heart for 20 min with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer. The brains were rapidly removed, fixed in paraformaldehyde solution for 2 h and embedded in paraffin. Coronal slabs of 5 µm, including the substantia nigra, were processed for tyrosine hydroxylase immunohistochemistry (TH), following the avidine-biotine-peroxidase method (ABC Vectastain kit). Tissue was treated with 0.05% saponin, followed by methanol and hydrogen peroxide, and finally with normal horse serum at 4 °C with a well characterized monoclonal antibody (Sigma) against TH at a dilution of 1:200. TH positive (TH +) neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc) were counted on both sides, by two independent observers, in at least six consecutive sections around the level -5.4 mm with respect to bregma. The criterion for delineating between the SNpc and the ventral tegmental area was the localization of the oculomotor nerve root, the SNpc being laterally located in relation to the root [13]. The loss of TH + neurons on the lesion side was determined with respect to the contralateral side of the brain.

It has previously been reported that PF 9601N administration does not alter the striatal dopamine content in C57/BI mice [20] at doses that inhibit this isoform of MAO. This may be because MAO-A, the main isoform responsible for the metabolism of dopamine in rodents, is not affected by PF 9601N. In support of this, no significant differences were found between the number of TH + neurons in SNpc on the intact side (control side) of vehicle- compared with PF 9601N-treated animals. The number of TH + neurons in the SNpc was 60% lower in 6-OHDA lesioned animals (Figs. 1 and 2). The loss of TH + neurons in the SNpc was only 30% in PF 9601N i.p.-treated animals (Figs. 1 and 2), this being significantly different from non-PF 9601N-treated animals. Treatment with the specific MAO-B inhibitor thus reduced the 6-OHDA-induced degeneration to about 50%.

We have previously shown that treatment of rat striatal slices with PF 9601N reduces the dopaminergic lesion caused by MPTP [21]. However, low doses of this MAO-B inhibitor, enough to completely inhibit the enzyme, did not protect against MPTP toxicity. This means that MAO-B inhibition is not the only prerequisite for the neuroprotective effect and that other mechanisms are also involved. B. Cutillas et al. / Neuroscience Letters 329 (2002) 165-168



Fig. 1. Microphotographs showing the substantia nigra immunostained with TH antibodies 18 days after treatment. (A) Saline-treated control (contralateral nigra of 6-OHDA lesioned side); (B), nigra corresponding to 6-OHDA lesioned striatum; (C), PF 9601N-treated control; (D), nigra corresponding to 6-OHDA lesioned striatum of animals chronically-treated with PF 9601N (40 mg/kg, i.p.).

However, chronic treatment of old (8–10 months) C57/B1 mice with a low PF 9601N concentration for 10 days before MPTP administration, gave almost total protection (85% of dopamine control value) [19]. In the present study, we show



Fig. 2. Effect of 40 mg/kg i.p. PF 9601N chronic treatment on nigral neuron loss. Percentage of TH + neurons in the SNpc ipsilateral to the 6-OHDA-lesioned or saline-treated striata 18 days after the lesion. Controls refer to the contralateral non-lesioned side. ****P* < 0.001 compared with controls; **P* < 0.05 compared with the 6-OHDA group (analysis of variance + Scheff test). Scale bar, 100 μ m.

a neuroprotective effect of chronic administration of PF 9601N on a retrograde degeneration induced by an overproduction of oxygen free radicals.

6-OHDA was the first and is still the most widely-used catecholaminergic neurotoxin for developing experimental models of Parkinsonism. However, little is known about its toxic mechanism of intracellular death. It has been reported [5] that 6-OHDA is oxidatively deaminated by mitochondrial MAO enzyme into substantial amounts of superoxide, cytotoxic hydroxyl radical OH and H2O2 that directly damage the nigrostriatal dopaminergic neurons. However, 6-OHDA itself has another biochemically independent effect on the inhibition of mitochondrial respiratory chain activity, involving the production of free radicals [9]. The partial selectivity of 6-OHDA toxicity towards catecholaminergic neurons has been linked to its uptake by dopamine transporter systems [10]. However, there are other studies in which 6-OHDA toxicity in vitro is induced from outside the cell, as several free radical scavengers which do not cross the plasmatic membrane protect against 6-OHDA toxicity [25]. Therefore, PF 9601N protection of dopaminergic neurons after 6-OHDA lesion, as determined by TH immunohistochemistry, could be explained in terms of its possible antioxidant action at the extracellular level.

PF 9601N has been reported to behave in vitro as an inhibitor of melanine formation from dopamine autoxidation and as a potent free radical scavenger [23]. However,

168

B. Cutillas et al. / Neuroscience Letters 329 (2002) 165-168

the present report is the first to describe a neuroprotective effect of PF 9601N, a novel non-amphetaminic MAO-B inhibitor, on the neurodegeneration of nigral dopaminergic neurons induced in rats by an intrastriatal 6-OHDA injection. Its antioxidant properties and the lack of side-effects, due to the absence of amphetaminic moieties in its molecular structure, make PF 9601N a good candidate for use in the treatment and prevention of neurodegenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's.

This work has been supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnologia DGES Grant Ref SAF 99-0093 and by FIS 00/1127 (Spain). The authors would like to thank R. Rycroft for language assistance.

- Avila, M., Balsa, D., Fernández-Álvarez, E., Tipton, F.K. and Unzeta, M., The effect of side-chain substitution at positions 2 and 3 of the heterocyclic ring of N-acetylenic analogues of tryptamine as monoamine oxidase inhibitors, Biochem. Pharmacol., 45 (1993) 2231–2237.
- [2] Berger, K., Przedborski, S. and Cadet, J.L., Retrograde degeneration of nigrostriatal neurons induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in rats, Brain Res. Bull., 26 (1991) 301–307.
- [3] Birkmayer, W., Riederer, P., Youdim, M.B.H. and Linauer, W., The potentiation of the anti-akinetic effect after L-DOPA treatment by an inhibitor of MAO-B, I-deprenyl, J. Neural Transm., 36 (1975) 303–336.
- [4] Calne, D.B., Langston, J.W., Martin, W.R.W., Stoessl, A.J., Ruth, T.J., Adam, M.J., Pate, B.D. and Schulzer, M., Positron emission tomography after MPTP: observations relating to the cause of Parkinson's disease, Nature, 317 (1985) 246– 248.
- [5] Cohen, G. and Werner, P., Free radicals oxidative stress and neurodegeneration, In D.B. Calne (Ed.), Neurodegenerative Diseases, W.B. Saunders, Philadelphia, PA, 1994, p. 139.
- [6] Cruces, M.A., Elorriaga, C. and Fernández-Álvarez, E., Acetylenic and allenic derivatives of 2-(5-metoxyindolyl) and 2-(5-hidroxyindolyl) methylamines: synthesis and in vitro evaluation as monoamine oxidase inhibitors, Eur. Med. Chem., 26 (1991) 33–41.
- [7] Cutillas, B., Espejo, M., Gil, J., Ferrer, I. and Ambrosio, S., Caspase inhibition protects nigral neurons against 6-OHDA-induced retrograde degeneration, NeuroReport, 10 (1999) 2605–2608.
- [8] Filip, V. and Kolibas, E., Selegiline in the treatment of Alzheimer's disease: a long-term randomized placebocontrolled trial Czech and Slovak Senile Dementia of Alzheimer type study group, J. Psychiatry Neurosci., 24 (1999) 234–243.
- [9] Glinka, Y.Y., Tipton, K.F. and Youdim, M.B.H., Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6hydroxydopamine, J. Neurochem., 66 (1996) 2004–2010.
- [10] Glinka, Y.Y., Gassen, M. and Youdim, M.B.H., Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity, J. Neural Transm., 50 (1997) 55–66.
- [11] Heikkila, R.E., Manzino, L., Cabbat, F.S. and Duvoisin, R.C., Protection against dopaminergic neurotoxicity of MPTP by monoamine oxidase inhibitors, Nature, 311 (1984) 467–469.

- [12] Hornykiewicz, O., The primary site of dopamine neuron damage in Parkinson's disease: substantia nigra or striatum? Mov. Disord., 7 (1992) 288.
- [13] Kearns, C.M. and Gash, D.M., GDNF protects nigral dopamine neurons against 6-hydroxydopamine in vivo, Brain Res., 672 (1995) 104–111.
- [14] Knoll, J., The striatal dopamine dependency of life-span in male rats: longevity study with I-deprenyl, Mech. Ageing Dev., 46 (1988) 237–262.
- [15] Lamensdorf, I., Porat, S., Simantov, R. and Finberg, J.P., Effect of low-dose treatment with selegiline on dopamine transporter (DAT) expression and amphetamine-induced dopamine release in vivo, Br. J. Pharmacol., 126 (1999) 997–1002.
- [16] Parkinson's Disease Research Group of the United Kingdom, Lees, A.J., Comparison of therapeutic effects and mortality data of levodopa and levodopa combined with selegiline in patients with early, mild Parkinson's disease, Br. Med. J., 311 (1995) 1602–1607.
- [17] Mytilineou, C. and Cohen, G., Deprenyl protects dopamine neurons from the neurotoxic effect of MPP⁺ ion, J. Neurochem., 45 (1985) 1951–1953.
- [18] Olanow, C.W., Hauser, R.A., Gauger, L., Malapira, T. and Koller, W., The effect of I-deprenyl and levodopa on the progression of PD, Ann. Neurol., 38 (1995) 771–777.
- [19] Pérez, V. and Unzeta, M., PF 9601N attenuates MPTPinduced depletion of striatal dopamine levels in C57/BI 6 mice, Neurochem. Int., (2002) in press.
- [20] Pérez, V., Marco, J.L., Fernández-Álvarez, E. and Unzeta, M., Relevance of benzyloxy group in 2-indolyl methylamines in the selective MAO-B inhibition, Br. J. Pharmacol., 127 (1999) 869–876.
- [21] Pérez, V., Pastó, M. and Unzeta, M., Involvement of Ca2 + in dopamine release in striatal rat slices by PF 9601N and Ideprenyl, Neurobiology, 8 (2000) 237–242.
- [22] Prat, G., Pérez, V., Rubio, A., Casas, M. and Unzeta, M., The novel type B MAO inhibitor PF9601N enhances the duration of L-DOPA-induced contralateral turning on 6-hydroxydopamine lesioned rats, J. Neural Transm., 107 (2000) 409– 417.
- [23] Romera, M., Lizcano, J.M. and Unzeta, M., Antioxidant activity and suppression of hydroxyl radical formation by N-(2-propynyl)2-(5-benzyloxy-indol) methylamine (PF 9601N) and related acetylenic tryptamine derivatives, Anal. Pharmacol., (2002) in press.
- [24] Shoulson, I., DATATOP: a decade of neuroprotective inquiry. Parkinson Study Group: deprenyl and tocopherol, antioxidative therapy of Parkinsonism, Ann. Neurol., 44 (1998) S160–S166.
- [25] Tiffany-Castiglioni, E., Saneto, R.P., Proctor, P.H. and Perez-Polo, J.R., Participation of active oxygen species in 6-hydroxydopamine toxicity to a human neuroblastoma cell line, Biochem. Pharmacol., 31 (1982) 181–188.
- [26] Wu, R.M., Chen, R.C. and Chiueh, C.C., Effect of MAO-B inhibitors on MPP⁺ toxicity in vivo, Ann. New York Acad. Sci., 899 (2000) 255–261.
- [27] Yu, P.H., Davis, D.A., Durden, A., Barber, A., Terleckyj, I., Nicklas, W.G. and Boulton, A., Neurochemical and neuroprotective effects of some aliphatic propargylamines: new selective nonamphetamine-like monoamine oxidase B inhibitors, J. Neurochem., 62 (1994) 697–704.

ANNEX 7

Neurochemical Research, Vol. 23, No. 10, 1998, pp. 1217-1223

Intrastriatal Grafts of Fetal Mesencephalic Cell Suspensions in MPP⁺-Lesioned Rats: A Microdialysis Study In Vivo

M. Espejo,¹ S. Ambrosio,^{1,4} J. Llorens,² and B. Cutillas³

(Accepted January 22, 1998)

The striatum of rats was lesioned by unilateral administration of MPP⁺. Two weeks later, a suspension of fetal mesencephalic cells (FMC), obtained from 14-day rat embryos, was injected into the lesioned striatum. Two weeks after grafting, the success of implantation and recovery of dopamine function were assessed by tyrosine hydroxylase immunocytochemistry (TH) and the measurement of striatal dopamine content. In addition, the extracellular concentrations of dopamine and dopamine metabolites were studied by microdialysis in vivo before and after perfusion of MPP⁺ to induce dopamine release from vesicular stores. TH+ cell bodies were seen in the lesioned grafted striata, indicating that fetal cells survived in these striata. In addition, there was a marked increase in TH-immunoreactivity in the neuronal fibers and terminals in the area surrounding the cell implant, suggesting a compensatory response of the host tissue which may involve fiber sprouting. Grafting induced a recovery in indices of dopamine function, including recovery in dopamine content, and basal and MPP⁺-induced dopamine release. Thus, grafts of FMC may provide a significant recovery of dopamine function in MPP⁺-lesioned striata.

KEY WORDS: MPP*; mesencephalic grafts; microdialysis; striatum; rat; parkinsonism.

INTRODUCTION

Intrastriatal implantation of dopamine-rich fetal mesencephalic tissue (fetal tissue grafts or fetal cell suspensions) is widely used in rats that have been chemically lesioned in the nigrostriatal pathway (1). The most common lesioning procedure is injection of 6-hydroxy-dopamine (6-OHDA) to the substantia nigra or the medial forebrain bundle. A number of studies showed an improvement in rotational tests following intrastriatal transplants (2,3). In the 6-OHDA-lesioned model the integrity of striatum is practically maintained, and only

dopamine endings are lost, and thus the graft has to adapt to a fairly consistent tissue. Implants of striatal or nigral cell suspensions have also been assayed in rats intrastriatally lesioned with excitotoxins, such as kainic acid or ibotenic acid, to study the degree of reconstruction of synaptic contacts (4,5). The striatal injury caused by kainic acid promotes the growth of dopaminergic neurites from substantia nigra grafts (6).

The lesion caused by MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium ion), the active metabolite of the Parkinsoninducing drug MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), may help us to understand the etiology of Parkinson's disease. The mechanisms by which MPP+ causes cell damage are not fully understood, but mitochondrial chain blockade (7) and free radical production (8) are probably involved. MPTP administered to monkeys or some strains of mice damages the nigrostriatal pathway, whereas rats seem to be particularly resistant to this neurotoxic action (for review (9)). However,

¹ Unitat de Bioquímica, ²Unitat de Fisiologia, ³Escola d'Infermeria, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

⁴ Author to whom reprint requests should be addressed: Santiago Ambrosio, Unitat de Bioquimica, Facultat d'Odontologia, Universitat de Barcelona, c/Feixa Llarga s/n, 08907-Hospitalet del Llobregat (Bellvitge), Barcelona, Spain. Fax: (34) (3) 4024213, Email: ambrosio@bellvitge.bvg.ub.es.
when MPP⁺ is stereotaxically administered into the rat striatum, by direct injection (10,11) or through a dialysis cannula (12), it produces a sharp depletion of dopamine and loss of all cell types surrounding the site of administration. The result after 48h is a marked destruction of the striatum, with central cavitation, and glial proliferation (10,13), but discrete or absent nigral degeneration (14). This allows a partial recovery of striatal dopamine content, probably by sprouting of surviving dopaminergic fibers, which is seen 2 months later (11). The extent of the recovery depends on the degree of the lesion and thus on the concentration of MPP⁺ administered.

Previous studies have used microdialysis to examine the functional activity of grafted monoaminergic neurons in 6-OHDA-denervated rats (15,16-18). In those rats, levels of extracellular dopamine (DA) and dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in the perfusates were restored to about 85% by intrastriatal nigral grafts. Partial recovery has also been observed by microdialysis in 6-OHDA-lesioned rats implanted with human fetal dopamine neurons (19) or with adrenal medulla grafts (20). The survival of fetal cells depends most probably on the combinatory effect of trophic factors apported by host and implanted tissue, so the success of the implanted cells may vary as a function of the lesion model used. The lesion caused by intrastriatally applied MPP* is larger and less specific than that caused by 6-OHDA, nevertheless, the molecular mechanisms involved in MPP+-toxicity could be related to the mechanisms underlying human neurodegenerative processes. Thus, it seems worth determining if a striatal tissue damaged by MPP+ is able to allow survival and function of implanted cells

Here we apply microdialysis to the study of dopaminergic recovery in MPP*-lesioned rats implanted with fetal mesencephalic cells (FMC) to examine whether the lesion caused by intrastriatally administered MPP* could be compensated, at least partially, by striatal implantation of FMC. Although the lesion caused by MPP* is far from a human neurodegenerative process, the present study may provide information about the utility of implantational therapy in the treatment of Parkinson's disease.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Materials. MPP- iodide was purchased from R.B.I. (Wayland, MA). Mouse monoclonal anti-tyrosine hydroxylase and glial fibrillar acidic protein were from Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO) and the ABC complex from Vector (Burlingame, CA). Dopamine, dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid were from Sigma-Aldrich

Espejo, Ambrosio, Llorens, and Cutillas

Química S.A. (Madrid, Spain). Cell preparation media and perfusion media were prepared with products of the highest purity available.

Animals. Male Sprague-Dawley rats (n = 64), weighing about 250 g, were used for all the experiments. Fetal neurons were obtained from the embryos of Sprague-Dawley rats on day 14 (E14). E0 was established on the evidence of intravaginal presence of spermatoza. The care and use of these animals were in accordance with the policy on the use of animals in neuroscience research published by the Society for Neuroscience. The protocols were approved by a review committee of the University of Barcelona under supervision of the Government of Catalunya.

MPP⁺ Lesion. Animals were anesthetized with ketamine hydrochloride (Parke-Davis) (100 mg/kg i.p.) + Rompun (Bayer) (2 mg/kg i.p.) and placed in a stereotaxic instrument (David Kopf Instr., Palo Alto, CA) with the upper incisor bar set 3.3 mm under the interaural line. Animals were injected with either 30 µg of MPP⁺ iodide or saline solution with an equimolar concentration of NaI into the right striatum (coordinates A: ± 0.7 , L: ± 2.8 , H: ± 5 , according to the Atlas of Paxinos and Watson (21)), in a volume of 4 µl at a flowrate of 1 µl/min.

Preparation of Fetal Cells. Cell suspensions were prepared from ventral mesencephalon of 14-day-old embryos. The mesencephalic area was dissected out as described by Dunnett and Björklund (1), incubated at 37° C for 20 min in carbogenated DMEM supplemented with 2 mM glutamine, containing 0.05% DNase and 0.1% trypsin. The cell suspensions were gently disgregated, washed in medium and sedimented by centrifugation. Cells were resuspended in 5 µl of DMEM per piece and embryo. The final concentration was adjusted to 100,000 cells/µl with DMEM.

Fetal Cell Grafting. Three μ l of the cell suspension (300,000 cells) was injected into the striatum at the same horizontal coordinates used for MPP⁺ administration, distributed at two depths (H: -5 and -6). An equal volume of DMEM was injected in control and lesioned non-grafted animals. Four groups of animals (n = 16 animals per group) were used for each experiment: 1) non-lesioned and non grafted animals, i.e. sham-operated animals treated with vehicle solution (controls); 2) non-lesioned (receiving saline solution) grafted animals; 3) MPP⁻¹esioned non-grafted (receiving only DMEM) animals; 4) MPP⁺¹elsioned and grafted animals. All the animals were anesthetized at least twice: for sham or MPP⁺¹-lesion, and for sham or fetal cell implantation two weeks after the lesion), rats were used for morphological and biochemical studies.

Morphological Studies. Four animals from each group (16 animals) were anesthetized and perfused through the heart with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer. The brains were rapidly removed, fixed in the same solution, tranferred to 30% saccharose-PBS for 24 h and frozen in dry ice. Coronal slabs of 15 µm, including the substantia nigra or the striatum, were cut with a cryostat (Jung CM 1800, Leyca) and processed for tyrosine hydroxylase (TH) or glial fibrillar acidic protein (GFAP) immunocytochemistry according to the avidinebiotine-peroxidase method (ABC Kit). Briefly, tissue sections of rat brain were treated with 0.05% saponin, followed by methanol and hydrogen peroxide, and finally normal horse serum. The sections were then incubated overnight at 4°C with monoclonal antibodies at a dilution 1:200. The peroxidase reaction was visualized with 0.05% diaminobenzidine and 0.01% hydrogen peroxide.

Striatal Samples. Eight animals from each group (32 animals) were killed by decapitation and both striata were quickly excised, frozen in liquid N₂ and stored at -80° C until analysis. The tissue samples were weighted and homogenized by sonication (Branson Sonifier) in 500 µl of 0.1 M HClO₄. The homogenates were centrifuged for 10 min (12,000 g) and supernatants were stored at -80° C until analysis.

Nigral Grafts in MPP+ Lesions

Microdialysis. The remaining four animals of each group (16 animals) were anesthetized and placed in the stereotaxic instrument for implantation of a microdialysis cannula. Dialysis probes were constructed as described by Adell and Artigas (22). Briefly, they consist of two lengths of fused silica tubing (inner diameter [ID] 40 µm; outer diameter [OD] 140 um) inserted into a stainless steel tube (ID 300 µm; OD 500 µm; A-M Systems). Cuprophan hollow fibers (Enka AG, Wuppertal, Germany) were cemented into the distal end of the stainless steel tubing and used as dialysis membrane (4 mm long). The recovery of these probes in vitro, at 1.25 µl/min and room temperature, varied between 4.0 and 8.0% depending on the compound, consistent with published results (23). The probes were stereotaxically implanted 24 h before sample collection into the right striatum (A: +0.7, L: +2.8, H: -7.0) and fixed on the skull of the rat with two screws and dental cement. At the moment of collection of the dialysis samples the rats were awake and freely moving. The inlet tube was connected via a longer polyethylene tube to a 1 ml disposable syringe driven by a microinfusion pump (Harvard Apparatus 22). The outlet tube was connected to 0.5 ml collecting tubes maintained on an ice-cooled bath. An artificial cerebrospinal fluid (CSF) containing 119.5 mM NaCl, 4.75 mM KCL, 1.27 mM CaCl₂, 1.19 mM KH₂PO₄, 1.19 mM MgSO₄, 1.6 mM Na₂HPO₄ at pH 7.2 (24), was perfused through the microdialysis probes at a constant flow of 1.25 µl/min. The samples were collected every 20 min and directly injected on an HPLC column or frozen until assay. To obtain stable baseline concentrations the samples were taken 30 min after perfusion began. The first four samples for each animal were considered as basal samples. After the 4th sample perfusion medium was replaced by a CSF containing 10 mM MPP+, in order to evaluate the response to a dopamine-depletor agent in striata of the different groups of animals. Rats were killed by decapitation after receiving an overdose of chloral hydrate (400 mg/ml) at the end of the experiment.

Analytical Procedures. 20 µl of the supernatant from striatal homogenates or 20 µl of microdialysis samples was used for analysis in an HPLC system (LKB-Pharmacia, Bromma, Sweden). To separate dopamine and dopamine metabolites a nucleosil C-18 reverse-phase column (5 µm, 250 × 4.6 mm; Teknokroma, Barcelona, Spain) was used. The mobile phase consisted of 50 mM sodium acetate, 25 mM citric acid, 0.7 mM octanesulfonic acid and 10% methanol at pH 4.1, filtered with 0.2 µm pore-size Millipore and degassed by stirring and vacuum. A dual electrochemical detector (Coulochem II, ESA) was used with an applied potential of -100 mV at the conditioning cell and El = +50 mV, E2 = +300 mV at the analytical cell (25). The standards: dopamine (DA), dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), were purchased from Sigma. Values from dialysates were expressed as absolute concentration of DA or its metabolites in a volume of 25 µl. Values from striatal tissue were expressed as pmol per mg of protein (determined by the Bradford procedure).

Statistical comparisons were performed using unpaired Student's t test for dopamine striatal values and metabolites concentrations in basal dialysates. For comparisons between basal and MPP'-stimulated release of dopamine and its metabolites in microdialysis experiments non-parametric analysis with U-Mann-Whitney and Kruskall-Wallis plus Wilcoxon test were used.

RESULTS

Most studies were performed 2 weeks after FMC implantation into the striatum, i.e., 4 weeks after MPP⁺ administration. MPP⁺ caused a decrease in striatal DA

of more than 90% after 1 week (not shown). After 4 weeks the DA striatal content was 70% lower than controls, indicating the persistence of the lesion, in contrast with that obtained at lower doses (11,14). The brains of lesioned non-grafted animals showed marked ipsilateral ventricle enlargement and the lesioned striatum displayed a massive necrotic, destructured area (Fig. 1A). In the striata to which FMC had been grafted, TH+ cell bodies were seen inside and surrounding the necrotic area. Fig. 1B is a magnification of the striatal area damaged by MPP+ and implanted with FMC. Similar results were seen when striata were analyzed 1 or 4 weeks after transplantation (data not shown). A marked increase in the density of TH+ fibers was observed in the host tissue of grafted animals (Fig. 1D) compared with lesioned non-grafted animals (Fig. 1C). A significant improvement in whole striatal dopamine content was detected in implanted-lesioned rats (Fig. 2). Immuno-GFAP staining revealed significant gliosis surrounding the area of the lesion and, to a lesser extent, in the whole striatum. Grafted and non-grafted striata did not differ in extent or intensity of the glial reaction (data not shown).

Lesion-grafted animals had a higher concentration of basal extracellular dopamine than lesioned nongrafted animals, as assessed by microdialysis (Fig. 3). Fig. 4 shows the profiles of DA, HVA and DOPAC concentrations obtained from microdialysis samples before and after the CSF perfusion medium was replaced by a similar medium containing 10 mM MPP+ in order to deplete local DA. In control animals, MPP⁺ perfusion caused an increase of approx. 7000% in extracellular DA. The increase was also evident, although slightly smaller, in control animals implanted with FMC. The DA release in lesioned rats was much lower than in nonlesioned rats, indicating the presence of few responsive neurons at the site of the lesion. The DA depletion in lesioned FMC-implanted rats was more than double that of non-implanted rats. The decrease induced by MPP+ perfusion on DOPAC and HVA levels was very clear in control animals, but in MPP+-lesioned rats basal levels of metabolites were too low to reveal any further decrease after the perfusion with MPP+. However, lesioned grafted MPP+-animals showed higher levels of HVA than lesioned non-grafted animals, and these levels decreased after perfusion with 10 mM MPP+.

DISCUSSION

The present data indicate that dopaminergic fetal cells may survive, develop a neuronal morphology and



Fig. 1. A) High ventricle enlargement in the lesioned striatum and the area of destructured tissue following MPP⁺ administration. The arrow shows the site of mesencephalic cell graft and subsequent microdialysis. The rectangle in the bottom-right indicates the area amplified in C and D. B) TH-immunocytochemistry of the lesioned and implanted striatum. A marked TH+ coloration surrounding the lesioned area and also several TH+ neurons were observed. TH+ response in the MPP⁺-lesioned (C) and lesioned/implanted striatum (D), suggesting sprouting in the implanted tissue. The sections were contrasted with hematoxiline. (Scale bar = $100 \mu m$).

partially restore DA levels in a markedly lesioned striatum.

In MPP⁺-lesioned-grafted animals we observed an increase in TH+ fibers in the host striatal area surrounding the graft, as described for kainic acid lesions (6). This effect is greater than that observed in lesioned nongrafted animals and it may be due to sprouting of dopaminergic host fibers. This may indicate the presence of trophic communication between the host cells and the implanted cells. The significant recovery of the level of striatal dopamine and its release found in grafted rats may thus be due to both processes: survival of implanted dopamine-rich neurons and hypertrophy of surviving dopamine terminals of the host tissue.

As reported by other authors, in 6-OHDA-lesioned rats the overall striatal DA levels also remain low after grafting: the DA levels in the grafted striatum achieve only 10% (26) to 30% (27,28) recovery of normal levels. In other studies the recovery of tissue DA levels is higher only in the tissue adjacent to the transplant (29), as observed here by TH-immunocytochemistry.

Grafts of DA-rich ventral mesencephalic tissue are successful (30,31) in monkeys in which Parkinsonism had been induced by MPTP. However, the lesion caused in the striatum by MPP⁺ differs greatly, in extension, selectivity and recovery, from the lesion caused by peripherically administered MPTP or by stereotaxically administered 6-OHDA (11,14). We had previously reported that striatal injections of MPP⁺ caused massive necrosis with spongiosis, central cavitation and intense macrophagic and astroglial proliferation at the periphery of the necrotic area (10). The administration of $30 \ \mu g$ of MPP⁺ causes a marked ventricle enlargement on the ipsilateral side of the lesion, a massive decrease in stria-



Nigral Grafts in MPP⁺ Lesions

Fig. 2. Striatal DA levels in the different groups of rats (n = 8 per group): controls, treated with saline and DMEM (C); non-lesioned and grafted with fetal mesencephalic cells (C + FMC); MPP-lesioned and treated with DMEM (MPP') and MPP-slesioned and grafted (MPP* + FMC) (n = 8). **p < 0.01 respect to C and C + FMC; # p < 0.05 respect to MPP' group, Student's *t* test.



Fig. 3. DA, DOPAC, and HVA concentrations in the different groups of rats (n = 4 per group) obtained by in vivo microdialysis: controls with saline/DMEM (); non-lesioned (saline) + FMC (); NP+-lesioned/DMEM (); and MPP-lesioned + FMC (). Values are the mean \pm SEM of 4 rats and for each animal the values are the average of 4 consecutive microdialysis samples. p < 0.05 respect to controls; p < 0.05 respect to other by-lesioned rats, Student's *t* test.

tal DA and a significant increase in GFAP in the lesioned area. It cannot be strictly considered as a Parkinson-like lesion because of the degeneration of structures other than dopamine terminals. The lesion caused by MPP⁺ is more comparable to the lesions by kainic acid, which cause massive necrosis in the striatum.

The perfusion through a microdialysis cannula implanted in the grafted area provided local information about the functionality of these cells. It is assumed that DA recovered in striatal perfusates with the dialysis technique can be taken as a good measure of DA release in situ, while the recovery of DOPAC and HVA levels reflects ongoing DA synthesis, metabolism and release (23).



Fig. 4. DA, HVA, and DOPAC concentrations in striatal dialysates before and after infusion of 10 mM MPP⁺. Triangles represent nonlesioned rats: black triangles for controls and white triangles for nonlesioned grafted rats. Circles represent MPP⁺-lesioned rats: black circles for lesioned non-grafted, white circles for lesioned and grafted rats. Values are given as nM \pm SEM concentration in collected samples (n = 3–4), *p < 0.05 respect to MPP⁺-lesioned animals (black circles), by Kruskall-Wallis plus Wilcoxon test. Values 60 min after MPP⁺ perfusion were highly significant compared with basal values, except for DOPAC in lesioned-animals (p < 0.01 for DA and nonlesioned animals, p < 0.05 for HVA in lesioned animals, by U-Mann-Whitney test).

Several studies have been carried out by microdialysis in striatal or nigral MPP+-lesioned rats (12,14,32), and in all cases a massive release of striatal DA and a

decrease in DOPAC and HVA extracellular contents are described. A complete loss of dopamine neurons in the ipsilateral substantia nigra and striatal receptor hypersensitivity have been described following infusion of MPP⁺ into the nigrostriatal pathway of the rat. The striatal grafting of nigral cells in these rats shows normalization of the circling behaviour and dopamine striatal receptor densities (33). In our model of lesion with MPP⁺ and grafting with FMC we also found a decrease to near a half in the ipsilateral rotation induced by amphetamine (unpublished data).

The present results show that, one month after MPP⁺ administration, extracellular dopamine levels are reduced to nearly a third, whereas in grafted animals these concentrations are significantly recovered. The increase in metabolites is significant for HVA, which is consistent with a partially recovered basal dopamine release in these animals, assuming that HVA is a prominent extracellular dopamine metabolite.

After several weeks of MPP⁺ administration, rats are far less sensitive to striatal infusion of MPP⁺ (11,34). When MPP⁺ is infused through the dialysis cannula to provoke the depletion of the dopamine stored in the synaptic vesicles around the cannula, control and grafted (non-lesioned) tissue respond with a massive release of dopamine about 7000% above basal levels. Lesioned striata were less sensitive to MPP⁺ (500% of basal DA increase) whereas MPP⁺-lesioned-grafted striata showed a significantly higher increase in dopamine than MPP⁺lesioned-non-grafted striata (1200%).

In conclusion, fetal mesencephalic cells may survive and differentiate in a striatum subjected to drastic degeneration induced by MPP⁺ and they may partially restore the dopaminergic activity of this striatum.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. R. Bartrons and all the members of the Biochemistry Unit of Campus of Bellvitge for their many valuable suggestions. M. Espejo is recipient of a fellowship from the Fundació Pi i Sunyer. We thank also R. Rycroft for language assistance. This work was supported by grants from the Spanish, F.I.S. (95/0188), and Catalan governments (S.G.R. 95/427).

REFERENCES

- Dunnett, S. B., and Björklund, A. 1992. Staging and dissection of rat embryos. Pages 1–19, 57–58. in Dunnett, S. B., and Björklund, A. (eds.), Neural Transplantation—A Practical Approach, IRL, Oxford.
- Björklund, A., Dunnett, S. B., and Nikkhah, G. 1994. Nigral transplants in the rat Parkinson model. Pages 47–69. in Dunnett, S. B.,

Espejo, Ambrosio, Llorens, and Cutillas

and Björklund, A. (eds.), Functional Neural Transplantation, Raven Press, New York.

- Freed, W., Perlow, M. J., Karoum, F., Seiger, A., Olson, L., Hoffer, B. J., and Wyatt, R. J. 1980. Restoration of dopaminergic function by grafting of fetal rat substantia nigra to the caudate nucleus: long term behavioral, biochemical, and histochemical studies. Ann. Neurol. 8:510–519.
- Gage, F. H., and Fisher, L. J., 1991. Intracerebral grafting: a tool for neurobiologists. Neuron 6:1–12.
- Isacson, O., Brundin, P., Kelly, A. T., and Gage, F. H., 1984. Functional neuronal replacement by grafted striatal neurons in the ibotenic acid-lesioned rat striatum. Nature 311:458–460.
- Takashima, H., Walker, B. R., Cannon-Spoor, H. E., and Freed, W. J., 1993. Kainic acid lesions increase reafferentation of the striatum by substantia nigra grafts. Brain Res. 621:71–78.
- Mizuno, Y., Suzuki, K., Sone, N., and Saitoh, T., 1988. Inhibition of mitochondrial respiration by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mouse brain in vivo. Neurosci. Lett. 91: 349–353.
- Chiueh, C. C., Krishna, G., Tulsi, P., Obata, T., Lang, K., Huang, S.-J., and Murphy, D. L., 1992. Intracranial microdialysis of salicylic acid to detect hydroxyl radical generation through dopamine autooxidation in the caudate nucleus: effects of MPP⁺. Free Rad. Biol. Med. 13:581–583.
- Tipton, K. F., and Singer, T. P., 1993. Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. J. Neurochem. 61:1191–1206.
- Espino, A., Tortosa, A., Bendahan, G., Bartrons, R., Calopa, M., Ferrer, I., and Ambrosio, S., 1994. Stereotaxic administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP) decreases striatal fructose 2,6-bisphosphate in rats. J. Neurochem. 62:1913–1920.
- Espino, A., Llorens, J., Calopa, M., Bartrons, R., Rodríguez-Farré, E., and Ambrosio, S., 1995. Cerebrospinal dopamine metabolites in rats after intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine or 1-methyl-4-phenylpyridinium. Brain Res. 669:19–25.
- Rollema, H., Kuhr, W. G., Kranenborg, G., de Vries, J., and Van der Berg, C., 1988. MPP-induced efflux of dopamine and lactate from rat striatum have similar time courses as shown by in vivo brain dialysis. J. Pharmacol. Exptl. Ther. 245:858–866.
- Gibb, W. R. G., Costall, B., Domeney, A. M., Kelly, M. E., and Naylor, R. J., 1988. The histological effects of intracerebral injection or infusion of MPTP and MPP⁺ in rat and mouse. Brain Res., 461:362–366.
- Espino, A., Cutillas, B., Tortosa, A., Ferrer, I., Bartrons, R., and Ambrosio, S., 1995. Chronic effects of single intrastriatal injections of 6-hydroxydopamine or 1-methyl-4-phenylpyridinium studied by microdialysis in freely moving rats. Brain Res., 695: 151–157.
- Kalén, P., Nilsson, O. G., Cenci, M. A., Rosengren, E., Lindvall, O., and Björklund, A., 1990. Intracerebral microdialysis as a tool to monitor transmitter release from grafted cholinergic and monoaminergic neurons. J. Neurosci. Meth. 34:107–115.
- Zetterström, T., Brundin, P., Gage, F. H., Sharp, T., Isacson, I., Dunnett, S. B., Ungerstedt, U., and Björklund, A., 1986. In vivo measurement of spontaneous release and metabolism of dopamine from intrastriatal nigral grafts using intracerebral dialysis. Brain Res. 362:344–349.
- Strecker, R. E., Sharp, T., Brundin, P., Zetterstrom, T., Ungerstedt, U., and Björklund, A., 1987. Autoregulation of dopamine release and metabolism by intrastriatal nigral grafts as revealed by intracerebral dialysis. Neuroscience 22:169–178.
- Rioux, L., Gaudin, D. P., Gagnon, C., Di Paolo, and T., Bedard, P. J., 1991. Decrease of behavioral and biochemical denervation supersensitivity of rat striatum by nigral transplants. Neuroscience 44:75–83.
- Brundin, P., Duan, W. M., and Sauer, H., 1994. Functional effects of mesencephalic dopamine neurons and adrenal chromaffin cells grafted to the rodent striatum. Pag. 9–46. *in* Dunnett, S. B., and

Nigral Grafts in MPP⁺ Lesions

Björklund, A. (eds.) Functional Neural Transplantation. Raven Press, New York.

- Becker, J. B., and Freed, W. J., 1988. Adrenal medulla grafts enhance functional activity of the striatal dopamine system following substantia nigra lesions. Brain Res. 462:401–406.
- Paxinos, G., and Watson, C., 1982. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd edn, Academic Press, New York.
- Adell, A., and Artigas, F., 1991. Differential effects of clomipramine given locally or systemically on extracellular 5-hydroxytryptamine in raphe nuclei and frontal cortex. An in vivo microdialysis study. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 343:237-244.
- Zetterström, T., Sharp, T., Marsden, C. A., and Ungerstedt, U., 1983. In vivo measurement of dopamine and its metabolites by intracerebral dialysis: changes after d-amphetamine. J. Neurochem. 41:1769–1773.
- Benveniste, H., Przedborski, S., and Cadet, J. L., 1990. Microdialysis—Theory and application. Prog. Neurobiol. 35:195–215.
- Achilli, G., Perego, C., and Ponzio, F., 1985. Application of the dual-cell coulometric detector: a method for assaying monoamines and their metabolites Anal. Biochem. 148:1-9.
- Schmidt, R. H., Björklund, A., Stenevi, U., Dunnett, S. B., and Gage, F. H., 1983. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions: III. Activity of intrastriatal nigral suspension implants as assessed by measurements of dopamine synthesis and metabolism Acta Physiol. Scand. [Suppl.] 522:19–28.
- Moukles, H., Forni, C., Nieoullon, A., and Daszuta., A., 1994. Regulation of dopamine levels in intrastriatal grafts of mesencephalic cell suspension: an in vivo voltammetric approach. Exp. Brain Res. 102:10–20.

- Nikkhah, G., Cunningham, M. G., Jödicke, A., Knappe, U., and Björklund, A., 1994. Improved graft survival and striatal reinnervation by microtransplantation of fetal nigral cell suspensions in the rat Parkinson model. Brain Res. 633:133–143.
- Brundin, P., Strecker, R. E., Widner, H., Clarke, D. J., Nilsson, O. G., Åstedt, B., Lindvall, O., and Björklund, A., 1988. Human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease: immunological aspects, spontaneous and drug-induced behaviour, and dopamine release. Exp. Brain Res. 70:192–208.
- Lindvall, O., and Björklund, A., 1989. Transplantation strategies in the treatment of Parkinson's disease: experimental basis and clinical trials. Acta Neurol. Scand. 126:197–210.
- Redmond, D. E., Sladek, J. R., Roth, R. H., Collier, T. J., Elsworth, J. D., Deutch, A. Y., and Haber, S., 1986. Fetal neuronal grafts in monkeys given methylphenyltetrahydropyridine. Lancet: 1125-1127.
- 32. Santiago, M., Rollema, H., de Vries, J. B., and Westerink, B. H. C., 1991. Acute effects of intranigral application of MPP⁺ on nigral and bilateral striatal release of dopamine simultaneously recorded by microdialysis. Brain Res. 538:226–230.
- 33. Sirinathsinghji, D. J., Dunnett, S. B., Northrop, A. J., and Morris, B. J., 1990. Experimental hemiparkinsonism in the rat following chronic unilateral infusion of MPP* into the nigrostriatal dopamine pathway. III. Reversal by embryonic nigral dopamine grafts. Neuroscience 37:757-766.
- Santiago, M., Westerink, B. H. C., and Rollema, H., 1991. Responsiveness of striatal dopamine release in awake animals after chronic 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced lesions of the substantia nigra. J. Neurochem. 56:1336-1342.

ANNEX 8



Journal of Neuroimmunology 113 (2001) 146-152

Journal of Neuroimmunology

www.elsevier.com/locate/jneuroin

Lymphocyte populations in Parkinson's disease and in rat models of parkinsonism

Jordi Bas^{a,*}, Màtil Calopa^b, Mariona Mestre^a, David G. Molleví^a, Blanca Cutillas^c, Santiago Ambrosio^c, Enric Buendia^a

^aImmunology Service, Hospital Duran i Reynals, CSU de Bellvitge, Autovia de Castelldefels Km 2.7, L'Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona,

Catalonia, Spain

^bNeurology Service, Ciutat Sanitària Universitària de Bellvitge, Barcelona, Catalonia, Spain ^cBiochemistry Department, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain

Received 16 May 2000; received in revised form 28 September 2000; accepted 10 October 2000

Abstract

To assess the involvement of the immune system in Parkinson's disease we studied the phenotype of circulating lymphocytes in 30 untreated and 34 treated patients. We found a numeric decrease in helper T cells (higher in $CD4^+CD45RA^+$ than in $CD4^+CD29^+$) and B cells, and a rise in activated, $CD4^+CD25^+$ lymphocytes that was correlated with lymphocyte depletion. All these alterations were independent of levodopa treatment. In addition, we performed striatal dopamine depletion in rats with either MPP⁺ or 6-OHDA, showing that MPP⁺ but not 6-OHDA can increase $CD4^+CD25^+$ lymphocytes. Thus, mechanisms other than dopamine deficit may explain the immune activation in Parkinson's disease. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Parkinson's disease; Lymphocytes; Dopamine; Rat; Human; Activation

1. Introduction

Idiopathic Parkinson's disease (PD) is a degenerative neurological disorder of unknown etiology. Several pathogenic mechanisms have been proposed to cause neuronal death such as oxidative stress, mitochondrial dysfunction or metabolic impairment. The major neurochemical feature is the loss of dopamine in nigrostriatal pathway but perturbations in other neurotransmitter systems also occur, including noradrenergic and cholinergic, which are related with the regulation of the immune system. Actually, it is not known whether immune mechanisms have a role in neurodegenerative diseases. However, in the last years the implication of the immune system and chronic inflammation in the neuronal death has been suggested (McGeer and McGeer, 1995). In PD, some indications of a certain degree of intracerebral immune activation have been

E-mail address: jbas@csub.scs.es (J. Bas).

described. These include activated microglia in the substantia nigra (McGeer et al., 1988; McGeer and McGeer, 1997a), proinflammatory cytokines (Mogi et al., 1994; McGeer and McGeer, 1997b), and enhanced expression of HLA-DR antigens on CSF monocytes (Fiszer et al., 1994). In addition, several authors have described immunological alterations such as the presence of antibodies against dopaminergic neurons in serum (Defazio et al., 1994) and CSF (Carvey et al., 1991) of PD patients, and higher ADCC activity (Bokor et al., 1993). Less data are available on phenotypic alterations of circulating lymphocytes, but changes in the percentage of CD8⁺ cells and CD4⁺ subsets (Fiszer, 1989; Fiszer et al., 1994) have been reported. All these findings are suggestive of an ongoing immune response that could play a role in the pathogenesis of the disease; however, the existence of immune activation in peripheral blood remains controversial. Indirect signs of lymphocyte activation, such as increased adenosine deaminase activity, have been observed by some authors (Chiba et al., 1995), but defective production of interleukin-2 by peripheral blood lymphocytes has also been demonstrated (Kluter et al., 1995).

In this context, the present study was aimed to assess the

Abbreviations: MPP⁺, 1-methyl-4-phenylpyridium; 6-OHDA, 6-hydroxydopamine

^{*}Corresponding author. Tel.: +34-93-3357011, ext. 3373; fax: +34-93-2607778.

composition of peripheral blood lymphocyte subsets and the presence of activated T cells in peripheral blood of PD patients. Furthermore, since the neuroendocrine regulation of the immune system could be impaired, we also assessed the role of dopamine in the described alterations of lymphocyte subsets. This was accomplished by comparing treated with untreated patients and by testing the effect of experimentally induced dopamine depletion in rats on the 'in vivo' activation of lymphocytes.

2. Material and methods

2.1. Patients

Sixty-four patients controlled in the Movement Disorders Unit of the Neurology Department of our Center and meeting strict inclusion criteria were selected for the study. These criteria included to fulfill diagnostic criteria of idiopathic Parkinson's disease (Calne et al., 1992) and the absence of central nervous system lesions by a CT scan. The exclusion criteria were the presence of diseases that could affect significantly the immunological parameters assessed, such as inflammatory processes, autoimmune diseases and neoplasia. Moreover, any patient should be under immunosuppressive treatment. Concomitant illnesses at the time of the study are summarized in Table 1.

The clinical status was assessed by the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) (Lang and Fann, 1989) and Hoehn and Yahr stage (Hoehn and Yahr, 1967). Thirty patients (mean age 66 ± 11 S.D. years old) were of 'de novo' diagnosis (1.8 ± 2.2 years after presentation of symptoms) and the immunological study was carried out before treatment initiation. All of them showed a good response to antiparkinsonian treatment. Thirty-four patients (mean age 65 ± 9 S.D. years old) were under antiparkinsonian treatment (levodopa in all cases, plus dopaminergic agonists in 19 cases, seven of which were also treated with selegiline) for a mean time of 5 ± 3.7 years (from 1 to 13) at the time of study.

Table 1

Summary of other diseases present in the patient population at the time of the study

| No. of | Disease |
|--------|--|
| cases | |
| 12 | Arterial hypertension |
| 12 | Dyslipemia |
| 10 | Depression |
| 7 | Diabetes mellitus type II |
| 5 | Ischemic cardiomyopathy |
| 4 | Benign hyperplasia of prostate |
| 3 | Arrhythmia |
| 1 | Chronic renal failure |
| 1 | Chronic hepatitis C |
| 9 | Other (arthrosis, hyperuricemia, ulcus) |

Thirty-eight healthy blood donors (mean age 63 ± 4 S.D. years old) were included as a control group.

2.2. Analysis of human lymphocyte subsets

Blood extraction was always performed from 08:00 to 10:00 h. Blood was drawn in tubes containing K3EDTA. Sample processing for flow cytometry was carried out directly from whole blood as described elsewhere (Mestre et al., 1992), since density gradient enrichment of mononuclear cells before analysis results in significant alterations of several lymphocyte subset percentages (Romeu et al., 1992). The cells were stained with the following fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies, alone or in double combinations: FITC-Leu4 (CD3), FITC-Leu3a (CD4), FITC-Leu 2a (CD8), PE-IL2R (CD25) and PE-Leu12 (CD19) all from Becton-Dickinson (San Jose, CA) and with FITC-T4 (CD4), TRD1-4B4 (CD29), TRD1-2H4 (CD45RA), from Coulter (Hialeah, FL). A negative control stained with an irrelevant monoclonal antibody was always included. The samples were analyzed in direct double immunofluorescence by a FACSscan flow cytometer (Becton-Dickinson). Four thousand events were acquired per sample and the percentage of lymphocyte subsets was calculated by using the CELLQuest[™] software.

2.3. Soluble IL2 receptor quantitation

Measurement of soluble IL-2 receptor was carried out in 19 PD patients and 21 healthy subjects. Blood was allowed to clot and centrifuged at $4000 \times g$. Serum was stored at -80° C until assay. The concentration of soluble IL-2 receptor was determined by a commercially available enzyme immunoassay (Immunotech, France) following the manufacturer's directions. The assay uses monoclonal antibodies directed against two different epitopes of the IL-2 receptor and reports a sensitivity of 5 pM.

2.4. Induction of Parkinsonism in rats

Two different models of dopamine neuronal degeneration have been used: nigrostriatal degeneration by 6-OHDA injected into the substantia nigra and striatonigral degeneration by MPP+ injected into the striatum. The time after the lesion corresponds for each treatment to the maximal effect described on the striatal dopamine content and turnover (Espino et al., 1995). The parkinsonism models employed have been previously described (Espino et al., 1994b, 1995). Male Sprague–Dawley rats were bilaterally lesioned with 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (24 µg in 3 µl) into the substantia nigra (coordinates: A, +4.8; L, ± 1.6 ; H, -7.8) (n=6) or with MPP⁺ (12 µg in 4 µl) into the striatum (coordinates: A, +0.7; L, ± 3.2 ; H, -5) (n=6). Sham-operated rats (n=12) received an equal

J. Bas et al. / Journal of Neuroimmunology 113 (2001) 146-152

volume of saline solution and were considered as controls. For the first 2 days after the lesion, the animals were fed by s.c. administration of glucose solution. 6-OHDA group was killed after 3 weeks and MPP⁺ group after 48 h, both by decapitation. Saline groups were killed at the same correspondent times. We had previously described that bilateral administration of 6-OHDA reduces the striatal dopamine content below 5% of normal values 3 weeks after the treatment, whereas the MPP⁺ treatment reduces both dopamine and GABA content by near 50% after 48 h (Espino et al., 1995). Bilaterally lesioned animals into both the substantia nigra and the striatum did not survive.

2.5. Enumeration of rat lymphocyte subsets

Rat lymphocytes were obtained from blood and from mesenteric lymph nodes. Sample processing for flow cytometry was performed as described for human patients. The cells were stained with the following fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies PE-W3/25 (CD4) and FITC-OX39 (CD25) (Serotec, UK). Acquisition conditions of the cytometer were adjusted for rat lymphocytes and the analysis was carried out as described before.

2.6. Statistics

Both groups of PD patients were compared with healthy control individuals of similar age to prevent the biases of some lymphocyte subsets, such as $CD4^+CD45RA^+ T$ cells. Lymphocyte subset percentages and absolute values were compared by the Student's *t*-test (two-tailed). Correlation tests (Pearson coefficient) were performed with some variables such as the age of disease onset, the duration of the disease and the UPDRS (Part 3) with both percentages and absolute values of lymphocyte populations. Intragroup comparisons and the analysis of data from rat experiments were performed by the Mann-Whitney *U*-test (two-tailed).

| Table 2 | | | | | | | |
|----------|--------|----|------------|---------|----|-------------|---------|
| Absolute | values | of | lymphocyte | subsets | in | Parkinson's | disease |

| Table 3 | | | | | | |
|----------|-----------|---------------|---------|----|-------------------------|---|
| Relative | values of | of lymphocyte | subsets | in | Parkinson's disease | |
| | | | 2000 | _ | 7.1. 22.55 151.55 24.55 | _ |

| | Controls (n=38) | Untreated (n=34) | Treated (n=30) | All patients (n=64) |
|--------------------------------------|-----------------|------------------|-------------------|------------------------|
| CD3* | 71±7 | 69±8 | 68±11 | 68±9 |
| CD4 ⁺ | 47±7 | 40 ± 7^{a} | $40\pm8^{\circ}$ | $40\pm8^{\circ}$ |
| CD8 ⁺ | 29±7 | 34 ± 7^{b} | 35±8" | 35±8° |
| CD19 ⁺ | 11±5 | $9\pm5^{\circ}$ | 9±6 | 9 ± 6^{d} |
| CD4 ⁺ CD29 ⁺ | 29±5 | 28 ± 6 | 30±7 | 29 ± 7 |
| CD4 ⁺ CD45RA ⁺ | 20 ± 8 | 13±6ª | 11 ± 5^{a} | $12\pm5^{*}$ |
| CD4 ⁺ CD25 ⁺ | 8±3 | 17 ± 7^{a} | 17 ± 7^{a} | $17\pm7^{\rm a}$ |

Mean (\pm S.D.) of lymphocyte population percentages of Parkinson's disease patients. Comparison with healthy subjects (Student's *t*-test). Two-tailed *P* values: (a) *P*<0.001; (b) *P*=0.003; (c) *P*=0.047; (d) *P*=0.020.

3. Results

3.1. Peripheral blood T cell subsets in Parkinson's disease

The analysis of lymphocyte subsets including all 64 patients showed lower lymphocyte counts in Parkinson patients than in control subjects (1839±577 vs. 2227 ± 541 ; P=0.001) due to the decrease in the number of both T (CD3⁺) and B (CD19⁺) cells. As is shown in Table 2, the changes in T cells were caused by a decrease in the number of helper T cells (CD4⁺ lymphocytes) while its counterpart, the cytotoxic/suppressor CD8⁺ lymphocytes remained unchanged. When the results were expressed as percentages (Table 3) the values of T cells (CD3⁺) were maintained in comparison with the group of healthy subjects and the percentage of B cells (CD19⁺ lymphocytes) was slightly decreased. The observed decrease in absolute counts of CD4⁺ cells was also reflected in a decrease in the percentage of CD4⁺ lymphocytes with a concomitant increase in the relative values of CD8⁺ cells. This yielded a lower CD4/CD8 ratio (1.26±0.52 vs. 1.79 \pm 0.65; P<0.001). The fall in the absolute values of CD4⁺ lymphocytes was caused mainly by the 'naive'

| | Controls | Untreated | Treated | All patients |
|--------------------------------------|----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | (n=38) | (n=34) | (n=30) | (<i>n</i> =64) |
| CD3 ⁺ | 1599±482 | 1212±391 ^b | 1287±422 ^d | 1252±406* |
| CD4 ⁺ | 1065 ± 358 | 714±272 ^a | 755±231ª | 736±250 ^a |
| CD8 ⁺ | 641±227 | 595±201 | 691±320 | 647 ± 274 |
| CD19 ⁺ | 254±122 | 168±137° | 163 ± 144^{d} | $165 \pm 140^{\circ}$ |
| CD4 ⁺ CD29 ⁺ | 639±201 | $499 \pm 160^{\circ}$ | 560±188 | 532±177 ^g |
| CD4 ⁺ CD45RA ⁺ | 458±247 | 238±161* | 215±120 ^a | 226±136 ^a |
| CD4 ⁺ CD25 ⁺ | 184 ± 89 | 290 ± 116^{a} | 310±131* | 301 ± 124^{a} |

Mean (\pm S.D.) of absolute counts (cells/µl) of lymphocyte populations of Parkinson's disease patients. Comparison with healthy subjects (Student's *t*-test). Two-tailed *P* values: (a) *P*<0.001; (b) *P*=0.001; (c) *P*=0.003; (d) *P*=0.005; (e) *P*=0.009; (f) *P*=0.002; (g) *P*=0.006.

subset (CD4⁺CD45RA⁺ cells). However, the number of 'memory' helper T cells (CD4⁺CD29⁺) was also significantly decreased, but at a lesser extent. As it is shown in Table 3, there were no differences in the percentage of 'memory' cells but a decrease in the percentage of the 'naive' subset that caused the increase in the CD29/CD45RA ratio (3.16 \pm 2.89 vs. 1.70 \pm 0.87; *P*<0.001).

In addition, there was a high increase in the number and percentage of activated helper T cells ($CD4^+CD25^+$). The rise in activated $CD4^+$ cells above the reference range established in our laboratory was observed in 24 treated and 26 untreated patients but only in six control individuals. Moreover, the percentage of $CD4^+CD25^+$ T cells showed a negative correlation with the number of total lymphocytes (Pearson coefficient: -0.3183; P=0.012) (Fig. 1) and with the absolute number of $CD4^+CD45RA^+$ T cells (Pearson coefficient: -0.2542; P=0.048). These correlations were not found in the control group of healthy subjects. Parkinson patients did not show increased concentration of soluble IL-2 receptor with respect to the control group of healthy subjects (58.5 ± 46 vs. 57 ± 14 pM).

In order to assess the influence of the standard antiparkinsonian therapy on the lymphocyte populations treated and untreated patients were compared separately with the same control group (Tables 2 and 3). The behavior of the lymphocyte subsets in both groups of patients was essentially identical, maintaining the differences that were observed with respect to control individuals in the global analysis. Both untreated and treated PD patients showed a significant decrease in the 'naive' subset (CD4⁺CD45RA⁺) and a marked increase in activated,



Fig. 1. Scatter distribution of Log_{10} of lymphocyte count against the percentage of CD4⁺CD25⁺ T cells considering all PD patients. Pearson correlation coefficient: -0.3183; P=0.012.

 $CD4^+CD25^+$ T cells. However, the decrease in the 'memory' $CD4^+CD29^+$ cells lost his statistical significance in the treated group. Finally, to assess the possible role of dopamine agonists, patients under agonist treatment (19 cases) were compared with those not receiving agonists (15 cases), but no significant differences were observed, although a tendency (P=0.0925) towards an increase in lymphocyte count was observed in the cases under agonist therapy.

Finally, the absolute number and percentage of lymphoid subsets did not correlate with either the severity of the disease, expressed as the UPDRS, or the duration of the disease. As expected, a negative correlation was observed between the CD4⁺CD45RA⁺ lymphocytes and the age of both, patients and control individuals (not shown).

3.2. Lymphocyte activation in parkinsonian rats

We tested whether the activation of the CD4⁺ lymphocyte subset observed in PD patients could be secondary to the dopaminergic deficit. In this way, rats were depleted of endogenous dopamine by bilateral striatal injection of MPP⁺ or by bilateral injection of 6-OHDA into substantia nigra nuclei. Peripheral blood samples were drawn by cardiac puncture but their cytometric analysis revealed too low numbers of activated CD4⁺ lymphocytes expressing the α chain of the interleukin-2 receptor (CD25) to allow a reliable analysis. Thus, we studied lymphocytes extracted from mesenteric lymph nodes instead. Control rats showed very similar values and were grouped for comparisons with treated rats. Animals with bilateral lesions in the substantia nigra may be considered to have lost almost all the dopamine striatal content, and MPP⁺-treated animals have not such an extensive dopamine striatal depletion but they have damage to other neurotransmitter systems (i.e., GABA) and the blood-brain barrier integrity (Espino et al., 1994a, 1995). 6-OHDA treatment failed to increase significantly the percentage of activated lymphocytes. Only the group treated with MPP⁺ showed a slight but significant increase in CD4⁺CD25⁺ lymphocytes (Fig. 2).

4. Discussion

In recent years, a number of studies have suggested the involvement of immunological mechanisms in some neurodegenerative diseases, and this represents a conceptual challenge. The alterations in lymphocyte subsets have been widely described in autoimmune diseases, but data in neurodegenerative diseases such as PD are scarce. Our results are very interesting because they showed the depletion of some lymphocyte subsets in peripheral blood of PD patients and a certain degree of immunological activation. It is the first study in which cytometry data are



Fig. 2. Percentage of CD4⁺CD25⁺ lymphocytes (expressed as percent of CD4⁺T cells) in peripheral ganglia of rats bilaterally lesioned in the substantia nigra (6-OHDA) (n=6) or in the striatum (MPP⁺) (n=6). Sham bilaterally treated animals with saline physiological solution were used as controls (n=12). Mann–Whitney U-test (*) P=0.0047 (two-tailed).

expressed in absolute counts, in addition to relative values. This approach allows a more accurate description of the variations in every lymphocyte population studied.

Our data on relative values of lymphocyte subsets supports part of the observations of Fiszer, who reported an increase in the proportion of $CD8^+$ suppressor lymphocytes that lowered the ratio helper/suppressor cells (Fiszer, 1989). However, the expression of our results as absolute cell counts allowed us to extend their findings by showing that the percent increase in $CD8^+$ T cells was actually caused by a selective decrease in the number of $CD4^+$ T cells without changes in the number of $CD8^+$ lymphocytes.

We also found that the decrease in CD4⁺ T cell number in Parkinson patients involved mainly the 'naive' CD4⁺CD45RA⁺ T cells. However, the 'memory' helper T cells (which can be defined by either CD29 or CD45RO expression) also showed a significant reduction. The only previous report of these subpopulations in PD observed a percentual decrease in CD4⁺CD45RA⁺ T cells with an increase in the CD4⁺CD45RO⁺ T cells (Fiszer et al., 1994). Since CD45RA⁺ and CD29⁺/CD45RO⁺ subsets of CD4⁺ T cells are mutually exclusive this apparent increase may be the result of a more marked depletion of CD45RA⁺ than of CD45RO⁺ helper T cells as we have observed in the present study.

The CD4⁺CD45RA⁺ subset mainly consists of 'naive' T cells that are believed to exert a suppressor-inducer function. The decrease of this subset has been described in several autoimmune diseases such as systemic lupus (Morimoto et al., 1987), rheumatoid arthritis (Emery et al., 1987) and diabetes mellitus (Al-Kassab and Raziuddin, 1990). It has also been observed in multiple sclerosis, where the reduction of suppressor-inducer T cells during

J. Bas et al. / Journal of Neuroimmunology 113 (2001) 146-152

clinical exacerbation has been related to a concomitant decrease in suppressor function (Chofflon et al., 1988; Calopa et al., 1995). However, the finding of a decrease in $CD4^+CD45RA^+$ T cells in a different pathological context such as PD, suggests that there are mechanisms linked to the neurodegeneration that lead to qualitative and quantitative variations in circulating lymphocytes similar to those observed in autoimmune diseases. Changes in functional differentiation or recirculation by alterations in the neuroendocrine regulation of the immune system, even selective apoptosis of susceptible lymphocyte populations may have a role.

Interleukin-2 has an essential role in activation, growth and differentiation of lymphocytes. It exerts its effects via a three-chain surface receptor where the α -chain is the CD25 molecule. Since it is not expressed on resting T cells, the detection of CD25 on the cell membrane or its soluble form in plasma indicates lymphocyte activation. The increase in CD4⁺CD25⁺ T cells is a very consistent finding in our study and clearly indicates that systemic immune activation is associated with the degeneration of neural structures in PD. Our findings are in agreement with a report of a slight increase in circulating cells positive for CD25 and HLA-DR in PD patients (Chiba et al., 1995). However, this study used a single labeling technique and the mean percentages of CD25⁺ cells found in both healthy controls and PD patients were much lower than those from our study. Our results also support more indirect indications of T lymphocyte activation such as an increase in adenosine deaminase activities (Chiba et al., 1995) and the finding of decreased lymphocyte receptors for IFN-γ and TNF-α, in PD (Bongioanni et al., 1997a,b). Interestingly, this is in contrast to some inflammatory neurological diseases, including multiple sclerosis, where the presence of activated T cells in peripheral blood is not a consistent observation (Bellamy et al., 1985; Hafler et al., 1985; Selmaj et al., 1986; Calopa et al., 1995). Again, the alterations of the immune system in neurological diseases seem to depend on the particular pathogenic mechanisms involved in each process. Furthermore, the degree of T cell activation in PD is not comparable to those found in systemic autoimmune diseases such as active lupus or during allograft rejection, in view of the low levels of soluble form of CD25 detected in our patients.

In the search for a link between the neurodegenerative processes and the peripheral immune activation observed in Parkinson patients it was of interest to assess the role of the depletion of endogenous dopamine in the rise of CD4⁺CD25⁺ T cells because this is the neurotransmitter most severely affected in PD. Dopamine receptors have been described in lymphocytes (Faraj et al., 1991; Nagai et al., 1996; Ricci et al., 1997; Barbanti et al., 1999) and experimental lesions of dopaminergic pathways induced changes in T lymphocyte proliferation in mice (Deleplanque et al., 1994). Surprisingly, the depletion of dopamine

by bilateral 6-OHDA injection into substantia nigra in rats failed to reproduce the increase in CD4⁺CD25⁺ T cells observed in our patients.

This fact, together with the finding that the alterations in phenotype and activation of lymphocytes in our Parkinson patients are not reversed by levodopa treatment, suggests that the loss of nigrostriatal dopamine by itself is not involved in the immune activation observed in PD. On the other hand, the fact that the bilateral lesion of striatum by MPP^+ yielded moderate increases in lymph node CD4⁺CD25⁺ cells suggests that activation may be induced by changes in other striatal factors (Espino et al., 1995), since MPP⁺-striatal lesions cause not only dopamine loss but also affects gabaergic and other cells. However, since we have found that MPP⁺ treatment also causes a partial disruption of the blood-brain barrier with macrophage and lymphocyte invasion of the striatum (Espino et al., 1994a), it cannot be ruled out that this inflammatory response could contribute to the activation of T helper cells in this model.

The finding of a significant decrease in the number of lymphocytes and of CD4⁺CD45RA⁺ T cells in our patients that was inversely correlated with the percentage of CD4⁺CD25⁺ T cells, suggests other mechanism in Parkinson patients as an alternative explanation for the increase in lymphocyte activation. It is known that the interaction between Fas ligand (CD95L) and Fas (CD95) on activated lymphocytes, is an important pathway in the regulation of cell death and this plays a significant role in the maintenance of immunological homeostasis. Lymphocytes dying of apoptosis do express activation molecules such as CD25 (Kishimoto et al., 1995), even Fas-mediated apoptosis is controlled by signals generated by the IL-2 receptor (Fournel et al., 1996). At present, there is an emerging body of evidence of the participation of apoptosis as a mechanism of cell death in neurodegenerative diseases such as Parkinson (Ziv and Melamed, 1998). Moreover, an increase in both lymphocyte activation in peripheral blood and 'in vitro' apoptosis (Fas antigen expression) has been found recently in some cases of Alzheimer's disease (Lombardi et al., 1999). In view of these data, we suggest that the observed increase in CD4⁺CD25⁺ T cells may be related with the presence of increased lymphocyte apoptosis, which could cause lower lymphocyte numbers in PD.

In conclusion, the data presented here indicate the existence of a significant decrease in circulating T CD4+ cells, particularly with 'naive' phenotype, and B lymphocytes. In addition, there are signs of immune activation in peripheral blood that we failed to relate with the depletion of endogenous dopamine that occurs in PD. Other neuro-transmitters with immunosuppressive function such as norepinephrine may be involved, but, since the activation is correlated with the decrease in circulating lymphocytes, we also suggest that apoptosis may explain the observed alterations. Therefore, further studies are currently in

progress in our laboratory to test this hypothesis and its implications for the pathogenesis of the disease.

Acknowledgements

The authors thank Mr. Jordi Bonete and Mrs. Carme Salarich for his skillful technical assistance. We also thank Dr. A. Rubió for providing blood donor samples. Financial support from the 'Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social', grant 94/1100.

References

- Al-Kassab, A.S., Raziuddin, S., 1990. Immune activation and T cell subset abnormalities in circulation of patients with recently diagnosed type I diabetes mellitus. Clin. Exp. Immunol. 81, 267–272.
- Barbanti, P., Fabbrini, G., Ricci, A., Cerbo, R., Bronzetti, E., Caronti, B., Calderaro, C., Felici, L., Stocchi, F., Meco, G., Amenta, F., Lenzi, G.L., 1999. Increased expression of dopamine receptors on lymphocytes in Parkinson's disease. Mov. Disord. 14, 764–771.
- Bellamy, A.S., Calder, V.L., Feldmann, M., Davison, A.N., 1985. The distribution of interleukin-2 receptor-bearing lymphocytes in multiple sclerosis: evidence for a key role of activated lymphocytes. Clin. Exp. Immunol. 61, 248–256.
- Bokor, M., Farago, A., Garam, T., Malatinszky, G., Schnabel, R., 1993. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) in Parkinson's disease. J. Neurol. Sci. 115, 47–50.
- Bongioanni, P., Castagna, M., Maltini, S., Boccardi, B., Dadone, F., 1997a. T-lymphocyte tumor necrosis factor-alpha receptor binding in patients with Parkinson's disease. J. Neurol. Sci. 149, 41–45.
- Bongioanni, P., Mondino, C., Borgna, M., Boccardi, B., Sposito, R., Castagna, M., 1997b. T-lymphocyte immuno-interferon binding in parkinsonian patients. J. Neural. Transm. 104, 199–207.
- Calne, D.B., Snow, B.J., Lee, C., 1992. Criteria for diagnosing Parkinson's disease. Ann. Neurol. 32, S125–S127.
- Calopa, M., Bas, J., Mestre, M., Arbizu, T., Peres, J., Buendia, E., 1995. T cell subsets in multiple sclerosis: a serial study. Acta Neurol. Scand. 92, 361–368.
- Carvey, P.M., McRae, A., Lint, T.F., Ptak, L.R., Lo, E.S., Goetz, C.G., Klawans, H.L., 1991. The potential use of a dopamine neuron antibody and a striatal-derived neurotrophic factor as diagnostic markers in Parkinson's disease. Neurology 41 (Suppl. 2), 53–58.
- Chiba, S., Matsumoto, H., Saitoh, M., Kasahara, M., Matsuya, M., Kashiwagi, M.A., 1995. A correlation study between serum adenosine deaminase activities and peripheral lymphocyte subsets in Parkinson's disease. J. Neurol. Sci. 132, 170–173.
- Chofflon, M., Weiner, H.L., Morimoto, C., Hafler, D.A., 1988. Loss of functional suppression is linked to decreases in circulating suppressorinducer (CD4⁺²H4⁺) T cells in multiple sclerosis. Ann. Neurol. 24, 185–191.
- Defazio, G., Dal Toso, R., Benvegnu, D., Minozzi, M.C., Cananzi, A.R., Leon, A., 1994. Parkinsonian serum carries complement-dependent toxicity for rat mesencephalic dopaminergic neurons in culture. Brain Res. 633, 206–212.
- Deleplanque, B., Vitiello, S., Le Moal, M., Neveu, P.J., 1994. Modulation of immune reactivity by unilateral striatal and mesolimbic dopaminergic lesions. Neurosci. Lett. 166, 216–220.
- Emery, P., Gentry, K.C., Mackay, I.R., Muirden, K.D., Rowley, M., 1987. Deficiency of the suppressor inducer subset of T lymphocytes in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 30, 849–856.
- Espino, A., Tortosa, A., Bendahan, G., Bartrons, R., Calopa, M., Ferrer, I., Ambrosio, S., 1994a. Stereotaxic administration of 1-methyl-4-

phenylpyridinium ion (MPP⁺) decreases striatal fructose 2,6-bisphosphate in rats. J. Neurochem. 62, 1913–1920.

- Espino, A., Ambrosio, S., Bartrons, R., Bendahan, G., Calopa, M., 1994b. Cerebrospinal monoamine metabolites and amino acid content in patients with parkinsonian syndrome and rats lesioned with MPP^{*}. J. Neural. Transm. 7, 167–176.
- Espino, A., Llorens, J., Calopa, M., Bartrons, R., Rodriguez-Farre, E., Ambrosio, S., 1995. Cerebrospinal dopamine metabolites in rats after intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine or 1-methyl-4phenylpyridinium ion. Brain Res. 669, 19–25.
- Faraj, B.A., Olkowski, Z.L., Jackson, R.T., 1991. Binding of (3H)dopamine to human lymphocytes. Possible relationship to neurotransmitter uptake sites. Pharmacology 42, 135–141.
- Fiszer, U., 1989. Badania stanu immunologicznego u osob z choroba Parkinsona z uwzglednieniem wpływu leczenia lewodopa. Doniesienie wstepne. Neurol. Neurochir. Pol. 23, 7–11.
- Fiszer, U., Mix, E., Fredrikson, S., Kostulas, V., Link, H., 1994. Parkinson's disease and immunological abnormalities: increase of HLA-DR expression on monocytes in cerebrospinal fluid and of CD45RO⁺ T cells in peripheral blood. Acta Neurol. Scand. 90, 160–166.
- Fournel, S., Genestier, L., Robinet, E., Flacher, M., Revillard, J.P., 1996. Human T cells require IL-2 but not G1/S transition to acquire susceptibility to Fas-mediated apoptosis. J. Immunol. 157, 4309– 4315.
- Hafler, D.A., Fox, D.A., Manning, M.E., Schlossman, S.F., Reinherz, E.L., Weiner, H.L., 1985. In vivo activated T lymphocytes in the peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. New Engl. J. Med. 22, 1405–1411.
- Hoehn, M.M., Yahr, M.D., 1967. Parkinsonism: onset, progression and mortality. Neurology 17, 427–442.
- Kishimoto, H., Surh, C.D., Sprent, J., 1995. Upregulation of surface markers on dying thymocytes. J. Exp. Med. 181, 649–655.
- Kluter, H., Vieregge, P., Stolze, H., Kirchner, H., 1995. Defective production of interleukin-2 in patients with idiopathic Parkinson's disease. J. Neurol. Sci. 133, 134–139.
- Lang, A.E., Fann, S., 1989. Assessment of Parkinson's disease. In: Munsat, T.L. (Ed.), Quantification of Neurologic Deficit. Butterworths, Boston, MA, pp. 285–309.
- Lombardi, V.R., Garcia, M., Rey, L., Cacabelos, R., 1999. Characterization of cytokine production, screening of lymphocyte subset patterns and in vitro apoptosis in healthy and Alzheimer's Disease (AD) individuals. J. Neuroimmunol. 97, 163–171.

- McGeer, P.L., McGeer, E.G., 1995. The inflammatory response system of the brain: implications for therapy of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. Brain Res. Rev. 21, 195–218.
- McGeer, E.G., McGeer, P.L., 1997a. The role of the immune system in neurodegenerative disorders. Mov. Disord. 12, 855–858.
- McGeer, E.G., McGeer, P.L., 1997b. Inflammatory cytokines in the CNS. CNS Drugs 7, 214–228.
- McGeer, P.L., Itagaki, S., Boyes, B.E., McGeer, E.G., 1988. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. Neurology 38, 1285– 1291.
- Mestre, M., Gonzalez, C., Griñó, J.M., Valls, A., Bonete, J., Mané, E., Corominas, M., Bas, J., Romeu, A., Buendia, E., 1992. Sequential monitoring of immunoregulatory cell subsets in renal transplantation. Transplant. Proc. 24, 73–75.
- Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Riederer, P., Inagaki, H., Minami, M., Nagatsu, T., 1994. Interleukin-1beta, interleukin 6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from Parkinsonian patients. Neurosci. Lett. 180, 147–150.
- Morimoto, C., Steinberg, A.D., Letvin, N.L., Hagan, M., Takeuchi, T., Daley, J., Levine, H., Schlossman, S.F., 1987. A defect of immunoregulatory T cell subsets in systemic lupus erythematous patients demonstrated with anti-2H4 antibody. J. Clin. Invest. 79, 762–768.
- Nagai, Y., Ueno, S., Saeki, Y., Soga, F., Hirano, M., Yanagihara, T., 1996. Decrease of the D3 dopamine receptor mRNA expression in lymphocytes from patients with Parkinson's disease. Neurology 46, 791–795.
- Ricci, A., Mariotta, S., Greco, S., Bisetti, A., 1997. Expression of dopamine receptors in immune organs and circulating immune cells. Clin. Exp. Hypertens. 19, 59–71.
- Romeu, A., Mestre, M., Gonzalez, L., Valls, A., Verdaguer, J., Corominas, M., Bas, J., Masip, E., Buendia, E., 1992. Lymphocyte immunophenotyping by flow cytometry in normal adults. Comparison of fresh whole blood lysis technique, Ficoll-Paque separation and cryopreservation. J. Immunol. Methods 154, 7–10.
- Selmaj, K., Plater-Zybergk, C., Rockett, K.A., Maini, R.N., Alam, R., Perkin, G.D., Rose, F.C., 1986. Multiple sclerosis: increased expression of interleukin-2 receptors on lymphocytes. Neurology 36, 1392– 1395.
- Ziv, I., Melamed, E., 1998. Role of apoptosis in the pathogenesis of Parkinson's disease: a novel therapeutic opportunity? Mov. Disord. 13, 865–870.

ANNEX 9

Neurochemical Research, Vol. 21, No. 1, 1996, pp. 73-78

MPP⁺ Toxicity in Rat Striatal Slices: Relationship Between Non-Selective Effects and Free Radical Production

S. Ambrosio,¹ A. Espino,¹ B. Cutillas,¹ and R. Bartrons¹

(Accepted October 19, 1995)

Incubations of rat striatal slices have been used to assay MPP⁺ neurotoxicity. MPP⁺, at concentrations of 1 mM or higher, caused a marked increase in hydroxyl radicals, measured as malondialdehyde (MDA) accumulation, but not in nitric oxide production. At these doses, MPP⁺ showed an effect on dopamine terminals, causing a massive dopamine decrease, and on non-neuronal glial cells, where a marked reduction in glutamine synthetase activity was detected. At lower concentrations (25 µM), the toxic effect on dopaminergic endings was maintained without increasing malondialdehyde concentrations or inhibiting glutamine synthetase activity. The effect on glutamine synthetase was prevented by the addition to the medium of 0.5% dimethyl sulfoxide, a hydroxyl-radical scavenger, but this did not protect the effect of dopamine depletion. We propose that non-selective effects of MPP⁺, at doses of 1 mM or higher, are mediated by extracellular overproduction of hydroxyl radicals. The main factor responsible for this overproduction would not be the released dopamine but rather the MPP⁺ itself, through non selective inhibition of the mitochondrial respiratory chain or through a redox cycling that can trigger oxygen radical production.

KEY WORDS: MPP*; dopamine; striatal slices; hydroxyl radical; glutamine synthetase; NO; DMSO.

INTRODUCTION

MPP⁺ is the major neurotoxic metabolite of MPTP (1). The mechanisms of action of MPP⁺ have been extensively studied but they are not yet fully understood. MPP⁺ enters the dopamine nerve endings via the dopamine-reuptake systems (2). Inside the neuron it can be stored in vesicular compartments (3) or it can enter the mitochondria, blocking the complex I of the respiratory chain and causing energy failure (1). However, when MPP⁺ is directly injected to the rat striatum it causes non-selective effects that involve not only dopamine depletion but also a loss of GABA (4), induction of astrocytic glial response (5) and damage to the whole cerebral tissue (7,6).

The involvement of radical production in the mechanisms of MPTP toxicity has been proposed from the early studies in MPTP (7). There is evidence that MPP+ produces oxidative stress in vivo through redox cycling in the brain (8, 9). Experiments in vitro show that redox cycling of MPP+ might occur in the presence of flavincontaining redox enzymes, which allow its reduction to a free radical MPP. (8). MPP+ has also been described to cause lipid peroxidation (TBA-reactive products) increase in hepatocyte cultures, although the authors conclude that the cytotoxicity of MPP+ is mainly due to other toxic mechanisms that involve glutathione oxidation and ATP loss (10). Oxygen radical production and its extracellular presence after MPP+ treatment have been demonstrated by cerebral microdialysis in vivo with a radical reagent such as salicylate (11). The formation of

¹ Unitat de Bioquímica, Dep. Ciències Fisiològiques Humanes i de la Nutrició, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

another free radical, nitric oxide (NO), has been involved in brain oxidative stress, glutamate neurotoxicity and neurodegenerative processes (12). The aim of the present work was to study the relationship between the production of MPP+-induced free radicals and the selectivity of the lesion on the dopaminergic system using striatal slices.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials. MPP* iodide was purchased from R.B.I. (Wayland, MA), superoxide dismutase, dimethyl sulfoxide, nitroarginine, and sodium nitroprusside from Sigma-Aldrich Quimica S.A. (Madrid, Spain), fructose 1,6-bisposphate from Boehringer (Mannheim, Germany). Incubation media were prepared with products of the highest purity available.

Animals. Sprague-Dawley rats, weighing 250–350 g, were used for all the experiments. The care and use of these animals were in accordance with the policy on the use of animals in neuroscience research published by the Society for Neuroscience. The protocols were approved by a review committee of the University of Barcelona.

Preparation of Striatal Slices. The rats were killed by decapitation. The right and left striata were quickly dissected and sliced into 0.3 mm sections with a Panlab slicer (Barcelona, Spain). The slices from both striata were incubated at 37°C in 1 ml of Krebs-Ringer bicarbonate buffer, pH 7.2, in a shaking water bath under an atmosphere of 95% O2/5% CO2. The medium consisted of 119 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.7 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 23.8 mM NaHCO1, 5.5 mM glucose, and 25 mM MOPS (13). All the solutions of other compounds added to the incubations were prepared with the same medium. The incubations were carried out for 2 hours. When the incubations were completed the slices and the incubation medium were transferred to microfuge tubes and treated by one of the following procedures depending on the experiment: a) when tissue and supernatant were to be analysed together, slices were homogenized with the incubation medium; b) when only tissue was to be analyzed, slices were washed twice in Krebs-Ringer solution, decanted, homogenized in the appropriate medium (see below), and centrifuged for 10 min. The supernatants were used for the analysis.

Protein content of the tissue extracted was measured by the method of Bradford (14) after solubilization in 1N NaOH.

Free radical Measurements. Malondialdehyde (MDA) was determined as an index of lipid peroxidation using thiobarbiturate reagent (TBA), as in Di Monte et al. (10). Briefly, slices were homogenized with the incubation medium and aliquots of slice homogenates were further incubated for 15 min at 100°C with trichloracetic acid (40% w/v) and TBA (0.67% w/v in 1.5N NaOH). After centrifugation the absorbance in the supernatants was determined at 535 nm against a blank that contained all the reagents minus the slice homogenates. The MDA concentration was calculated using $\varepsilon = 1.56 \times 10^5$ M⁻¹cm⁻¹.

The NO production was determined by the accumulation of nitrite with nitrate reductase (15).

Dopamine and Metabolites Measurements. Dopamine (DA) and its metabolites (dihydroxyphenylacetic acid [DOPAC] and homovanillic acid [HVA]) were determined in striatal tissue, assuming that the effects of MPP⁺ could be measured by the quantification of the remaining DA in the tissue. The slices were homogenized by sonication in 0.5 ml of 0.1N HClO₄. In one experiment DA and its metabolites were also quantified in the whole incubation well, homogenazing the

Ambrosio, Espino, Cutillas, and Bartrons

slices in their own medium. The analyses were carried out as described elsewhere (4). DA, DOPAC and HVA were separated by HPLC (LKB-Pharmacia, Bromma, Sweden), using a nucleosil-C18 (5 µm) reverse phase column (Tracer, Teknokroma, Barcelona, Spain) and an ESA Coulochem II detector (Bedford, MA).

Tyrosine Hydroxylase Activity. The slices were homogenized in 400 µl of sucrose 0.25 M. Tyrosine hydroxylase activity was assayed by the production of 1-dopa after incubation of homogenate slices in a medium that contained 1-tyrosine, 6-methyl-tetrahydropteridine and catalase. The 1-dopa formed was extracted with allumine, separated by a reverse-phase HPLC column and detected with an ESA Coulochem II detector, following the method described by Ambrosio et al. (16). A µU of tyrosine hydroxylase corresponds to a pmol of 1-dopa formed in one min at 37°C.

Glutamine Synthetase Activity. Glutamine synthetase was assayed in tissue slices according to the method of Meister (17), using hydroxylamine as the substrate and monitoring formation of γ -glutamyl hydroxamate colourimetrically. Reaction was stopped at 10 and 20 min with FeCl, (0.37 M) reagent containing 0.67 M HCl and 0.2 M trichloracetic acid, the protein precipitated was removed by centrifugation, and the optical densities of the supernatants were determined at 535 nm. Enzyme activity was calculated with a standard of γ -glutamyl hydroxamate. A mU of glutamine synthetase corresponds to a nmol of γ -glutamyl hydroxamate formed in one min at 37°C.

Statistical comparisons were performed using non-parametric analysis with U-Mann-Whitney test.

RESULTS

Effects of MPP⁺ on Free Radical Production. Striatal slices incubated with different concentrations of MPP⁺ for 2 h revealed a dose-dependent formation of thiobarbituric acid-reactive products (malondialdehyde [MDA] is considered the most relevant), which was significant respect to control values for MPP⁺ concentrations equal to or higher than 1 mM (Fig. 1). Both MPP⁺ (5 mM) and sodium nitroprusside (1 mM) (SNP), a NO donor, increased MDA production after 2 h of incubation, but MPP⁺ alone did not significantly alter NO synthesis (Table I).

Effect of MPP⁺ on Metabolites and Enzymatic Activities. DA and DOPAC content in tissue slices were sharply reduced after 2 h of incubation with all the MPP⁺ concentrations used (Fig. 2), indicating that this occured even when MDA production was not significant. Neither nitroarginine (NO-Arg), an inhibitor of NO-synthase, nor dimethyl sulfoxide (DMSO), a hydroxyl radical scavenger, nor fructose 1,6-bisphosphate (Fru-1,6-P₂), a neuron protector against different insults (18), was able to prevent the effect of MPP⁺ on dopamine (DA) and DOPAC striatal content (Table II). SNP itself showed a neurotoxic effect and, added to the MPP⁺ incubations, caused a dramatic reduction in DA and DOPAC tissue concentrations.



MPP⁺ Toxicity and Radical Production in Striatal Slices

Fig. 1. Malondialdehyde production in rat striatal slices after 2 h of incubation with different concentration of MPP'. The values are the mean \pm SEM for 3 different incubations. * p < 0.05; ** p < 0.01 respect to controls.

Table I. OH • (MDA) and NO•(NO⁻₂) Production by Incubation of Striatal Slices for 2 Hr with MPP⁺ or Sodium Nitroprusside

| | MDA | NO ⁻ ₂ |
|------------|----------------------|------------------------------|
| Control | 1.22 ± 0.21 | 0.63 ± 0.32 |
| MPP+ (5mM) | $3.04 \pm 0.26^{**}$ | 0.96 ± 0.24 |
| SNP (1mM) | $2.06 \pm 0.31^{*}$ | $13.14 \pm 3.84^{***}$ |

Values are given in nmol/mg protein and they are the mean \pm SEM for three different samples. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 respect to control values (U-Mann-Whitney test).

At MPP⁺ concentrations of 0.1 mM and 1 mM dopamine decreased to about 35% of controls. Tyrosine hydroxylase (TH) activity was also decreased but not so extensively as dopamine (50–60% of controls), indicating a limited damage on dopamine endings.

Glutamine synthetase (GS) was determined as a marker for the effects on glial cells, since these cells account for nearly 90% of the glutamine synthetase activity (19). 1 mM MPP⁺, but not 0.1 mM, significantly reduced GS activity (Table III).

Effects of Free-Radical Scavengers on Incubations with MPP^+ . The decrease in GS activity was counteracted by the presence of 0.5% of DMSO, but not of superoxide dismutase (SOD – 1000 units), a superoxide radical scavenger (Table IV). On the other hand, DMSO did not protect striatal slices against the dopamine loss caused by low (25 μ M) or high (1 mM) concentrations of MPP⁺. Moreover, SOD did not protect against dopamine loss. The presence of SOD or DMSO had no effect



75

Fig. 2. Dopamine (\blacksquare) and DOPAC (m) concentrations in rat striatal slices after 2 h of incubation with different concentrations of MPP. The values are the mean \pm SEM for 3 different incubations. * p < 0.05 respect to controls.

upon the activity of GS or the DA content in slices incubated without MPP⁺.

When slices were homogenized in their own incubation media, so that tissue plus supernatant concentrations of dopamine and its metabolites could be detected, no significant differences were found for the DA concentrations between controls and MPP+-treated slices, indicating that the decrease in DA was due to DA release or depletion rather than to a blockage of its synthesis (Table V). DOPAC and HVA levels were clearly higher than in washed slices, indicating their prominent extracellular presence. MPP+ (1 mM) decreased these levels, probably as a consequence of the well-established inhibition of monoamine oxidase (20). The decrease in production of DOPAC and HVA was also counteracted by 0.5% DMSO.

DISCUSSION

Neuronal oxidative stress appears to underlie different neurodegenerative disorders. Among them, Parkinson's disease is characterized by selective degeneration of the dopaminergic neurons that project from the substantia nigra to the caudate-putamen nuclei. The substantia nigra contains neuromelanin and high concentrations of iron that have often been implicated in the oxidative stress that leads to nigrostriatal degeneration (21). In fact, the hydroxyl radical (OH-), the most reactive species formed by oxidative stress, can be generated from H_2O_2 in a process that is markedly accelerated in the presence of Fe²⁺. Catecholamines also react nonenzymatically with oxygen to form quinones

Ambrosio, Espino, Cutillas, and Bartrons

Table II. Dopamine (DA) and Dihydroxyphenylacetic Acid (DOPAC) Concentrations in Rat Striatal Slices after 2 Hr of Incubation with (+) and Without (-) MPP[,] (5 mM) and Other Compounds

| | 1 | DA | DC | OPAC |
|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|--------------------------|
| | - | + | | + |
| Control | 459.4±43.1 | 99.1 ± 22.3*** | 50.7 ± 11.3 | 8.9±1.3*** |
| SNP (1 mM) | $104.2 \pm 16.5"$ | 7.6±0.2** | $8.0 \pm 2.5''$ | $3.3 \pm 0.8^{*\bullet}$ |
| NO-Arg (5 mM) | 481.0 ± 70.3 | $91.1 \pm 30.3^*$ | 73.3 ± 23.0 | $6.9 \pm 0.8*$ |
| DMSO (0.5%) | 467.5 ± 99.1 | $137.9 \pm 8.0*$ | 41.9 ± 6.3 | $12.2 \pm 1.2^*$ |
| Fru-1,6-P2 (5 mM) | 400.3 ± 100.5 | $77.1 \pm 2.3*$ | 34.7 ± 13.9 | $9.8\pm0.1*$ |

Values, given in pmol/mg protein, are the mean ± SEM.

n = 8 for controls; n = 3 for the other incubations.

*P < 0.05, ***P < 0.001 with respect to the correspondent control (without MPP⁺); *P < 0.05 with respect to control values.

•P < 0.05 with respect to controls + MPP⁺.

Table III. Dopamine (DA), Tyrosine Hydroxylase (TH), and Glutamine Synthetase (GS) Values in Rat Striatal Slices after 2 Hr of Incubation with Different Concentrations of MPP*

| | Control | MPP+ 0.1 mM | MPP+ 1 mM |
|-------------------|------------------|-----------------|--------------------|
| DA (pmol/mg prot) | 460.0 ± 80.7 | 177.5±80.0* | 157.4±80.5* |
| TH (µU/mg prot) | 17.2 ± 3.1 | $10.2 \pm 1.1*$ | $8.4 \pm 0.8*$ |
| GS (mU/mg prot) | 16.5 ± 2.1 | 14.2 ± 2.0 | $8.9\pm0.8^{\ast}$ |

Values are the mean ± SEM for three different experiment.

*P < 0.05 respect to controls, U-Mann-Whitney test.

and oxyradicals, so their massive depletion could trigger free radical production, and thus tissue damage.

MPTP, a potent parkinsonizing toxin, generates free radicals in contact with mitochondria preparations (22). At least two processes that could lead to oxygen radical generation are involved in the action mechanisms of MPTP: first, the conversion to the toxic metabolite MPP⁺ by MAO-B, and second, the blockade of mitochondrial complex I by MPP⁺. Moreover, MPP⁺, although it has a high reduction potential, might be involved in redox cycling promoted by different reductases, since it can be transformed to MPP⁻ radical and can generate oxygen radicals (8,9).

In studies where MPP⁺ is directly infused into the rat neostriatum, at concentrations between 1 and 10 mM, with the purpose of causing nigrostriatal degeneration, massive necrosis with spongiosis and central cavitation has been described (5,6,23). In the present study we show that incubations of striatal slices with different concentrations of MPP⁺ increased MDA formation in a dose dependent manner, indicating lipid peroxidation and hydroxyl radical generation (24). MDA production increased significantly at MPP⁺ concentrations equal to or higher than 1 mM. A DA and DOPAC decrease was evident at low concentrations of MPP⁺, in which no increase in MDA was detected. No protective effect was found either by NO-synthase inhibitors or by NO donors. The inhibition of NO-synthase has been previously demonstrated in vivo respectively to protect against the MPTP striatal toxicity in mice (25) and to increase the neurotoxic effect of MPP⁺ in microdialysed rats (26). The role of the NO pathway in MPTP/MPP⁺ toxicity has still to be clarified, but it most probably involves different neuronal pathways at least partly disrupted in striatal slices.

The slight decrease in tyrosine hydroxylase activity, found at low and high MPP⁺ concentrations, indicates that disruption of dopamine endings was only in part responsible for dopamine loss. MPP⁺ and dopamine compete for the same transporter, so that MPP⁺ may have a releasing effect on dopamine terminals. In contrast, glutamine synthetase was inhibited only at concentrations of 1 mM MPP⁺ or higher (not shown).

Dimethyl sulfoxide was added as a hydroxyl radical scavenger at a concentrations (70 mM) at which it has been reported to protect cells against oxidative stress (27). The results obtained show that it decrease the lipid peroxidation (MDA) caused by 1 mM MPP⁺, but it does not prevent the DA decrease mediated by 0.025–5 mM MPP⁺, agreeing with a study on MPTP-treated mice in vivo (28). The lack of effect of SOD might be because this enzyme acts as an extracellular superoxide radical scavenger, while the production of O_2^{-} by MPP⁺ is essentially intracellular.

Glutamine synthetase has been shown to be highly sensitive to inactivation by oxygen radicals (29,30). The inhibition of glutamine synthetase by MPP⁺ could explain the decrease in glutamine and the increase in glutamate previously reported in mouse striatal slices (13),

MPP⁺ Toxicity and Radical Production in Striatal Slices

 Table IV.
 Malondialdehyde and Dopamine Concentrations, and Glutamine Synthetase

 Activity in Rat Striatal Slices after 2 Hr of Incubation with MPP⁺ Alone and with Addition of Superoxide Dismutase (SOD) or Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

| | MDA (nmol/mg prot) | DA (pmol/mg prot) | Glutamine synthetase (mU/mg prot) |
|--------------------------|-----------------------|----------------------|--------------------------------------|
| Control | 1.30 ± 0.14 | 450.0 ± 36.6 | 16.5 ± 2.1 |
| MPP+ (25µM) | 1.53 ± 0.30 | $243.9 \pm 46.4^*$ | ND |
| MPP+ $(25 \mu M)$ + DMSO | 1.36 ± 0.17 | $186.6 \pm 37.7*$ | ND |
| MPP* (1 mM) | $2.44 \pm 0.17^*$ | $90.1 \pm 6.0*$ | $8.9 \pm 0.8^*$ |
| MPP^+ (1 mM) + SOD | $2.13 \pm 0.47*$ | $94.6 \pm 6.4^*$ | $9.1 \pm 0.9*$ |
| MPP^+ (1 mM) + DMSO | $1.68 \pm 0.15"$ | $82.9 \pm 9.0^*$ | 21.1 ± 0.4 " |

Values are the mean \pm SEM of 3 different samples and three different experiments. DMSO was 0.5% w/v (70 mM); the addition of SOD corresponds to 1000 units. *P<0.05 respect to controls; *P<0.05 respect to MPP* (1mM) (U-Mann-Whitney test).

ND: not determined.

Table V. Concentrations of Dopamine and Its Metabolites in Slices of Rat Striatal Tissue (T) and in Slices Plus Their Incubation Medium (T+M) after 2 Hr of Incubation with MPP* and Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

| | _ | DA | DOPAC | HVA |
|-----------|-----|------------------|------------------|--------------------|
| Control | Т | 450.0 ± 36.6 | 49.9 ± 8.3 | 13.6 ± 1.8 |
| | T+M | 458.7 ± 71.2 | 99.7 ± 24.2 | 36.4 ± 7.5 |
| MPP* | Т | $90.1 \pm 6.0^*$ | $28.8 \pm 8.8*$ | $3.7 \pm 0.1^*$ |
| | T+M | 443.1 ± 51.2 | $41.5 \pm 6.3*$ | $12.1 \pm 1.0^{*}$ |
| MPP*+DMSO | Т | $82.9 \pm 9.0^*$ | $21.0 \pm 4.8^*$ | 8.7±3.1* |
| | T+M | 443.2 ± 36.8 | 96.2 ± 23.6 | 26.2 ± 5.3 |

Values are given in pmol/mg protein ± SEM (n=3).

MPP+ was 1 mM; DMSO was 0.5% w/v (70 mM).

*P < 0.05 respect to corresponding controls (U-Mann-Whitney test).

which might aggravate the lesion by MPTP/MPP⁺. This effect on glial cells is completely prevented by 0.5% DMSO.

From the observations described above it seems that at least two processes are involved in the mechanisms of MPP⁺ action:

a) At low concentrations, MPP⁺ has a depleting effect on DA and DOPAC contents that are not protected by radical scavengers nor by other agents that prevent neuronal damage, such as nitroarginine or fructose-1,6 bisphosphate, whereas glutamine synthetase activity is not significantly affected.

b) At concentrations of 1 mM or higher MPP⁺ induces overproduction of hydroxyl radicals that reduces the glutamine synthetase activity, this effect being protected by DMSO.

Thus, non-specific effects seem to occur when hydroxyl radical production increases to levels that cannot be prevented by the cell protective mechanisms. Hydroxyl radicals might be generated from released dopamine, which oxidizes spontaneously in the presence of O_2 , from inhibition of the mitochondrial chain and disruption of dopaminergic endings, but also from MPP+ itself, which, through redox cycling, generates MPP radicals. Most of the radicals generated at high concentrations of MPP+ are probably produced by this last mechanism, which may be blocked by DMSO. Another interesting finding was that inhibition of MAO by MPP+ could be, at least in part, mediated by hydroxyl radical production, since it was counteracted by DMSO. The present results, in agreement with other authors (31-33) show that striatal slices could be a useful model in which to study the mechanisms of MPP+ neurotoxicity, and confirm that only at low doses of MPP+ can specific effects on the dopaminergic system be observed. Our results could also explain the important differences in dopaminergic selectivity described between animals intrastriatally administered with a large dose of MPP+ and animals peripherally treated with MPTP.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the F.I.S. (95/0188) from the Spanish Government. We are also grateful for the technical assistance of C. Ortuño and the language assistance of R. Rycroft.

REFERENCES

- Singer, T. P., and Ramsay, R. R. 1990. Mechanism of the neurotoxicity of MPTP. FEBS Lett. 274:1–8.
- Javitch, J. A., and Snyder, S. H. 1985. Uptake of MPP⁺ by dopamine neurons explains selectivity of parkinsonism-inducing neurotoxin MPTP. Eur. J. Pharmacol. 106:455–456.
- Del Zompo, M., Piccardi, M. P., Ruiu, S., Quartu, M., Gessa, G. L., and Vaccari, A. 1993. Selective MPP⁺ uptake into synaptic dopamine vesicles: possible involvement in MPTP neurotoxicity. Br. J. Pharmacol. 109:411–414.
- Espino, A., Llorens, J., Calopa, M., Bartrons, R., Rodríguez-Farré, E., and Ambrosio, S. 1995. Cerebrospinal dopamine metabolites

in rats after intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine or 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. Brain Res. 669:19-25.

- Espino, A., Tortosa, A., Bendahan, G., Bartrons, R., Calopa, M., Ferrer, I., and Ambrosio, S. 1994. Stereotaxic administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) decreases striatal fructose 2,6-bisphosphate in rats. J. Neurochem. 62:1913–1920.
- Gibb, W., R., G., Costall, B., Domeney, A. M., Kelly, M. E., and Naylor, R. J. 1988. The histological effects of intracerebral injection or infusion of MPTP and MPP⁺ in rat and mouse. Brain Res. 461:361–366.
- Poirer, J., and Barbeau, A. 1985. A catalyst function for MPTP in superoxide formation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 131: 1284–1289.
- Adams, J. D., Klaidman, L. K., and Cadenas, E. 1992. MPP⁺ redox cycling: a new mechanism involving hydride transfer. Pages 239– 240. *in* Langston, W, and Young, A. (eds.) Neurotoxins and neurodegenerative disease. Annals New York Academy of Sciences, New York.
- Adams, J. D., Klaidman, L. K., and Leung, A. C. 1993. MPP^{*} and MPDP^{*} induced oxygen radical formation with mitochondrial enzymes. Free Rad. Biol. Med. 15:181–186.
- Di Monte, D., Sandy, M. S., Ekström, G., and Smith, M. T. 1986. Comparative studies on the mechanisms of paraquat and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP⁺) cytotoxicity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 137:303–309.
- Chiueh, e. C., Krishna, G., Tulsi, P., Obata, T., Lang, K., Huang, S-J., and Murphy, D. L. 1992. Intracranial microdialysis of salicylic acid to detect hydroxyl radical generation through dopamine autooxidation in the caudate nucleus: effects of MPP*. Free Rad. Biol. Med. 13:581–583.
- Coyle, J. T., and Puttfarcken, P. 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. Science 262:689–695.
- Vyas, I., Heikkila, R. E., and Nicklas, W. J. 1986. Studies on the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: inhibition of NAD-linked substrate oxidation by its metabolite, 1methyl-4-phenylpyridinium. J. Neurochem. 46:1501–1507.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 76:248–254.
- Hortelano, S., Genaro, A. M., and Boscá, L. 1993. Phorbol esters induce nitric oxide synthase and increase arginine influx in cultured peritoneal macrophages. FEBS Lett. 320:135–139.
- Ambrosio, S., Gerli, P., Perego, C., and Algeri, S. 1987. Different toxicity of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,5-tetrahydropyridine (MPTP) on the nigrostriatal and mesolimbic pathways. Eur. J. Pharmacol. 133:239–241.
- Meister, A. 1985. Glutamine synthetase from mammalian tissues. Pages 185-199, *in* Meister, A. (eds.) Methods in Enzymology 113. Acad. Press, New York.
- Farias, L. A., Smith, E. E., and Markov, A. K. 1990. Prevention of ischemic-hypoxic brain injury and death in rabbits with fructose-1,6-bisphosphate. Stroke 21:606–613.
- Tansey, F. A., Farooq, M., and Cammer, W. 1991. Glutamine synthetase in oligodendrocytes and astrocytes: new biochemical and immunocytochemical evidence. J. Neurochem. 56:266–272.
- Singer, T. P., Salach, J. I., and Crabtree, D. 1985. Reversible inhibition and mechanism-based irreversible inactivation of mono-

Ambrosio, Espino, Cutillas, and Bartrons

amine oxidases by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Biochem. Biophys. Res. Commun. 127:707–712.

- Dexter, D. T., Carter, C. J., Wells, F. R., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Lees, A., Jenner, P., and Marsden, C. D. 1989. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. J. Neurochem. 52:381–389.
- Rossetti, Z. L., Sotgiu, A., Sharp, D. E., Hadjiconstantinou, M., and Neff, N. H. 1988. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and free radicals in vitro. Biochem. Pharmacol. 37: 4573-4574.
- Rollema, H., de Vries, J. B., Damsma, G., Westerink, B. H. C., Kranenborg, G. L., Kuhr, W. G., and Horn, A. S. 1988. The use of in vivo brain dialysis of dopamine, acetylcholine, aminoacids and lactic acid in studies on the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Toxicology 49:503–511.
- 24. Symons, A. M., Dowling, E. J., and Parke, D. V. 1988. Lipid peroxidation, free radicals and experimental inflammation. Pages 987-990, *in* Simic M. G., Taylor, K. A., Ward, J. F., and von Sonntag, C. (eds.) Oxygen Radicals in Biology and Medicine. Plenum Press, New York.
- Santiago, M., Machado A., and Cano, J. 1994. Effect of 1-arginine/nitric oxide pathway on MPP⁺-induced cell injury in the striatum of rats. Br. J. Pharmacol. 111:837–842.
- Schülz, J. B., Matthews, R. T., Muqit, M. M. K., Browne, S. E., and Beal, M. F. 1995. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. J. Neurochem. 64:936–939.
- Bump, E. A., Pierce, S. M., Obcemea, C. H., Chin, L., and Coleman, N. 1988. Effect of -OH scavenging on the yield of radiation-induced DNA double-strand breaks in isolated nuclei. Pages 429-432, *in* Simic M. G., Taylor, K. A., Ward, J. F., and von Sonntag, C. (eds.) Oxygen Radicals in Biology and Medicine. Plenum Press, New York.
- Martinovits, G., Melamed, E., Cohen, O., Rosenthal, J., and Uzzan, A. 1986. Systemic administration of antioxidants does not protect mice against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP). Neurosci. Lett. 69: 192–197.
- Schor, N. F., 1988. Inactivation of mammalian brain glutamine synthetase by oxygen radicals. Brain Res. 456:17–21.
- Levine, R. L. 1983. Oxidative modification of glutamine synthetase. J. Biol. Chem. 258:11828–11833.
- Hollinden, G. E., Sanchez-Ramos, J. R., Sick, T. J., and Rosenthal, M. 1988. MPP-induced increases in extracellular potassium ion activity in striatal slices suggest that consequences of MPP* neurotoxicity are spread beyond dopaminergic terminals. Brain Res. 475:283–290.
- Hollinden, G. E., Sanchez-Ramos, J. R., Sick, T. J., and Rosenthal, M. 1989. MPP-induced pathophysiology demonstrates advantages of neurotoxicology studies in brain slices. J. Neurosci. Meth. 28:51–57.
- Ofori, S., Heikkila, R. E., and Nicklas, W. J. 1989. Attenuation by dopamine uptake blockers of the inhibitory effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and some of its analogs on NADH-linked metabolism in mouse neostriatal slices. J. Pharmacol. Expt. Ther. 251:258–265.

ANNEX 10



International

NEUROCHEMISTRY

7-Nitroindazole prevents dopamine depletion caused by low concentrations of MPP⁺ in rat striatal slices

Neurochem. Int. 33 (1998) 35-40

B. Cutillas,^{a,b} M. Espejo,^a S. Ambrosio^{a,*}

^a Unitat de Bioquímica, ^b Escola d'Infermeria, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Received 7 October 1997; accepted 27 December 1997

Abstract

A significant loss of dopamine was found in rat striatal slices incubated with 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) at a concentration of 2 μ M or higher. The addition of 7-nitroindazole, a specific inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (nNOS), prevented this effect on dopamine when the concentration of MPP⁺ was between 2–5 μ M, but not at higher concentrations. This protection was reproduced with other less specific NOS-inhibitors, such as nitro-arginine and nitro-arginine methylester. 7-nitroindazole did not protect against the dopamine depletion caused by the non-specific mitochondrial chain blocker rotenone. Neither MPP⁺ nor rotenone significantly increased the nitrite concentration in striatal slices, measured as an index of nitric oxide production. The basal production of nitric oxide may be enough to trigger the dopamine depletion at very low concentrations of MPP⁺, probably acting synergistically with cytosolic calcium increase. Higher concentrations of MPP⁺ are toxic by themselves without the mediation of nitric oxide. The inhibition of nNOS may protect against dopamine loss at early stages of a neurodegenerative process, and it could then be considered in the treatment or prevention of neurodegenerative human processes such as Parkinson's disease. (© 1998 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The mechanisms of neuronal loss involved in Parkinson's disease (PD) are still unknown. However, several lines of evidence suggest that oxidative stress and free radicals may participate in these mechanisms (Beal, 1996). Nitric oxide (NO) is suspected of being one of the main sources of toxic free radicals in the brain. NO is synthesized from L-arginine by nitric oxide synthase (NOS). An inducible form of NOS (iNOS) is expressed in the brain mainly by glial cells, whereas a constitutive form is widely expressed by neurons (nNOS), including nigral and striatal neurons (Snyder, 1992; Garthwaite, 1995). Some data suggest an excessive production of NO in PD, which may be neurotoxic for dopaminergic neurons (Hunot et al., 1996).

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) has been extensively used to produce mammalian models of PD (Tipton and Singer, 1993). Biochemical changes caused by MPTP consist, in mice, primates and other species, of a marked reduction in the levels of striatal dopamine. Mice deficient in nNOS are resistant to MPTP neurotoxicity (Przedborski et al., 1996). The inhibition of nNOS by 7-nitroindazole (7-NI), a relatively selective inhibitor of this isozyme, protects mice (Schulz et al., 1995; Przedborski et al., 1996) and baboons (Hantraye et al., 1996) against MPTP-induced dopamine depletion and nigral neuronal loss.

In the brain, MPTP is converted by the action of monoamine oxidase B, to the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺), which is the effective neurotoxin. MPP⁺ is taken up by dopaminergic endings and inside the neuron, it acts as a potent inhibitor of mitochondrial oxidation at the complex I level of the respiratory chain. When MPP⁺ is directly injected or infused into the striatum at concentrations above 1 mM, it causes a massive depletion of dopamine (Espino et al., 1995a) and an increase in hydroxyl radical generation (Chiuch et al., 1992), both of which can be detected by microdialysis. The role of NO in the production of these free radicals and thus in MPP⁺ toxicity, remains to be established.

Although the inhibition of NOS has been reported to reduce the radical formation induced by 5 mM intrastriatal-infused MPP⁺ in vivo (Smith et al., 1994), we previously reported that treatment of rats with nitroarginine, a non-selective inhibitor of NOS, did not prevent the metabolic damage (Espino et al., 1994) nor the dopamine depletion in striatal slice incubations (Ambrosio et al., 1996) caused by concentrations of 5–10 mM

^{*}To whom all correspondence should be addressed: Unitat de Bioquímica, Campus de Bellvitge, c/. Feixa Llarga s/n 08907-Hospitalet del Llobregat, Barcelona, Spain. Fax: 343-4024213.

^{0197-0186/98 \$19.00 © 1998} Elsevier Science Ltd. All rights reserved PII: \$0197-0186(98)00001-1

B. Cutillas et al./Neurochem. Int. 33 (1998) 35-40

MPP⁺. Here we studied the effects of 7-NI in striatal slice incubations with different concentrations of MPP⁺ and we found a protective role for 7-NI against concentrations of MPP⁺ below 5 μ M.

2. Experimental procedures

2.1. Materials

MPP⁺ iodide and 7-nitroindazole (7-NI) were purchased from R.B.I. (Wayland, MA, U.S.A.), N ω -nitro-arginine (NO-Arg), N ω -arginine methylester (NAME), dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium salicylate, 2,3- and 2,5-dihydroxybenzoic acids (2,3- and 2,5-DHB) and rotenone were purchased from Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, Spain) and nitrate reductase was from *Aspergillus sp.* (Boheringer, Mannheim, Germany). Incubation media were prepared from products of the highest purity available.

2.2. Animals

Male Sprague–Dawley rats, weighing 250–350 g, were used for all the experiments. The care and use of these animals were in accordance with the policy on the use of animals in neuroscience research published by the Society for Neuroscience. The protocols were approved by a review committee of the University of Barcelona.

2.3. Preparation of striatal slices

The rats were killed by decapitation. The right and left striata were quickly dissected and sliced into 0.3 mm sections with a McIlwain tissue chopper (Brinkmann, Wesbury, NY, U.S.A.). The slices from both striata were incubated at 37° C in 1.5 ml of Krebs-Ringer (K-R) bicarbonate buffer, pH 7.2, in a shaking water bath under an atmosphere of $95\% O_2/5\% CO_2$. The incubation medium consisted of 119 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.7 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 23.8 mM NaHCO₃, 5.5 mM glucose, and 25 mM MOPS (Vyas et al., 1986).

7-Nitroindazole, nitro-arginine and nitro-arginine methylester, the nitric oxide synthase inhibitors, were dissolved in ethanol at 16 mM concentration. 15 μ l of each was added to 1.5 ml of slice incubations, so that the final concentration was 160 μ M in 1% of ethanol. Samples without NOS-inhibitors also contain 1% of ethanol. The slices were incubated at 37°C for 10 min before adding MPP⁺ or rotenone. 10 μ l of MPP⁺, dissolved in K-R buffer, was added to a final concentration between 1–25 μ M. Control incubations received 10 μ l of medium. In other experiments, rotenone, dissolved in ethanol, was added to the incubation to give a final concentration between 0.05–2 μ M and 1% of ethanol.

The incubations were carried out for 3 h. When the incubations were completed the slices and the incubation medium were transferred to microfuge tubes and the slices were washed twice in K-R solution, decanted, homogenized by sonication and centrifuged for 10 min. The supernatants were used for analysis.

2.4. Analytical procedures

Dopamine (DA) and its main metabolite, dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) were determined in striatal tissue, assuming that the effects of MPP⁺ could be measured by the quantification of the DA remaining in the tissue. The slices were homogenized in 0.5 ml of 0.1 N HClO₄. The analyses were carried out as described elsewhere (Espino et al., 1995b). DA and DOPAC were separated by HPLC (LKB-Pharmacia, Broma, Sweden), using a nucleosil-C18 (5 μ m) reverse phase column (Tracer, Teknokroma, Spain) and an ESA Coulochem II detector (Bedford, MA, U.S.A.).

2,3- and 2,5-dihydroxybenzoic acids (DHB) were determined in striatal slices incubated in the K-R medium containing 5 mM of sodium salicylate. Samples were prepared as described above and 2,3- and 2,5-DHB were used as an index of hydroxyl radical generation. They were determined by HPLC and electrochemical detection as described by Obata and Yamanaka (1995).

Nitric oxide was determined by the accumulation of nitrite in the presence of nitrate reductase (Schmidt, 1992). The activity of nitrate reductase was checked using a solution of 50 μ M NaNO₃ in K-R.

The protein content was measured by the Bradford method after solubilization of the pellets in 1N NaOH.

3. Results

Striatal slices incubated with different concentrations of MPP⁺ for 3 h showed a dose-dependent decrease in DA and DOPAC content. The decrease was significant for MPP⁺-concentrations of 2 μ M or higher. The addition to the medium of 150 μ M 7-nitroindazole (7-NI) significantly prevented the dopamine depletion caused by MPP⁺ at concentrations between 2–5 μ M, but not at higher concentrations (Fig. 1). The decrease in DOPAC content was not prevented by 7-NI (Fig. 2).

The prevention of DA, but not DOPAC, depletion, caused by 5 μ M MPP⁺ was also reproduced by less-specific inhibitors of NOS, such as nitro-arginine (NO-Arg) and nitro-arginine methylester (NAME), as indicated in Table 1. The addition of 1% ethanol to the incubation medium did not affect the dopamine content, but slightly reduced the DOPAC production. Neither DMSO (0.5%), used as a radical scavenger, nor sodium salicylate (5 mM), altered the effect of 5 μ M MPP⁺ (Table 1).



Fig. 1. Dose-dependent dopamine loss in rat striatal slices incubated with different concentrations of MPP⁺, in the absence (\blacksquare) or in the presence (\blacksquare) of 0.16 mM 7-nitroindazole. Results are the mean of 4 samples and three experiments \pm SEM. * P < 0.05 Mann–Whitney U test compared with their relative controls with or without 7-NI.



B. Cutillas et al./Neurochem. Int. 33 (1998) 35-40

Table I

Effect of different compounds on dopamine and DOPAC concentration (pmol/mg prot \pm SEM) in striatal slices incubated in a Krebs-Ringer solution (control) with (+) and without (-) 5 μ M MPP⁺

| | Dopamine | | DOPAC | |
|---------------------|----------------|-------------------|---------------|-----------------|
| | (-) | (+) | (-) | (+) |
| Control (6) | 920±106 | 495 + 47** | 123 ± 22 | 32±2** |
| Ethanol 1% (8) | 1123 ± 157 | 665±78** | 71±8# | $35 \pm 1^{*}$ |
| 7-NI 0.16 mM (8) | 1201 ± 154 | 919 ± 98 | $61 \pm 8 \#$ | $28 \pm 5^{*}$ |
| NO-Arg 0.16 mM (6) | 1175 ± 72 | 1123 ± 210 | 99 ± 7 | $40 \pm 14^{*}$ |
| NAME 0.16 mM (5) | 1355 ± 290 | 1126 ± 210 | $74 \pm 11 #$ | $27 \pm 3^*$ |
| DMSO 0.5% (6) | 1082 ± 165 | $481 \pm 25^{**}$ | 123 ± 13 | 38±7** |
| Salicylate 5 mM (4) | 920 ± 106 | $494 \pm 47*$ | 122 ± 22 | $32 \pm 2^{**}$ |

* P < 0.05, ** P < 0.01 compared with (-) values; #P < 0.05 compared with control values, with Mann–Whitney U test.

Since one of the main effects of MPP⁺ is to inhibit the mitochondrial respiratory chain, we used rotenone, another well known inhibitor of complex I, to reproduce the effects on the dopamine depletion. A similar depletion of DA caused by $5 \,\mu M \, MPP^-$ was achieved with 50 nM of rotenone, but no protection was provided by 7-NI (Fig. 3). No increase in free radical production by $5 \,\mu M$ MPP⁺ was detected. The production of 2,3-DHB and 2,5-DHB oxidated derivatives of salicylic acid, did not increase in the presence of MPP⁺, nor was it decreased



Fig. 2. Dose-dependent dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) loss in rat striatal slices incubated with different concentrations of MPP⁺, in the absence (**II**) or in the presence (**Z**) of 0.16 mM 7-nitroindazole. Results are the mean of 4 samples and three experiments \pm SEM. * P < 0.05 Mann–Whitney U test compared with their relative controls with or without 7-NI.

Fig. 3. Dose-dependent dopamine loss in rat striatal slices incubated with different concentrations of rotenone, in the absence (\blacksquare) or in the presence (\blacksquare) of 0.16 mM 7-nitroindazole. Results are the mean of 4 samples and three experiments \pm SEM. * P < 0.05 Mann–Whitney U test compared with their relative controls with or without 7-NI.

B. Cutillas et al./Neurochem. Int. 33 (1998) 35-40

by 7-NI (Table 2). The concentration of nitrite, used as an index of NO production, was determined to be 1.21 ± 0.15 nmol/mg prot in control samples (1% ethanol) and this was not increased by MPP⁺ (0.92±0.15 nmol/mg prot) or rotenone (1.10 ± 0.14 nmol/mg prot).

4. Discussion

The inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7nitroindazole (7-NI) has been reported to protect mice (Schulz et al., 1995; Przedborski et al., 1996) and baboons (Hantraye et al., 1996) against the effects of MPTP. In contrast, Mackenzie et al. (1997) failed to obtain any benefit when they treated MPTP-lesioned marmosets with another NOS inhibitor, nitro-arginine methylester (NAME).

7-NI by itself does not seem to alter the content or the metabolism of dopamine, nor the conversion of MPTP to its toxic metabolite MPP⁺ (Przedborski et al., 1996). Although Castagnoli et al. (1997) have recently speculated on a role of 7-NI in inhibition of monoamine oxidase B that could contribute to its protective effects against MPTP, 7-NI did not induce any additional reduction in dopamine metabolism to that caused by the ethanol used as vehicle for this compound.

We reported previously (Ambrosio et al., 1996) that nitro-arginine was unable to protect striatal slices against the effect of 5 mM MPP+. We have found now that 0.16 mM 7-NI can protect against the depletion of dopamine caused in rat striatal slices by concentrations of MPP+ between 2 and 5 μ M, but not higher. An easy calculation from the results reported by Przedborski et al. (1996) after intraperitoneal treatment of mice with MPTP indicates that the concentration of MPP+ found in the brain is about 2 µM. Our results therefore suggest why 7-NI treatment may protect mice against MPTP. The effect of higher amounts of MPP+ may not be prevented by inhibitors of NOS and thus, depending on the treatment and species, NOS inhibition was ineffective to protect against MPP+ (Ambrosio et al., 1996) or MPTP treatment (Mackenzie et al., 1997).

| - | | | | - |
|-----|-----|---|-------|------|
| - 1 | -11 | n | a | _ |
| | a | | • | - 64 |
| | | | | |

Levels of 2,3- and 2,5-dihydroxybenzoic acid (pmol/mg prot \pm SEM. after incubation of striatal slices with 5 mM sodium salicylate

| 2,3-DHB | 2,5-DHB |
|---------------|---|
| n.d. | n.d. |
| 7.2 ± 0.2 | 3.3 ± 0.5 |
| 5.8 ± 1.4 | 4.7 ± 0.4 |
| 5.1 ± 2.2 | 4.0 ± 1.0 |
| 7.3 ± 2.0 | 6.7 ± 2.8 |
| | 2,3-DHB n.d. 7.2±0.2 5.8±1.4 5.1±2.2 7.3±2.0 |

Values are the mean \pm SEM of four samples and two experiments. (n.d. = not detected).

The lack of prevention of DOPAC reduction at all MPP⁺ concentrations indicates that 7-NI has no effect on monoamine oxidase activity (MAO). It could be also considered as evidence that 7-NI does not alter the transport of MPP⁺ into the cell: MPP⁺ enters the dopamine terminal and inhibits MAO activity, as described previously (Singer et al., 1985).

The effect of 7-NI was reproduced by other less-specific inhibitors of NOS. This may be considered a confirmation that the protective effect is mediated by NOS inhibition. NO is synthesized after glutamate activation of NMDA-receptors (Hanbauer et al., 1992). The glutamate release and the NMDA activation have often been implicated in the mechanisms of MPP+ toxicity (Turski et al., 1991). However, NO does not seem to be involved in glutamate neurotoxicity in brain slices (Garthwaite et al., 1994). We were not able to detect a significant increase in NO production attributable to 5 μ M MPP⁺ or 5 μ M rotenone, which is consistent with results we had previously reported (Ambrosio et al., 1996). This restricts the role of NO in MPP+ toxicity to the constitutive basal NO production. NO may react with other chemical radicals, especially with superoxide anion, leading to the formation of peroxynitrites, thus amplifying the radicalmediated toxic effects (Lipton et al., 1993). Inhibitors of NOS have been reported to reduce the MPP+-induced 2,3-DHB formation in salicylate dialysates of rat striata (Smith et al., 1994). We previously reported that MPP+ caused a significant increase in radical production, detected by malondialdehyde (MDA) production, only at a concentration higher than 1 mM (Ambrosio et al., 1996). We used here the apparently more sensitive procedure of salicylate oxidated products to detect radical production, but we did not find any increase in either 2,3-DHB or 2,5-DHB attributable to 5 μ M MPP⁺, which is consistent with our previous results with MDA. It seems then that, either MPP+ at low concentration does not cause a significant increase in free oxygen radicals or, as maintained by Montgomery et al. (1995), the conversion of salicylate to DHB by O₂ in oxygenated incubations is higher than the oxidation by free oxygen radicals. Dimethyl sulfoxide (DMSO), which traps free oxygen radicals and reduces the effects of neurotoxins that act by this mechanism, does not prevent the dopamine release caused by 5 μ M MPP⁺, confirming that the increase in radical production may be negligible at this concentration.

Other authors (Santiago et al., 1994; Lancelot et al., 1995) maintain that NO production in the striatum may modulate the basal oxygen radical production, mediated mainly by NMDA, and thus may protect the striatal tissue. However, in rat brain slices, NO does not seem to have any protective effect (Garthwaite and Garthwaite, 1994).

It has recently been demonstrated by Parker et al. (1996) that the exposure of mitochondria to MPP⁺ or rotenone and NO simultaneously causes a synergistic effect on mitochondrial depolarisation and calcium efflux, leading to dopamine release. This would explain why the toxicity of MPP⁺, at concentrations that are too low to dramatically damage mitochondria, may be prevented by inhibition of nNOS. Although MPP⁺ and rotenone give similar results in isolated mitochondria, that is not the case in incubations of striatal slices, where the toxicity of rotenone, blocking all mitochondrial activity, cannot be prevented by 7-NI. Clearly, rotenone causes greater non-specific tissue damage than MPP⁺ although their effects on dopamine depletion are similar.

NO-donors cause release of dopamine from rat striatum (Stewart et al., 1996), inhibit the uptake of dopamine by striatal synaptosomes (Lonart and Johnson, 1994) and increase MPP⁺ toxicity (Ambrosio et al., 1996). In addition, inhibitors of NOS reduce the amphetamine-induced dopamine release (Inoue et al., 1996) and increase extracellular striatal GABA (Semba et al., 1995). All these results suggest that endogenous NO may contribute to the regulation of dopaminergic systems.

Although NOS activity does not appear to be present in tyrosine hydroxylase-containing neurons (Ohta et al., 1993), the high diffusion of NO and its action on mitochondrial function (Moncada and Higgs, 1993) may represent a key factor in the progress of neurodegenerative processes in which mitochondrial activity is affected, such as Parkinson's disease (Dawson et al., 1992). The use of inhibitors of NOS, as has been proposed by several authors (Youdim and Lavie, 1994; Snyder, 1996), should be considered in the search for new treatments for Parkinson's disease.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Spanish government, FIS (95/0188) and SGR (95/427). We are indebted to the technical assistance of M. Vallés and the language assistance of R. Rycroft. We also thank all the members of the Biochemistry Unit of our Campus. M. Espejo is recipient of a fellowship from Fundació August Pi i Sunyer.

References

- Ambrosio, S., Espino, A., Cutillas, B., Bartrons, R., 1996. MPP⁺ toxicity in rat striatal slices: relationship between non-selective effects and free radical production. Neurochem Res 21, 73–78.
- Beal, M.F., 1996. Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration. Curr Op Neurobiol 6, 661–666.
- Castagnoli, K., Palmer, S., Anderson, A., Bueters, T., Castagnoli N., 1997. The neuronal nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole

also inhibits the monoamine oxidase B catalyzed oxidation of 1methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Chem Res Toxicol 10, 364–368.

- Chiueh, C.C., Krishna, G., Tulsi, P., Obata, T., Lang, K., Huang, S.-J., Murphy, D.L., 1992. Intracranial microdialysis of salicylic acid to detect hydroxyl radical generation through dopamine autooxidation in the caudate nucleus: effects of MPP⁺. Free Rad Biol Med 13, 581–583.
- Dawson, T.M., Dawson, V.L., Snyder, S.H., 1992. A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. Ann Neurol 32, 297–311.
- Espino, A., Tortosa, A., Bendahan, G., Bartrons, R., Calopa, M., Ferrer, I., Ambrosio, S., 1994. Stereotaxic administration of 1methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) decreases striatal fructose 2,6-bisphosphate in rats. J Neurochem 62, 1913–1920.
- Espino, A., Cutillas, B., Tortosa, A., Ferrer, I., Bartrons, R., Ambrosio, S., 1995a. Chronic effects of single intrastriatal injections of 6hydroxydopamine or 1-methyl-4-phenylpyridinium studied by microdialysis in freely moving rats. Brain Res 695, 151–157.
- Espino, A., Llorens, J., Calopa, M., Bartrons, R., Farre, E.R., Ambrosio, S., 1995b. Cerebrospinal dopamine metabolites in rats after intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine or 1-methyl-4phenylpyridinium ion. Brain Res 669, 19–25.
- Garthwaite, J., 1995. Neural nitric oxide signalling. Trends Neurosci 18, 51–52.
- Garthwaite, G., Garthwaite, J., 1994. Nitric oxide does not mediate acute glutamate neurotoxicity, nor is it neuroprotective, in rat brain slices. Neuropharmacology 33, 1431–1438.
- Hanbauer, I., Wink, D., Osawa, Y., Edelman, G.M., Gally, J.A., 1992. Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of [³H]-dopamine from striatal slices. NeuroReport 3, 409–412.
- Hunot, S., Boissière, F., Faucheux, B., Brugg, B., Mouatt-Prigent, A., Agid, Y., Hirsch, E.C., 1996. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. Neuroscience 72, 355-363.
- Hantraye, P., Brouillet, E., Ferrante, R., Palfi, S., Dolan, R., Matthews, R.T., Beal, M.F., 1996. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons. Nature Med 2, 1017–1021.
- Inoue, H., Arai, I., Shibata, S., Watanabe, S., 1996. NG-nitro-L-arginine methyl ester attenuates the maintenance and expression of metamphetamine-induced behavioral sensitization and enhancement of striata dopamine release. J Pharmacol Exp Ther 277, 1424– 1430.
- Lancelot, E., Callebert, J., Lerouet, D, Revaud, M.L., Boulu, R.G., Plotkine, M., 1995. Role of the L-arginine-nitric oxide pathway in the basal hydroxyl radical production in the striatum of awake rats as measured by brain microdialysis. Neurosci Lett 202, 21–24.
- Lipton, S.A., Choi, Y-B., Pan, Z-H., Lei, S.Z., Chen, H-S.V., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J., Stamler, J.S., 1993. A redox-based mechanism for the neuroprotective effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. Nature 364, 626–631.
- Lonart, G., Johnson, K.M., 1994. Inhibitory effects of nitric oxide on the uptake of [³H]dopamine and [³H]glutamate by striatal synaptosomes. J Neurochem 63, 2108-2117.
- Mackenzie, G.M., Jackson, M.J., Jenner, P., Marsden, C.D., 1997. Nitric oxide synthase inhibition and MPTP induced toxicity in the common marmoset. Synapse 26, 301–316.
- Moncada, S., Higgs, A., 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway (1993). The New Engl J Med 329, 2002–2012.
- Montgomery, J., Ste-Marie, L., Boismenu, D., Vachon, L., 1995. Hydroxylation of aromatic compounds as indices of hydroxyl radical production. Free Rad Biol Med 19, 927–933.
- Obata, T., Yamanaka, Y., 1995. Intracranial microdialysis of salicylic acid to detect hydroxyl radical generation by monoamine oxidase inhibitor in the rat. Neurosci Lett 188, 13–16.
- Ohta, A., Takagi, H., Matsui, T., Hamai, Y., Iida, S., Esumi, H., 1993. Localization of nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in

B. Cutillas et al./Neurochem. Int. 33 (1998) 35-40

the solitary nucleus and ventrolateral medulla oblongata of the rat: their relation to catecholaminergic neurons. Neurosci Lett 158, 33– 35.

- Packer, M.A., Miesel, R., Murphy, M.P., 1996. Exposure to the parkinsonian neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) nitric oxide simultaneously causes cyclosporin A-sensitive mitochondrial efflux and depolarisation. Biochem Pharmacol 51, 267–273.
- Przedborki, S., Jackson-Lewis, V., Yokoyama, R., Shibata, T., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 1996. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. Proc Natl Acad Sci USA 93, 4565– 4571.
- Santiago, M., Machado, A., Cano, J., 1994. Effect of L-arginine/nitric oxide pathway on MPP⁺-induced cell injury in the striatum of rats. Br J Pharmacol 11, 837–842.
- Schmidt, H.H.W., 1992. Determination of nitric oxide via measurement of nitrite and nitrate in culture media, Biochemica 2, 30.
- Schulz, J.B., Matthews, R.T., Muqit, M.M.K., Browne, S.E., Beal, M.F., 1995. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. J Neurochem 64, 936–939.
- Semba, J., Sakai, M., Miyoshi, R., Kito, S., 1995. NG-monomethyl-Larginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, increases extracellular GABA in the striatum of freely moving rat. NeuroReport 6, 1298– 1300.

Singer, T.P., Salach, J.I., Crabtree, D., 1985. Reversible inhibition and

mechanism-based irreversible inactivation of monoamine oxidases by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Biochem Biophys Res Commun 127, 707–712.

- Smith, T.S., Swerdlow, R.H., Parker, W.D., Bennett, P., 1994. Reduction of MPP⁺-induced hydroxyl radical formation and nigrostriatal MPTP toxicity by inhibiting nitric oxide synthase. NeuroReport 5, 2598–2600.
- Snyder, S.H., 1992. Nitric oxide and neurons. Curr Op Neurobiol 2, 323-327.
- Snyder, S.H., 1996. No NO prevents parkinsonism. Nature Med 2, 965–966.
- Stewart, T.L., Michel, A.D., Black, M.D., Humphrey, P.P., 1996. Evidence that nitric oxide causes calcium-independent release of [³H]dopamine from rat striatum in vitro. J Neurochem 66, 131–137.
- Tipton, K.F., Singer, T.P., 1993. Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. J Neurochem 61, 1191–1206.
- Turski, L., Bressler, K., Löschmann, P.A., Wachtel, H., 1991. Protection of substantia nigra from MPP⁺ toxicity by NMDA antagonists. Nature 349, 414–418.
- Vyas, I., Heikkila, R.E., Nicklas, W.J., 1986. Studies on the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: inhibition of NAD-linked substrate oxidation by its metabolite, 1methyl-4-phenylpyridinium. J Neurochem 46, 1501–1507.
- Youdim, M.B.H., Lavie, L., 1994. Selective MAO-A and MAO-B inhibitors, radical scavengers and nitric oxide synthase inhibitors in Parkinson's disease. Life Sci 55, 2077–2082.

ANNEX 11

Biochemical and Biophysical Research Communications 268, 916–920 (2000) doi:10.1006/bbrc.2000.2232, available online at http://www.idealibrary.com on

MPP⁺-Induced Mitochondrial Dysfunction Is Potentiated by Dopamine

Jordi Boada,* Blanca Cutillas,† Teresa Roig,* Jordi Bermúdez,* and Santiago Ambrosio†¹ *Unitat de Biofísica and †Unitat de Bioquímica, Departament de Ciències Fisiològiques II, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Received January 26, 2000

MPP⁺, the major metabolite of the Parkinsonisminducing compound MPTP, responsible for the destruction of the nigrostriatal pathway in primates and rodents, has been assayed in isolated rat liver mitochondria in the presence of physiological concentrations of dopamine or analogous concentrations of melanin-dopamine. 5 µM MPP⁺ in the presence of 70 μM dopamine or melanin-dopamine, but not alone, decreased the heat production and oxygen consumption of a mitochondrial suspension activated with succinate and ADP. Both dopamine and oxidized dopamine plus MPP⁺ also decreased the mitochondrial reductive power measured with MTT. Mitochondrial swelling was observed, associated with an increase in membrane mitochondrial potential, as a synergistic effect between low concentrations of MPP⁺ and dopamine. It is suggested that cytosolic dopamine, by itself or via its autooxidation products, may play a relevant role in the mitochondrial toxicity of MPP⁺. A failure in the regulation of the storage/release of dopamine could aggravate a mitochondrial damage and trigger the neurodegenerative process underlying MPTP toxicity and Parkinson's disease. © 2000 Academic Press

Key Words: mitochondria; MPP⁺; MPTP; dopamine; Parkinson's disease.

MPP⁺, the active metabolite of the Parkinsonisminducing compound MPTP, is produced by the action of monoamine oxidase B and accumulated by dopaminergic neurons through the dopamine-reuptake system (1). Inside the neurons MPP⁺ can be accumulated in catecholaminergic vesicles or in mitochondria by a mechanism depending on the membrane potential (2). Inside the mitochondria MPP⁺ reduces the mitochondrial respiration rate and the NADH-dehydrogenase activity (NADH-DH) of the respiratory chain complex I (3). This effect is more evident in intact mitochondria ($IC_{50} = 90 \ \mu$ M) than in submitochondrial particles ($IC_{50} = 2-4 \ m$ M) (3) and it is enhanced by the tetraphenylboron anion (4), indicating that MPP⁺ accumulates in mitochondria and acts at hydrophobic sites. MPP⁺ seems to inhibit complex I, both in state 4 (without ADP) and in state 3 (with ADP) of respiration, acting at the same site of rotenone, between NADH-DH and coenzyme Q (5), without affecting complex II activity (6). However MPP⁺ and rotenone have different affinities for NADH-DH, MPP⁺ requiring two orders more concentration than rotenone (7) for a similar but reversible effect.

The inhibition of the mitochondrial chain is observed only when mitochondria are activated in complex I (i.e., with pyruvate/malate) and it is reflected in a decrease in oxygen consumption and an increase in cytoplasmic lactate, both of which can be reverted by succinate (8). This is currently the main explanation of how MPTP causes degeneration of dopaminergic neurons.

However, MPP+ depletes dopamine (DA) from striatal tissue at a much lower range $(2-5 \mu M)$ than that required for complex I inhibition (9). Dopamine itself, or via its auto-oxidation products, has been implicated in radical production (10), neurotoxic processes (11) and apoptotic neurodegeneration (12), and thus in the pathogenesis of Parkinson's disease. Here we tested the effect of 5 μ M MPP⁺ (the concentration found in the brains of animals treated with MPTP [13]) on different parameters of mitochondrial function in the presence of 70 µM DA (maximal striatal concentration assuming a dopamine striatal content of about 10 μ g/g tissue) or DA left to oxidize spontaneously. We assumed that these concentrations of MPP+ and dopamine, either alone or in combination, do not affect complex I activity, and throughout the study we used mitochondria energized with succinate, in order to assess an overall mitochondrial dysfunction not depending on complex I.



¹ To whom correspondence should be addressed at Unitat de Bioquímica, Departament de Ciències Fisiològiques II, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, c/. Feixa Llarga s/n, Hospitalet del Llobregat 08907 (Barcelona), Spain. Fax: 3493-4024268. E-mail: ambrosio@bellvitge.bvg.ub.es.

Vol. 268, No. 3, 2000

MATERIALS AND METHODS

Rat liver mitochondria were prepared from Sprague-Dawley rats (14). Mitochondria were incubated at 37°C with 5 mM succinate and 0.8 mM ADP. Mitochondrial heat production was measured by calorimetry as described elsewhere (15). The conversion of dopamine to oxidized-dopamine (melanin-dopamine or DAox) was monitored spectrophotometrically at 450 nm. 10 mM dopamine was kept overnight at room temperature and at physiological pH and was used when $\Delta A_{450} \simeq 0.600$ (16). The NADH-DH activity was measured spectrophotometrically by the disappearance of NADH at 340 nm as described (17). Glutamate dehydrogenase was measured by the disappearance of NADH after incubation with 2-oxoglutarate. The rate of oxygen consumption was measured with a Clark-type oxygen electrode (14). The reduction of 3-(4,5-dimethylthiozol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide (MTT) dye was used to measure the electron transport in isolated mitochondria (18). It has been reported that dopaminergic neurons could have very low or zero monoamine oxidase (MAO) activity (19), whereas this activity is higher in liver mitochondria. In most of the experiments 200 µM tranylcypromine (TCP) was added as a nonselective MAO inhibitor in order to block dopamine metabolism, to prevent mitochondria from the H2O2 production due to MAO, and to restrict the results to the effects of DA or spontaneously oxidized DA (17). Membrane potential generated by succinate respiration and the kinetic behavior after addition of 5 µM MPP⁺ and/or 70 µM dopamine was monitored by spectrophotometric recording of the absorbance changes at 660 nm of the membranesensitive probe diS-C2-(5) as in (20). Mitochondrial swelling was determined by dynamic light scattering in a photon correlation spectrometer using the exponential sampling method for data analysis (21). Protein content was determined in mitochondria homogenates using the Bradford reagent. Depending on the assay, the amount of mitochondria used was that corresponding to 0.2-1.0 mg of protein/ml.



FIG. 1. Heat dissipation of suspensions of liver mitochondria (about 300 µg protein/ml) incubated in a buffer containing 220 mM sucrose, 3 mM HEPES, (pH 7.3), 20 mM MgCl₂, 2 mM KH₂PO₄, 0.5 mM EGTA, 1 mM ATP, 20 mM glucose, 20 IU/liter hexokinase. The steady state was achieved with 5 mM K⁺ succinate. Heat dissipation was measured after the addition of 30 µl of medium (control), dopamine (final concentration 70 µM), and MPP⁺ (final concentration 5 µM). The measures were performed for 60 min. Results are the mean of six (controls) and four (MPP⁺ and DA) different experiments. **P < 0.01 compared with control group (Mann–Whitney U test).

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS



FIG. 2. NADH dehydrogenase activity in the presence of 5 μ M MPP⁺ and/or 70 μ M dopamine or oxidized dopamine. All the measurements were done in the presence of the MAO-inhibitor tranyl-cypromine. The last bar indicates the inhibition in the presence of 1 mM MPP⁺. Data are the mean ± SEM for 12 different mitochondria preparations. ***P < 0.001 compared with controls (Mann–Whitney U test).

RESULTS

MPP⁺ has been described to have similar effects on inhibition of brain and liver mitochondrial oxidation of NAD-linked substrates (22). We confirmed that 5 μ M MPP⁺ has no effect on oxygen consumption in brain or liver mitochondria maintained with piruvate, whereas 1 mM MPP+ reduced oxygen consumption more than 50% in both cases (not shown). Heat production is a parameter for the evaluation of the whole mitochondrial function in the absence of uncoupling agents. A stable response was obtained for more than 60 min when mitochondria were incubated with 5 mM succinate and 1 mM ATP + 20 IU/liter hexokinase (15). Figure 1 shows a significant decrease in heat dissipation when mitochondria were incubated simultaneously with 5 μ M MPP⁺ and 70 μ M DA, but not with each compound alone. The viability of mitochondria during the assay was assessed by measuring the glutamate dehydrogenase activity in the supernatants $(3.9 \pm 0.3 \,\mu$ mol/min/ml in controls), showing no significant differences between the different groups.

NADH-DH activity was not affected by a low concentration of MPP⁺ (5 μ M), DA (70 μ M) or the combination of both. A decrease in NADH-DH of nearly 50% was detected at 1 mM MPP⁺ (Figure 2). However, 5 μ M MPP⁺ + 70 μ M DAox significantly decreased the oxygen consumption of mitochondria started with succinate and ADP. Neither DA nor DAox alone affected the





FIG. 3. The oxygen consumption was measured in a mitochondria suspension (about 200 μ g protein/ml) maintained in a Clark type cell and activated with 5 mM K⁺ succinate and 0.8 mM ADP. DA and MPP⁺ were sequentially added at 90% of oxygen concentration saturation value to a final concentration respectively of 70 μ M and 5 μ M. The measurements were performed for 20 min. The results are the mean of three different experiments. *P < 0.05 compared with controls (Mann–Whitney U test).

oxygen consumption at the concentrations used. As previously described, O2 consumption may be significantly increased by non-enzymatic DA oxidation only at DA concentration higher than 1 mM (23). TCP slightly decreased oxygen consumption by 9%, indicating a role for MAO activity in the basal mitochondrial oxygen consumption. Oxygen consumption decreased in the presence of MPP+ + DAox from 67 (controls) to 45 nmol O₂/min/mg protein (Figure 3). The reduction of MTT after 45 min of mitochondrial incubation showed also a significant decrease in the presence of DA or DAox and MPP⁺ (Figure 4). Malondialdehyde accumulation, measured in the same conditions as MTT, was not modified by either MPP+ or DA alone or in combination (not shown), and a significant increase was detected only at 1 mM MPP+, as already described (24).

The addition of 5 μ M MPP⁺ to a mitochondrial suspension containing DA or DAox caused a significant swelling of the particles (Figure 5), which was not prevented by cyclosporin A. Moreover, the mitochondrial membrane potential was slightly but significantly increased in the presence of either 70 μ M DA or DAox plus 5 μ M MPP⁺ (Figure 6).

DISCUSSION

The possible role of DA in triggering neurodegenerative processes has been widely suggested. The oxida-

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS

tion of DA leads to the formation of insoluble melaninlike polymers in a nonenzymatic autocatalyzed mechanism (23). DA directly injected into the rat striatum causes significant pre- and post-synaptic lesions (25). We did not find any effect of 70 µM DA on NADH-DH activity, in agreement with other authors (26) who reported very little effect on either NADH-DH activity or mitochondrial respiratory chain only at concentrations of DA as high as 10 mM, and in contrast with previous results describing an effect for 40-80 μ M DA as NADH-DH inhibitor in intact mitochondria (17). However, DA may become toxic in the presence of a mitochondrial chain inhibitor like 3-nitropropionic acid or malonate, starting a mechanism that leads to apoptosis in striatal neurons (11). DA is also reported to induce apoptosis in human neuroblastoma cells (12) and in PC12 cells (16). Many injuries to the brain result in the uncontrolled release of neurotransmitters, including DA. DA is quickly taken up, metabolized or auto-oxidized in the presence of O2, so that, DA, its metabolites or oxidative products can accumulate inside surviving cells. The immediate effect of MPP⁺, assessed by incubation of striatal slices (24) or by striatal microdialysis in vivo (27), is a dramatic release of dopamine that can rise to about 70 μ M. Higher concentrations of DA (250 µM) may induce intracellular calcium increase and DNA-laddering in cultured fore-



FIG. 4. Mitochondrial reductive power in the presence of 5 μ M MPP⁺ and/or 70 μ M dopamine or oxidized dopamine. All the measurements were made in the presence of the MAO-inhibitor tranyl-cypromine. An amount of mitochondria corresponding to 1.0 mg of protein was incubated at 37°C for 45 min. An aliquot of each sample was further incubated at 25°C for 15 min with MTT (0.5 mg/ml) and the reaction was stopped with an equal volume of isopropanol/1 M HCl (24:1). Reduced-MTT was measured colorimetrically at 550 nm. The results are the mean ± SEM of 4 separate experiments. *P < 0.05 compared with controls (Mann–Whitney U test).

Vol. 268, No. 3, 2000

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS



FIG. 5. Mitochondrial swelling was assessed by photon correlation spectroscopy. The rates of mitochondrial swelling are expressed as percentage respect to the values before starting with 5 mM succinate + 0.8 mM ADP (size corresponding to 100% = 643 ± 3 nm of diameter). 5 μ M MPP⁺ + 70 μ M DA (black circles) were added at the time indicated by the arrow. Mitochondrial swelling was compared with control suspensions (open circles). Measurements were performed at 37°C in mitochondria suspensions in an incubation buffer containing about 0.2 mg protein/ml. Analogous results were obtained when DAox was used instead of DA. Mitochondrial swelling with 70 μ M DA, DAox or 5 μ M MPP⁺ alone did not differ from controls. The data are the mean ± SEM of three separate experiments. Two-way ANOVA demonstrated that the two curves are significantly different (P < 0.0001).

brain neurons, without significantly altering mitochondrial membrane potential (28). Furthermore, MPP+ has been proposed to have effects on mitochondrial function other than complex I inhibition. Thus there are reports of an inhibition of α-ketoglutarate dehydrogenase complex (1), a decrease in mitochondrial DNA content (29), the opening of the mitochondrial permeability transition pore and the release of cytochrome c at concentrations of MPP⁺ between 0.2 and 5 mM (30, 31). A loss of mitochondrial transmembrane potential has been reported in isolated hepatocytes incubated with 1 mM MPP+, coinciding with the inhibition of mitochondrial complex I and the depletion of ATP supplies (32). DA and MPP⁺ may have a synergistic effect on mitochondrial function. Interestingly, low concentrations of DA plus MPP⁺ together, but not separately, caused a significant increase in mitochondrial membrane potential and mitochondrial swelling that was not prevented by cyclosporin A. Although an increase in mitochondrial membrane potential associated with mitochondrial dysfunction is unexpected, it has recently been reported that a failure in the adenine nucleotide translocator/voltage-dependent anion channel may precede mitochondrial hyperpolarization and swelling (33).

The effect of MPP⁺ on complex I inhibition has usually been reported at concentrations of 100 μ M or higher, and even at those concentrations, the ability of MPP⁺ to inhibit complex I is beyond question, albeit moderate (between 25 and 50%). However, the concentration of MPP+ found in brains of animals treated with MPTP is no higher than 5 μ M 6 hours after the treatment (13). Although a selective transport mechanism may concentrate MPP⁺ into the dopaminergic endings, where MPP⁺ can accumulate in mitochondria, inhibiting complex I activity, several lines of evidence suggest that there may be other action mechanisms or targets for MPP⁺. We reported here a set of alterations in mitochondrial function caused synergistically by low concentrations of MPP⁺ and dopamine, both in its native form and in its oxidized form, without altering complex I activity. The fact that DA and DAox cause a similar potentiation of the effects of MPP⁺ indicates a mechanisms involving oxidation of DA. In the effects described for DA by microcalorimetry we cannot rule out the formation of DAox during the incubation. Indeed, analogous results to those shown in Fig. 1 were obtained when DAox was used instead of DA (not shown). Previous studies by microdialysis in vivo suggested that dopamine released by MPP+ may play a key role in MPP⁺-enhanced generation of OH \cdot free radicals in the striatum (34). MPP+ seems to be in-



FIG. 6. Membrane potential developed by 5 mM succinate \pm 0.8 mM ADP in control liver mitochondria (open circles) and effect of 5 μ M MPP⁺ together with 70 μ M DA (black circles) added as indicated by the arrow. Analogous results were obtained when DAox was used instead of DA. 1 mg of mitochondrial protein was used for the analysis. Each sample contains 2.5 μ M diS-C₂-(5). Changes in absorbance were recorded at 660 nm. Membrane potential in mitochondria incubated with 70 μ M DA, DAox or 5 μ M MPP⁺ alone did not differ from controls. Each point is the mean \pm SEM of four different experiments. Two-way ANOVA demonstrated that the two curves are significantly different (P < 0.0001).

Vol. 268, No. 3, 2000

volved in redox cycling (35). The oxidation of DA can be catalyzed by DAox itself and could enhance the MPP⁺ redox cycling, so that a local increase in free radicals could be enough to cause a whole mitochondrial dysfunction, although it was not reflected as an increase in malondialdehyde production. A dysregulation in the storage/release of DA, and its auto-oxidation at physiological pH, could play a decisive role in the neurotoxicant-mediated mitochondrial failure and neurodegenerative mechanisms associated with MPTP-toxicity. These findings may help us to understand the mechanisms underlying the etiology of Parkinson's disease.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by FIS 97/0763. J. Boada is a recipient fellowship of a grant from the University of Barcelona. The authors are grateful to Dr. J. Estelrich, for his help and valuable discussion on swelling measures, and to all the members of the Unitat de Bioquímica and Unitat de Fisiologia of Campus de Bellvitge. They are also grateful to Robin Rycroft for English language revision.

REFERENCES

- Tipton, K. F., and Singer, T. P. (1993) J. Neurochem. 61, 1191– 1206.
- Liu, Y., Roghani, A., and Edwards, R. H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 9074–9078.
- Ramsay, R. R., Youngster, S. K., Nicklas, W. J., McKeown, K. A., Jin, Y-Z, Heikkila, R. E., and Singer, T. P. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9168–9172.
- Ramsay, R. R., Mehlhorn, R. J., and Singer, T. P. (1989) Biochem. Biophys, Res. Commun. 159, 983–990.
- Krueger, M. J., Singer, T. P., Casida, J. E., and Ramsay, R. R. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 169, 123–128.
- Krueger, M. J., Tan, A. K., Ackrell, B. A. C., and Singer, T. P. (1993) *Biochem. J.* 291, 673–676.
- Heikkila, R. E., Nicklas, W. J., Vyas, I., and Duvoisin, R. C. (1985) Neurosci. Lett. 62, 389–394.
- Nicklas, W. J., Youngster, S. K., Kindt, M. V., and Heikkila R. E. (1987) Life Sci. 40, 721–729.
- Cutillas, B., Espejo, M., and Ambrosio, S. (1998) Neurochem. Int. 33, 35–40.
- Miller, J. W., Selhub, J., and Joseph, J. A. (1996) Free Radical Biol. Med. 21, 241–249.
- McLaughlin, B. A., Nelson, D., Ercinska, M., and Chesselet, M. F. (1998) *J. Neurochem.* **70**, 2406–2415.

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS

- Simantov, R., Blinder, E., Ratovitski, T., Tauber, M., Gabbay, M., and Porat, S. (1996) *Neuroscience* 74, 39–50.
- Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Yokohama, R., Shibata, T., Dawson, V. L., and Dawson, T. M. (1996) *Proc. Acad. Sci. USA* 93, 4565–4571.
- Manzano, A., Roig, T., Bermúdez, J., and Bartrons, R. (1996) Am. J. Physiol. 271, C1957–C1962.
- Schön, A., Haller, T., and Gnaiger, E. (1990) *Cyclobios Newslett.* 4, 67–72.
- Offen, D., Ziv, I., Barzilai, A., Gorodin, S., Glater E., Hochman, A., and Melamed, E. (1997) Neurochem. Int. 31, 207–216.
- Ben-Shachar, D., Zuk, R., and Glinka, Y. (1995) J. Neurochem. 64, 718–728.
- Cohen, G., Faroqui, R., and Kesler, N. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4890–4894.
- Arai, R., Horiike, K., and Hasegawa, Y. (1998) Brain Res. 812, 275–278.
- Petrescu, I., and Tarba, C. (1997) Biochem. Biophys. Acta 1318, 385–394.
- Boada, J., Gallardo, M., and Estelrich, J. (1997) Anal. Biochem. 253, 33–36.
- Vyas, I., Heikkila, R. E., and Nicklas, W. J. (1986) J. Neurochem. 46, 1501–1507.
- Pileblad, E., Slivka, A., Bratvold, D., and Cohen, G. (1988) Arch. Biochem Biophys. 263, 447–452.
- Ambrosio, S., Espino, A., Cutillas, B., and Bartrons, R. (1996) Neurochem. Res. 21, 73–78.
- 25. Filloux, F., and Townsend, J. J. (1993) Exp. Neurol. 119, 79-88.
- Morikawa, N., Nagakawa-Hattori, Y., and Mizuno, Y. (1996) J. Neurochem. 66, 1174–1181.
- Espino, A., Cutillas, B., Tortosa, A., Ferrer, I., Bartrons, R., and Ambrosio, S. (1995) *Brain Res.* 695, 151–157.
- Hoyt, K. R., Reynolds, I. J., and Hastings, T. G. (1997) Exp. Neurol. 143, 269–281.
- Miyako, K., Kai, Y., Irie, T., Takeshige, K., and Kang Dongchon (1997) J. Biol. Chem. 272, 9605–9608.
- Yang, J. C., and Cortopassi, G. A. (1998). Free Radical Biol. Med. 24, 624–631.
- Cassarino, D. S., Parks, J. K., Parker, W. D., and Bennett J. P. (1999) Biochem. Biophys. Acta 1453, 49–62.
- Wu, E. Y., Smith, M. T., Bellomo, G., and Di Monte, D. (1990) Arch. Biochem. Biophys. 282, 358–362.
- Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Scumacker, P. T., and Thompson, C. B. (1999) Mol. Cell 3, 159–167.
- Chiueh, C. C., Krishna, G., Tulsi, P., Obata, T., Lang, K., Huang, S-J., and Murphy, D. L. (1992) *Free Rad. Biol. Med.* 13, 581–583.
- Klaidman, L. K., Adams, J. D., Leung, A. C., Kim, S. S., and Cadenas, A. (1993) *Free Radical Biol. Med.* 15, 169–179.

ANNEX 12

Current Topics in Neurochemistry Vol. 1, (1997)

Intracerebral applications of MPP⁺: why so many different responses versus MPTP-treatment?

Santiago Ambrosio, Ana Espino, Blanca Cutillas, Monica Espejo and Ramon Bartrons Unitat de Bioquímica, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Spain

ABSTRACT

The ionic compound 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) is the main metabolite of the parkinsonizing drug MPTP and it seems to be the neurotoxic agent responsible for dopaminergic neurodegeneration. Since its discovery much has been learnt about its molecular mechanisms of action. MPP+ is taken up by dopaminergic terminals using the dopamine-reuptake mechanisms. Inside the cell, the MPP+ can be stored in dopaminergic vesicles or introduced into the mitochondria. The distribution between these two compartments seems to be crucial to an explanation of the toxic effects of MPP+ Inside the mitochondria MPP+ inhibits several enzyme activities, with a prominent role in the inhibition of monoamine oxidase and mitochondrial complex I NADH-dehydrogenase. The latter effect leads to a hypoxic-like condition, with energy failure and free oxygen radicals production.

Since rats are particularly resistent to MPTP neurotoxicity and MPP+ does not cross the blood-brain-barrier, MPP+ has often been injected directly into the rat brain in order to reproduce the effects of MPTP. Intranigral, intrastriatal or intracerebroventricular administrations, by injection or perfusion, are widely used. Although MPP⁺ administered in this way causes a marked depletion of dopamine in the rat brain, its effects are different from the selective effects described for MPTP in primates and mice. Why the effects of MPTP in some animals are difficult to reproduce in vivo by MPP+ in other animals is still an open question. Moreover, the mechanisms of cell death mediated by MPP*are not yet completely understood. The interest for such question is to answer whether there could be any endogenous compound whose accumulation in the brain could mimic the MPP* effects, leading to the nigrostriatal degeneration found in Parkinson's disease. Recent advances have provided new perspectives about the role not only of oxygen radicals but also of NO production in MPP' toxicity. It seems that a cascade of events may be triggered by MPP* at different steps in a concentration-dependent manner. We present a review of the results obtained in rats by MPP+ in vivo and the present status of knowledge of its molecular mechanisms of action, in an attempt to advance some explanation about the differences between MPTP and MPP*-treatments.

Corresponding author: Ramon Bartrons, Unitat de Bioquímica, Fac. Odontologia, c/. Feixa Llarga s/n (Bellvitge) Hospitalet del Llobregat - 08907 (Barcelona) - Spain

| List of abb | reviations |
|-------------|--|
| BDNF | brain derived neurotrophic factor |
| DA | dopamine |
| DAT | dopamine transporter |
| DOPAC | dihydroxyphenylacetic acid |
| HVA | homovanilic acid |
| MPP+ | 1-methyl-4-phenylpyridinium ion |
| MPTP | 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine |
| MAO | monoamine oxidase |
| NOS | nitric oxide synthase |
| TH | tyrosine hydroxylase |
| VAT | vesicular dopamine transporter |
| bFGF | basic fibroblast growth factor |
| NGF | nerve growth factor |
| DMSO | dimethylsulfoxide |
| PARS | poly(ADP-ribose)synthetase |
| NMDA | N-methyl-D-aspartate |

Introduction

The 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) is now widely accepted as the main metabolite of the parkinsonism-inducing drug 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and as the agent responsible for MPTP toxicity [1,2]. MPTP is a synthetic compound that is present as a contaminant of an analogue of meperidine (a drug known as "the new heroin" in the nineteen seventies,). When this contaminated drug was injected into humans or other primates it causes a condition that is very similar to idiopathic Parkinson's disease (for reviews [3-10]). MPP+ is the result of oxidation of MPTP by monoamine oxidase B (MAO-B), and it accumulates in the brain in a range of µM concentration after a treatment with toxic doses of MPTP. Several animal species (dogs, cats, mice) [10,11] have been used in the studies of MPTP effects. Although they do not develop a human-like parkinsonism, they clearly show neurochemical and anatomopathological manifestations of Parkinson's disease, such as loss of striatal dopamine and tyrosine hydroxylase and neuronal loss in the pars compacta of substantia nigra. The results obtained in rats are less conclusive, since they are particularly resistant to the effect of MPTP, even when it is infused directly into the striatum [12]. MPTP causes non-specific cell destruction in the rat only when injected into the substantia nigra [13].

The more we know about the mechanisms of action of MPTP,

via MPP* synthesis, the more progress we may make in understanding the ethiology of Parkinson's disease. No other chemical compound is as effective as MPTP/MPP* in reproducing the clinical, neurochemical and anatomopathological symptoms and characteristics of this illness. If the cause of parkinsonism can be found in a naturally occurring contaminant, the structure and mechanisms of MPP* should be taken in account.

MPP⁺ has a highly polar structure, and thus it cannot cross the blood-brain-barrier when it is administered peripherically [3]. Its action on cerebral catecholamines is negligible, but it causes marked depletion of peripheral noradrenaline, mainly cardiac, and it may be fatal at doses higher than 50 mg/Kg [14].

MPP⁺ synthesis

As MPP⁺ is synthesized by MAO-B, the inhibitors of MAO (pargyline) and MAO-B (deprenyl) may protect against the neurotoxic effects of MPTP in primates and mice [15]. The MAO-A/MAO-B ratio is approximately 0.3 in the nigrostriatal pathway in primates and approximately 2.0 in the rat. This may explain the lower sensitivity of rats to MPTP [16]. The distribution of MAO-B is predominantly glial or linked to serotoninergic neurons [17], whereas the isozyme present in dopaminergic neurons is MAO-A. It seems, therefore, that the oxidation of MPTP to MPP+ takes place outside the dopaminergic neuron. In particular, astrocytes metabolize MPTP to MPP⁺ [18]. Why astrocytes are spared from the action of MPTP is unclear, but an intermediate, less toxic metabolite, seems to be involved in this process: the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3dihydropyridinium ion (MPDP'), which, at the extracellular pH, can spontaneously transform to MPP' [19,20]. MPP' may be cleared by an organic cation/H⁺ antiporter [21] or may be taken up by cells containing catecholamine transporters, and with particular high affinity by nerve endings containing dopamine transporters.

MPP⁺ uptake

Thus, MPP+ is taken up by the dopaminergic endings through the dopamine reuptake systems [22]. This effect is the main explanation for its selective effects on dopaminergic neurons. Specific inhibitors of dopamine re-uptake, such as cocaine, nomifensine or GBR-12909, protect mice against the MPTP effects [23,24]. The specificity of the dopamine transporter (DAT) for MPP+ depends on the species considered, being lower in rat than in human and virtually non existent in cows [25]. The uptake through DAT seems to be a limiting step in the MPP⁺ action: DAT is sensitive not only to specific inhibitors, but also to compounds that partially protect against the dopamine-depleting effects of MPP* by reducing its transmembrane transport, such as cytochrome P450 inhibitors (piperonyl butoxide or SKF-525A) [26], deprenyl at concentrations higher than those expected to inhibit MAO-B [27-29], lazaroids (21-aminosteroids) [30] and even MK-801, ususally considered as an NMDA-antagonist [31].

MPP⁺ inside the cell

Inside the cell, MPP* may enter the mitochondria or it may be sequestered by catecholaminergic vesicles, using in this last case the vesicle transporter of amines (VAT) [32]. Vesiculated MPP* may then be transported retroaxcnally to the substantia nigra [33]. In the neuronal soma of primates and other species, MPP* may bind to the neuromelanin present in the pars compacta of substantia nigra, thus forming a reservoir that would eventually damage the cell [34]. It is unlikely, however, that neuromelanin affects MPTP/MPP* action in Santiago Ambrosio et al.

rodents, since it is present only at very low levels [35].

The sequestration of MPP⁺ into catecholaminergic vesicles may protect the mitochondria, and so the sensitivity of a given cell type to the toxic effects of MPP⁺ may depend on its distribution between vesicles and mitochondria [36,37]. This would explain why chromaffin cells are less sensitive to the MPP⁺ action, although they content abundant catecholamine transporters.

MPP+ into the mitochondria

MPP* seems to enter the mitochondria in a non-saturable way, suggesting that this transport is not mediated by a carrier and that a passive transport is then involved [38,39]. The ability of mitochondria to concentrate MPP* needs the electrochemical gradient and is independent of the cellular origin of the mitochondria [40]. Inside the mitochondria, MPP* acts as an MAO inhibitor, a role also played by MPTP, for both MAO isoforms [41]. So, it dramatically reduces the synthesis of the main dopamine metabolites, dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA).

However, the most marked effect of MPP+, probably leading to cell death, is the inhibition of complex I of the respiratory chain at the level of NADH-dehydrogenase (NADH-DH) [42-44]. It seems clear that MPP+ inhibits the mitochondrial activity at the same site as rotenone [45], a well known mitochondrial inhibitor, blocking the NADH-CoQ-reductase activity. Although to a lesser extent, MPP* also inhibits a-ketoglutarat-dehydrogenase [44], complexes III and IV, but not complex II [46]. As a result of this action MPP⁺ alters the pH gradient across the mitochondrial membrane, which is essential for ATP synthesis [42,47], causes a depletion of mitochondrial calcium [48], and increases the cytosolic calcium concentration. A consequence of the inhibition of mitochondrial oxidation of NADHlinked substrates would be a decrease in the NAD⁺/NADH ratio, which would result in an increased conversion of pyruvate to lactate [49,50]. The ATP content decreases by the effect of MPP* [50-52] and this ATP depletion slows the uptake of MPP*, which can then be released from vesicles together with dopamine [53] and act on other cells

MPP* administered into the rat brain

Although rats are particularly resistent to MPTP, MPP* may damage the rat brain if administered directly.

 MPP^* injected i.e.v. in the rat (400 nmol in 4 µl) produces a decrease of about 60-80% in dopamine concentrations of striatum, hypophysis and median eminence, but not of olfactory bulb or substantia nigra [54,55].

The nigro-striatal tract.

In the same study in which the effect of MPTP was assayed by injection into the substantia nigra [12], the authors described that when MPP* was injected to the substantia nigra of the rat brain instead of MPTP, it destroyed this brain area. The infusion (10 mM) or the injection of MP' (50 nmol in 2 µl) into the substantia nigra also produce an almost immediate blockade of neuronal impulse flow, reflected in a fast decline in dopamine release and dopamine content in the ipsilateral striatum [56-58]. Similar results on substantia nigra destruction and striatal dopamine depletion have been described when MPP' is infused into the nigrostriatal tract; these results are similar to those obtained following the administration of 6-hydroxydopamine in the medial forebrain bundle. In both cases, in response to the loss of striatal dopamine, the striatal dopamine receptors increase [59,60]. MPP' injected into the substantia nigra

Intracerebral applications of MPP+

neurons [61].

The striatum

When 40 nmol of MPP* was injected in a volume of 4 μ into the rat striatum, the concentration of dopamine decreased dramatically [62]. Similar results on dopamine content were obtained by intrastriatal injection of rotenone [63], demonstrating that inhibition of mitochondrial NADH-DH oxidation is sufficient to cause dopamine loss.

When MPP+ is infused by microdialysis into the striatum, an instantaneous release of striatal dopamine is detected. In fact, intrastriatal infusion of 10 mM of MPP* causes a massive transient increase in extracellular dopamine to over 10,000% of basal values [64]. The infusion of MPTP also caused a dose-dependent increase in the release of dopamine, but to a much lower extent (about 1,000%). In the MPP*-striatal perfusates the DA metabolites, DOPAC and HVA, decrease markedly, as a consequence of MAO inhibition (both isozymes). The concentration of MPP* found in the striatum after three hours of perfusion of 10 mM, at 2 µl/min, was 44 nmol/mg protein (approx. 2 mM) [65], which is nearly 1,000-fold the concentrations of MPP* found in the brain after MPTP-treatment. The administration of high concentrations of MPP⁺ by infusion is determined by the EC50 for this treatment. The infusion of 10 mM of MPP⁺ causes a similar depletion of dopamine in mouse and rats [66], but the EC50 for neurotoxicity of an intrastriatal infusion of MPP+ in mice is 0.4 mM, whereas in rats it is 10-fold higher (4 mM). In addition, according to other authors, striatal dopamine is markedly depleted in mice after MPP⁺ infusion (≥80%) but only about 20% in rats [67], once more indicating a major susceptibility of mice to the lesion. The effect of intrastriatal MPP+ to the rat is, in any case, local and limited to the treated striatum: only traces of MPP* diffuse to the contralateral striatum [65], where dopamine content and function are spared [68].

The dopamine depletion was prevented by nomifensine, a dopamine re-uptake blocker, only when MPP^{*} was perfused at a concentration of ro lower than 1 mM, but not at 5 mM, indicating that at higher concentrations the introduction of MPP^{*} in the dopaminergic ending through a specific transporter is not a limiting step [69]. Nomifensine does not alter the reduction of DOPAC or HVA under MPP^{*} infusion, suggesting that the metabolism of DA is partially located outside dopaminergic terminals and that MPP^{*} also acts in non-dopaminergic cells [70].

Rats with unilateral administration of MPP⁺ show a spontaneous ipsilateral rotation during the first hours after treatment and a marked amphetamine-induced ipsilateral rotation even a month after the treatment, suggesting a destruction of pre- and post-synaptic components. Rats bilaterally treated with MPP⁺ show no rotational behaviour but an impaired motor activity [71]. Cerebrospinal levels of HVA have often been studied in patients with Parkinson's disease as a possible parameter of the lesion. In animals bilaterally lesioned with MPP⁺, cerebrospinal HVA levels are approximately proportional to the degree of the striatal lesion [72-73].

When MPP* was infused to the striatum several days after the nigra, the farmer was unresponsive, indiicating the irreversibility of the lesion in the substantia nigra [58]. However, a striatal infusion of MPP* two months after a striatal MPP* injection produces a dopamine depletion very similar to that found in controls [72]. Thus, the striatal administration of MPP' does not seem to destroy the substantia nigra, allowing at least a partial recovery of striatal dopamine content.

Lack of selectivity

However, when neurotransmitters other than dopamine were

115

studied in response to intrastriatally perfused or injected MPP*, a similar or even higher depletion was found for glutamate, aspartate, taurine, acetylcholine, GABA, serotonin and adenosine [74-77]. The overflow of some of these compounds is derived from neuronal vesicles as well as metabolic events [74]. In addition, MPP+ causes a dose-dependent increase in lactate production from rat striatum, also detected by microdialysis in vivo [78]. These results were interpreted as an effect of MPP' on the mitochondrial chain: cessation of the electron flow causes a compensatory increase in anaerobic glycolysis, resulting in a transient enhanced production of lactate, as also demonstrated in vitro [49]. But other parameters characteristic of an increase in glycolysis, such as fructose 2,6-bisphosphate, were decreased by the action of MPP^+ in the rat striatum [73]. These effects, together with a decrease in striatal ATP and energy charge indicate a non-selective effect of MPP*, leading to [50,73] degeneration of neurons and probably other cells. In various experiments in which MPTP was infused into the rat striatum, only a small cavity, similar to that seen after infusion of vehicle, with a central nodule of leucocytes, was described after one month [79]. In contrast, rats infused with an equimolar amount of MPP* showed tissue necrosis, characterized by the presence of neurons and glial cells with pyknotic nucleus and either swollen or shrunken cytoplasm, 6 h after the treatment [73], and massive necrosis with spongiosis and central cavitation after 24 h [73,79]. This would explain the spontaneous ipsilateral rotation after unilateral striatal infusion of MPP*. There was no evidence that MPP* causes destruction of pars compacta substantia nigra even two months after its striatal infusion [73,79].

MPP⁺ and apoptosis

Many efforts have been made to relate the neurodegenerative effects of MPP⁺ with an apoptotic process, mainly after the assessment that MPP⁺ is neurotoxic for ventral mesencephalic cultures [80]. Several lines of evidence suggest that nigral cell death in Parkinson's disease is an active neuropathological process that develops by apoptosis [81,82]. If some neurotoxin, perhaps MPTP-like, was involved in the genesis of Parkinson's disease, it would probably act through programmed cell death. Indeed, MPP⁺ is able to induce apoptosis at low concentrations (<100 μ M) in cultured PC12 cells [83,84], granular cerebellar cells [85], human neuroblastoma [86], and co-cultured striatal-mesencephalic cells [87]. However, no signs of apoptosis have been reported in *vivo* either in mice treated with MPTP [88] or in rats treated with MPP⁺ [52].

MPP⁺ and NMDA

Since MPP⁺ interferes with energy metabolism and depletes cell energy supplies, one expected consequence of such energy deprivation in neurons is an alteration in cell membrane function, leading to partial depolarization and hence to activation of the voltage-dependent glutamate receptor channels. The toxic effect of MPP⁺ in the substantia nigra can be prevented by co-administration with some NMDA-antagonist, such as AP7, CCP or MK-801, but not by the preferential quisqualate antagonists CNQX and NBQX [89]. This protection is dose-dependent in the range of 25-250 nmol of MPP⁺. MPP⁺ alone could not be toxic to the substantia nigra, but it could induce irreversible changes in neuronal function, needing an additional step mediated by excitatory amino acids acting through NMDA receptors [89]. However, more probably, the disruption of dopamine function in the substantia nigra may cause the failure of some inhibitory mechanism on glutamatergic terminals in substantia

nigra, so that the release of excitatory amino acids could increase the effects of MPP⁺.

The effect of treatment of mice with MPTP seems to be temporarily prevented by MK-801, delaying the dopamine release for the first 8 hours after MPTP treatment [90]. In the same way, repeated i.p. treatment with MK-801 [91], or deafferentation of cortico-striatal glutamatergic pathways [92], partially protect against striatal dopamine depletion. MK-801 has no effect on dopamine depletion when MPP⁺ is infused into the striatum, but may reduce the depletion of glutamate and aspartate [93]. It seems then that MPP⁺ exerts a releasing effect on excitatory amino acids, which, through NMDA receptors, could participate in the nigrostriatal neurodegenerative process.

These results are in accordance with the hypothesis that neurotoxicity mediated by excitatory amino acids may be involved in the pathogenesis of Parkinson's disease [94,95]. However, the protective results of MK-801 in rats or mice against MPP⁺ or MPTP could not be reproduced by other authors [96]. Moreover, MK-801 did not protect the metabolic deficiences caused by MPP* [52,90] and also faied to protect dopaminergic neurons in vitro [97,98], indicating that it could only attenuate the severity of the lesion in vivo by counteracting the effects of glutamate release. Other authors [31], using striatal synaptosomes preloaded with [3H]-dopamine, demonstrated that MK-801, at concentrations higher than 100 nM, could protect against the releasing effect of MPP+, but this protection was unaffected by the omission of calcium, nor was it reduced by other NMDA-antagonists (AP-7) and, in addition, NMDA has no releasing effect on dopamine. They conclude then that the protective effects described for MK-801 may be due to an action on the dopamine transporter rather than on the NMDA-receptor [31].

MPP⁺ and free radicals

MPTP and MPP⁺ in contact with mitochondria generate superoxide free radicals [99,100]. The chemical similarity between MPP⁺ (cyperquat) and the common herbicide paraquat [101] led to search for a similarity in their mechanisms of action. Paraquat greatly increases lipid peroxidation, and antioxidants such as desferroxin or DPPD reduce its toxicity, but not that of MPP⁺. In addition, MPP⁺ and paraquat, in spite of the similarity of their structure, have different actions in cells and submitochondrial systems [102].

Hydroxyl radical formation was enhanced during incubation of MPP⁺ with oxygen, NADPH and NADPH-cytochrome P-450 reductase [103]. MPP⁺ night produce an oxidative stress through a redox cycling that involves free radical production in the presence of flavin-containing redox enzymes, which allow its reduction to a free radical MPP⁻ [104,105]. However it seems improbable that this occurs *in vivo*, because of the high reduction potential of MPP⁺.

MPTP seems to fail to induce lipid peroxidation *in vivo* [106], but MPP' has been reported to do so, according to measurements of the increase in the thiobarbiturate-reactive products in hepatocyte cultures [107]. Oxygen radical production and their extracellular presence after MPP' treatment has been demonstrated by cerebral microdialysis with a salicylate-reagent *in vivo* [108]. But the procedure to detect free radical production by conversion of salicylate to dihydroxybenzoate has been questioned by some authors, who demonstrated that oxidation of salicylate by O₂ may be more than 10fold that expected due to the administration of MPP' [109]. However, the iron-chelator desferroxiamine, administered by microdialysis, is able to reduce the dopamine efflux caused by MPP' [110], once more suggesting a role for free radicals, stimulated by transition metals, in MPP' toxicity.

Many enzymatic activities may be affected by hydroxylation.

This would explain why, above certain concentrations, MPP⁺ could inhibit tyrosine hydroxylase [111], dihydrobiopterine reductase [112], aromatic amino acid decarboxylase [113], glutathione S-transferase [114], acetylcolinesterase [115]. Even adenylate cyclase activity may be decreased by MPP⁺, since the increase in intracellular cAMP by phosphodiesterase IV inhibitors is able to reduce the toxicity of MPTP [116,117].

Santiago Ambrosio et al.

The protection of dopaminergic cultures with brain-derived neurotrophic factor (BDNF) against 6-hydroxydopamine and MPP⁺ toxicity has also been related to an increase in glutathione reductase, and then to a reduction of hydroxyl radicals [118]. Systemic administration of NGF, BDNF, bFGF (but not NT3) to neonatal rats can protect against MPP⁺ -induced striatal damage and reduce hydroxyl radical generation (assessed by dihydroxybenzoic acid production) [119].

However, the conventional procedures to detect thiobarbiturate-reactive products as indicators of lipid peroxidation and free oxygen radical production indicate an increase in free radicals in incubations of striatal slices only at concentrations of MPP⁺ above 1 mM [120]. At these concentrations, MPP⁺ has nonselective effects on non-dopaminergic neurons and non-neuronal structures that can be abolished by DMSO [120].

MPP⁺ and NO

The free radical NO can act in the nervous system as a neuronal messenger but, in situations of excessive production, it may become neurotoxic [121]. NO is suspected of being one of the many sources of toxic free radicals in the brain, since its reaction with the superoxide anion leads to formation of peroxynitrite anion, which is an extremely potent oxidizing agent. NO is synthesized from Larginine by nitric oxide synthase (NOS). Three major isoforms of this enzyme have been identified and cloned: neuronal (nNOS), endothelial (eNOS) and inducible (iNOS). nNOS and eNOS are constitutively expressed and are calcium/calmodulin-dependent [121]. In patients with Parkinson's disease increased expression of NADPH-diaphorase-NOS-related activity has been reported in the dopaminergic cell groups affected by the illness [122].

When rats are intrastriatally perfused with MPP⁺ and nitroarginine, an inhibitor of NOS, the depletion of dopamine and the production of free radicals seem attenuated [123]. Inhibition of nNOS with 7-nitroindazole, a relatively selective inhibitor of neuronal NOS, protects mice and baboons against MPTP neurotoxicity [124-126], suggesting a key role of NO in dopamine neuron degeneration. Since tyrosine hydroxylase-positive mescncephalic neurons do not possess nNOS immunoreactivity [127], the source of NO must be outside these neurons. The striatum contains a high density of nNOS positive neurons that colocalize with NADPH-diaphorase, which could be the source of NO. NADPH-diaphorase neurons are selectively resistant to degeneration in conditions such as stroke, Huntington's chorea and Alzheimer's disease, and also in cerebral ischemia [121]. Thus, neurons that release NO may be resistant to its cytotoxic actions.

NO may react with superoxide, increased as a consequence of mitochondrial respiratory chain blockage, form peroxynitrite (ONOO-) and induce oxidation of numerous proteins and lipids or nitrosylate tyrosines of proteins. NO also elicits DNA strand breaks, and the DNA fragments activate poly(ADP-ribose) synthetase (PARS) [128]. It is not clear whether MPP⁺ finally activates PARS and how this could take place, but inhibitors of PARS (benzamide, nicotinamide, 1,5-dihydroxyisoquinoline) protect against MPTP-induced dopamine depletion [129]. However, the same authors that describe these results recognize that the protective effect of these PARS-inhibitors could in all the cases be explained by mechanisms

Intracerebral applications of MPP+

other than PARS inhibition.

In the brain, NOS activation forms part of a cascade of intracellular events caused by NMDA activation, and NO then mediates certain actions of glutamate through NMDA receptors [130]. One of these actions results in dopamine release [131]. NMDA and NO could be involved in the mechanisms of MPP* action and so NMDA- or NOS-inhibitors could prevent its effects.

We have found, using striatal slices, that NOS inhibitors may protect against the dopamine depleting effect only at concentrations of MPP⁺ below 5 μ M (data not published). At these concentration MPP⁺ has no effect on glutamate release but the calcium release by mitochondria seems synergistically enhanced by MPP⁺ in the presence of NO [132]. Moreover, reactive microglial cells can express iNOS, and these cells have been implicated in the pathogenesis of different diseases, such as Parkinson's. Whether neuronal damage results from increased generation of NO by the nNOS or iNOS, or both, remains to be determined.

Concluding remarks

MPP⁺ injected into the rat brain *in vivo*, despite being the active metabolite of MPTP, causes very different effects from peripherally administered MPTP. The effects of MPP⁺ are related to the concentration of this compound in contact with cerebral dopaminergic structures. At very low concentrations (< 2μ M) MPP⁺ may enter the dopaminergic terminals using the dopamine transporter and inhibit MAO activity with high affinity (Figure 1). MPP⁺ is also sequestered by dopamine vesicles and expelled from terminals using the cation/proton exchanger. At concentrations between 2 and 5 μ M MPP⁺ can inhibit mitochondrial activity and reduce ATP production (Figure 2), so the cell depolarizes, MPP⁺ is not expelled by the ATP-dependent cation/proton exchanger and it is released from vesicles together with dopamine. At this step, MPP⁺ effects can be blocked by NOS inhibitors, indicating the participation of NO in MPP⁺



Figure 1: Action of MPP+ at concentrations lower that 2 μ M. MPP⁺ can be taken up by the dopaminergic synaptic terminals using dopamine transporters (DAT). Although MPP⁺ could be stored in dopamine vesicles (v), using the vesicular transporter (VAT), or in mitochondria (m), the concentrations are low enough to allow the cation/proton antiporter to eject MPP⁺ from the cell. Dopamine neurons are essentially preserved.





Figure 2: Action of MPP⁺ at concentrations between 2 and 5 μ M. At these concentrations MPP⁺ can inhibit mitochondrial activity. The mechanisms for ejecting MPP⁺ from the cell fail. A slow but significant depletion of dopamine take place. The effects of MPP⁺ can be, at this stage, prevented by the inhibition of neuronal NO-synthase (NOS), present in non-dopaminergic neurons (*ndn*), by 7nitroindazole (7-NI). The constitutive NO production, or the activation of NOS by MPP⁺, could amplify the mitochondrial radical production due to NADH-DH inhibition. The resultant production of peroxynitrite ions would be a triggering factor for dopamine depletion. NOS-inhibitors does not modify the decrease of dopamine metabolites (DOPAC and HVA) due to the MAO inhibition by MPP⁺. Antagonists of dopamine reuptake (nomifensine, cocaine) blocks the effect of MPP⁺, indicating that the input of MPP⁺ into the dopamine terminals is essential for toxicity.



Figure 3 : Action of MPP⁺ at concentrations higher than 5 μ M. The inhibition of nNOS is not enough to prevent the MPP+ effects on dopamine depletion. The inhibition of mitochondrial activity by MPP+ is probably sufficient to produce increases in free radicals and intracellular calcium to cause depletion of dopamine. The result is a marked release of dopamine, with concomitant loss of dopamine striatal stores. The metabolism of dopamine is still blocked by MAO inhibition, so that intracellular and extracellular concentrations of DOPAC and HVA are markedly reduced. MPP+ can be retroaxonally transported inside dopamine vesicles but, at least in rats, its effect on substantia nigra is negligible.

intracellular MPP* effects. These concentrations of MPP* correspond to the amount of MPP* that may accumulate in the brain after MPTP treatment [124], so MPTP-treatment might be protected by NOSinhibitors.

The effect of concentrations higher than 5 μ M (Figure 3) cannot be protected by NOS-inhibitors, probably because the cell depolarization and intracellular calcium increases caused by MPP⁺ itself are enough to produce vesicle depletion. However, very high concentrations (> 1 mM) of MPP⁺, infused or injected into the striatum, are necessary to observe an effect on striatal dopamine content *in vivo*, because of the low diffusion of MPP⁺. At those concentrations the radical production may be detected by malondialdheyde increase and it would be responsible for the inhibition of many enzymatic activities, the depletion of neurotransmitters other than dopamine, the non-selective effects on the whole striatal tissue and, thus, the hypoxic-like metabolic response (Figure 4).

In conclusion MPTP and MPP⁺ have been used extensively to reproduce dopaminergic lesions in several species, although sensitivity to MPTP depends on the species. However, when MPP⁺ ,instead of MPTP, is applied directly to the rat brain its effects are dramatically dose-dependent: low concentrations (< ImM) of MPP⁺



Figure 4: Action of MPP⁺ at concentrations higher than 1 mM. These concentrations of MPP+ in contact with striatal tissue are not prevented by dopamine transporter inhibitors. MPP+ can thus enter the cell by other mechanisms that require less affinity and it can probably enter other non-dopaminergic cells. The blockage of mitochondrial activity is important enough to significantly reduce the ATP and to increase the lactate content in the whole striatum. The oxygen free radical production is very important, as for mitochondrial blockade as for the involvement of MPP* itself in a redox cycling, and can be detected by lipid peroxydation and malondialheyde (MDA) increase. Many enzymatic activities are decreased in dopaminergic terminals, such as tyrosine hydroxylase (TH); in glial cells, such as glutamine synthetase (GS); in the extracellular space, such as choline acetylesterase (CAE). The result is a marked depletion of dopamine and other neurotransmitters, glutamate, aspartate, serotonine, acetylcholine, adenosine (see references in the text), which can be detected by an increase in concentrations in samples collected by microdialysis. After some hours of contact with such concentrations of MPP+ the striatal tissue shows a marked global necrosis.

Santiago Ambrosio et al.

in vivo do not significantly alter the dopamine striatal content, whereas higher concentrations cause non-specific degeneration of neuronal and non-neuronal structures. Further work is required in order to solve several unanswered questions, such as the relationship between MPP'and the molecular mechanisms of apoptosis and necrosis, which could be involved in neurodegenerative processess.

Acknowledgments: This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FIS 95/0188) and Generalitat de Catalunya (1995 SGR/00427).

References

 Chiba, K., Trevor, A., and Castagnoli Jr., N. 1984, Biochem. Biophys. Res. Commun., 120, 574.

[2] Johannessen, J.N., Keiner, L., Hanselman, D., Shih, M.C., and Markey, S.P. 1985, Neurochem. Int., 7, 169.

[3] Langston, J.W., and Irwin, I. 1986, 9, 485.

[4] Jenner, P. and Marsden, C.D. 1986, J. Neural Transm. Suppl. XX, 11.

[5] Singer, T.P., Castagnoli Jr., N., Ramsay, R., and Trevor, A.J. 1987, J. Neurochem., 49, 1.

[6] Singer, T.P., Trevor, A.J., and Castagnoli Jr., N. 1987, TIBS, 12, 266.

[7] Kinemuchi, H., Fowler, C.J., and Tipton K.F. 1987, Neurochem. Int., 11, 359.

[8] Singer, T.P. and Ramsay, R.R. 1990, FEBS Lett., 274, 1.

[9] Bloem, B.R., Irwin, I., Buruma, O.J.S., Haan, J., Roos, R.A.C., Tetrud, J.W. and Langston, J.W. 1990, J. Neurol. Sci., 97, 273.

[10] Tipton, K.F., and Singer, T.P. 1993, J. Neurochem., 61, 1191.

[11] Chiueh, C.C., Markey, S.P., Burns, R.S., Johannessen, J.N., Jacobowitz, D.M., and Kopin, I.J. 1984, Psycopharmacol. Bull., 20, 548.

[12] Bradbury, A.J., Costall, B., Domeney, A.M., Jenner, P., Kelly, M.E., Marsden, C.D. and Naylor, R.J. 1986, Nature, 319,56.

[13] Takada, M., Li, Z.K., and Hattori, T., 1987. Neurosci. Lett., 78, 145.

[14] Algeri, S., Ambrosio, S., Garofalo, P., and Gerli, P. 1987, Eur. J. Pharmacol., 141, 309.

[15] Cohen, G. and Mytilineou, C. 1985, Life Sci., 1985, 35, 237.

[16] Willoughby, J., Glover, V., Sandler, M., Albanese, A., Jenner, P., and Marsden, C.D. 1988, Neurosci. Lett., 90, 100.

[17] Levitt, P., Pintar, J.E., Breakfield, X.O. 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6385.

[18] Ransom, B.R., Kunis, D.M., Irwin, I., and Langston J.W. 1987, Neurosci. Lett., 75, 323.
Intracerebral applications of MPP+

[19] Castagnoli, N., Chiba , K., and Trevor, A.J. 1985, Life Sci., 36, 225.

[20] Peterson, L.A., Caldera, P.S., Trevor, A., Chiba, K., Castagnoli Jr., N. 1985, J. Med. Chem., 28, 1432.

[21] Zuddas, A., Corsini, G.U., Schinelli, S., Barker, J.L., Kopin, I.J., and di Porzio, U. 1989, Brain Res., 501, 11.

[22] Javitch, J.A. and Snyder, S.H. 1985, Eur. J. Pharmacol., 106, 455.

[23] Mayer, R.A., Jarvis, M.F., and Wagner, G. 1985, Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol., 49, 145.

[24] Melamed, E., Rosenthal, J., Cohen, O., Glogus, M., and Uzzan, A. 1985, Eur. J. Pharmacol., 116, 179.

[25] Lee, S.H., Rhee, J., Koh, J.K., Lee, Y.S. 1996, Neurosci. Lett., 214, 199.

[26] Sriram, K., Pai, K.S., and Ravindranath, V. 1995, J. Neurochem., 64, 1203.

[27] Mytilineou, C., Cohen, G. 1985, J. Neurochem, 45, 1951.

[28] Koutsilieri, E., O'Callaghan, J.F.X., Chen, T.S., Riederer, P., and Rausch, W.D. 1994, Eur. J. Pharmacol., 269, R3.

[29] Koutsilieri, E., Chen, T-S., Rausch, W.D., and Riederer, P. 1996, Eur. J. Pharmacol., 306, 181.

[30] Sanchez-Ramos, J.R., Song, S., Mash, D.C., and Weiner, W.J. 1992., J. Neurochem., 58, 328.

[31] Clarke, P.B., and Reuben, M. 1995, Br. J. Pharmacol., 114, 315.

[32] Liu, Y., Roghani, A., and Edwards R.H. 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 9074.

[33] Cambell, K.J., Takada, M., and Hattori, T. 1990, Neurosci. Lett., 118, 151.

[34] D'Amato, R.J., Lipman, Z.P., and Snyder, S.H. 1986, Science, 231, 987.

[35] De Mattei, M., Levi, A.C., and Fariello, R.G. 1986, Neurosci. Lett., 72, 37.

[36] Liu, Y., Peter, D., Roghani, A., Schuldiner, S., Privé G.G., Eisenberg D., Brecha N., and Edwards, R.H. 1992, Cell, 70, 539.

[37] Zuddas, A., Fascetti, F., Corsini, G.U., and Piccardi, M.P., 1994, Exp. Neurol., 127, 54.

[38] Aiuchi, T., Syou, M., Matsunaga, M., Kinemuchi, H., Nakaya, K., and Nakamura, Y. 1992, Biochem. Biophys. Acta, 1103, 233.

[39] Davey, G., Tipton, K.F., and Murphy, M.P. 1992, Biochem. J., 288, 439.

[40] Thakar, J.H., and Hassan, M.N. 1988, Life Sci., 43, 143.

[41] Singer, T.P., Salach, J.I., and Crabtree, D., Biochem. Biophys.

Res. Commun. 1985, 127, 707.

[42] Mizuno, Y., Sone, N., Suzuki, K., and Saitoh, T. 1988, J. Neurol. Sci., 86, 97.

[43] Mizuno, Y., Saitoh, T., and Sone, N. 1987. Biochem. Biophys. Res. Commun., 143, 294.

[44] Mizuno, Y., Suzuki, K., Sone, N., and Saitoh T. 1988, Neurosci. Lett., 91, 349.

[45] Krueger, M.J., Singer, T.P., Casida, J.E., and Ramsay, K.R. 1992, Biochem. Biophys. Res. Commun., 169, 123.

[46] Desai, V.G., Feuers, R.J., Hart, R.W., and Ali, S.F. 1996, Brain Res., 715, 1.

[47] Chan, P., DeLanney, L.E., Irwin, I., Langston, J.W., and Di Monte, D. 1991, J. Neurochem., 57, 348.

[48] Frei, B., and Richter, C. 1986, FEBS Lett., 198, 99.

[49] Vyas, I., Heikkila, R.E., and Nicklas, W.J. 1986, J. Neurochem., 46, 1501.

[50] Storey, E., Hyman, B.T., Jenkins, B., Brouillet, E., Miller, J.M., Rosen, B.R., and Beal, M.F. 1992, J. Neurochem., 58, 1975.

[51] Scotcher, K.P., Irwin, I., DeLanney, L.E., Langston, J.W., and Di Monte, D. 1990, J. Neurochem., 54, 1295.

[52] Espino, A., Tortosa, A., Bendahan, G., Bartrons, R., Calopa, M., Ferrer, I., and Ambrosio, S. 1994, J. Neurochem., 62, 1913.

[53] Matsunaga, M., Shirane, Y., Aiuchi, T., Nakamura, Y., and Nakaya, K. 1996, Biol. Pharmacol. Bull., 19, 29.

[54] Okada, M., Yokotani, K., Yamashita, M., Ikeda, H., and Osumi. Y. 1989, Life Sci., 45, 391.

[55] Steffen, V., Santiago, M., de la Cruz, C.P., Revilla, E., Machado, A., and Cano, J. 1995, Hum. Exp. Toxicol., 14, 865.

[56] Sun, C.J., Johannessen, J.N., Gessner, W., Namura, I., Singhaniyom, W., Brossi, A., and Chiueh, C.C. 1988, J. Neural Transm., 74, 75.

[57] Santiago, M., Rollema, H., de Vries, J.B., and Westerink, B.H.C. 1991, Brain Res., 538, 226.

[58] Santiago, M., Westerink, B.H.C., and Rollema, H. 1991, J. Neurochem., 56, 1336.

[59] Sirinathsinghji, D.J.S., Heavens, R.P., Richards, S.J., Beresford, I.J.M., and Hall, M.D. 1988, Neuroscience, 27, 117.

[60] Beresford, I.J.M., Davenport, AP., Sirinathsinghji, D.J.S., Hall, M.D., Hill, R.G., and Hughes, J. 1988, Neuroscience, 27, 129.

[61] Jassó-López, D., and Tapia, R. 1995, J. Neurochem., 64, 794.

[62] Heikkila, R.E., Nicklas, W.J., and Duvoisin, R.C. 1985, Neurosci. Lett., 59, 135.

119

120

[63] Heikkila, R.E., Nicklas, W.J., Vyas, I., and Duvoisin, R.C. 1985, Neurosci Lett., 62, 389.

[64] Rollema, H., Damsma, G., Horn, A.S., de Vries, J.B., and Westerink, B.H.C. 1986, Eur. J. Pharmacol., 126, 345.

[65] Ozaki, N., Nakahara, D., Kaneda, N., Kiuchi, K., Okada, T., Kasahara, Y., and Nagatsu, T. 1987, J. Neural Transm., 70, 241.

[66] Rollema, H., Alexander, G.M., Grothuse, J.R., Matos, F.F., and Castagnoli Jr, N. 1989, Neurosci. Lett. 106, 275.

[67] Giovanni, A., Sonsalla, P.K., and Heikkila, R.E. 1994, J. Pharmacol. Exptl. Ther., 270, 1008.

[68] Santiago, M., Cano, J., and Westerink, B.H.C. 1993, Brain Res., 628, 187.

[69] Santiago, M., Machado, A., and Cano, J. 1996, J. Neurochem., 66, 1182.

[70] Santiago, M., Granero, L., Machado, A., and Cano, J. 1995, Eur. J. Pharmacol., 280, 251.

[71] Espino, A., Cutillas, B., Tortosa, A., Ferrer, I., Bartrons, R., and Ambrosio, S. 1995, Brain Res., 695, 151.

[72] Espino, A., Ambrosio, S., Bartrons, R., Bendahan, G., and Calopa, M. 1994, J. Neural Transm. [P-D Sect], 7, 167.

[73] Espino, A., Llorens, J., Calopa, M., Bartrons, R., Rodríguez-Farré, E., and Ambrosio, S. 1995, Brain Res., 669, 19.

[74] Westerink, B.H.C., Damsma, G., Rollema, H., de Vries, J.B., and Horn, A.S. 1987, Life Sci., 41, 1763.

[75] Rollema, H., de Vries, J.B., Damsma, G., Westerink, B.H.C., Kranenborg, G.L., Kuhr, W.G., and Horn, A.S. 1988, Toxicology, 49, 503.

[76] Miyake, H., and Chiueh, C.C. 1989, Eur. J. Pharmacol., 166, 49.

[77] Ballarín, M., Reiriz, J., Ambrosio, S., Camps, M., Blesa, R., and Mahy, N. 1989, Brain Res., 483, 184.

[78] Rollema, H., Kuhr, W.G., Kranenborg, G., de Vries, J., and Van der Berg, C. 1988, J. Pharmacol. Exptl. Ther., 245, 858.

[79] Gibb, W.R.G., Costall, B., Domeney, A.M., Kelly, M.E., and Naylor, R.J. 1988, Brain Res. 461, 361.

[80] Mytilineou, C., Cohen, G., and Heikkila, R.E. 1985, Neurosci. Lett., 57, 19.

[81] McGeer, P.L., Itagaki, S., Akiyama, H., and McGeer, E.G. 1988, Ann. Neurol., 24, 574.

[82] Mochizuki, H., Goto, K., Mori, H., and Mizuno, Y. 1996, J. Neurol. Sci. 137, 120.

[83] Hartley, A., Stone, J.M., Heron, C., Cooper, J.M., and Schapira, A.H.V. 1994, J. Neurochem., 63, 1987.

[84] Wu, Y., Blum, D., Nissou, M.F., Benabid, A.L., and Verna, J.M.

1996, Neurosci. Lett., 221, 69.

[85] Dipasquale, B., Marini, A., and Youle, R. 1991, Biochem. Biophys. Res. Commun., 181, 1442.

[86] Itano, Y., and Nomura, Y. 1995, Brain Res., 704, 240.

[87] Mochizuki, H., Nakamura, N., Nishi, N., and Mizuno, Y. 1994, Neurosci. Lett 170, 191,.

[88] Jackson-Lewis, V., Jakowec, M., Burke, R.E., and Przedborski, S. 1995, Neurodegeneration, 4, 257.

[89] Turski, L., Bressler, K.R, Löschmann P.A., and Wachtel, H. 1991, Nature, 349, 414.

[90] Chan, P., Langston, J.W., and Di Monte, D. 1993, J. Pharmacol. Exptl. Ther., 267, 1515.

[91] Santiago, M., Venero, J.L., Machado, A., and Cano, J. 1992, Brain Res., 586, 203.

[92] Srivastava, R., Brouillet, E., Beal, M.F., Storey, E., and Hyman, B.T. 1993, Neurobiol. Aging, 14, 295.

[93] Carboni, S., Melis, F., Pani, L., Hadjiconstantinou, M., and Rossetti, Z.L. 1990, Neurosci. Lett., 117, 129.

[94] Girault, J.A., Halpain, S., and Greengard, P. 1990, TINS 8, 325.

[95] Meldrum, B., and Garthwaite, J. 1990, TIPS, 11, 379.

[96] Sonsalla, P.K., Zeevalk, G.D., Manzino, L., Giovanni, A., and Nicklas, W.J. 1992, J. Neurochem., 58, 1979.

[97] Michel, P.P., and Agid, Y. 1992, Brain Res., 597, 233.

[98] Finiels-Marler, F., Marini, A.M., Williams, P., and Paul, S.M. 1993, J. Neurochem., 60, 1968.

[99] Rossetti, Z.L., Sotgiu, A., Sharp, DE, Hadjiconstantinou, M., and Neff, N.H. 1988, Biochem. Pharmacol., 37, 4573.

[100] Hasegawa, E., Takeshiga, K., Oishi, T., Murai, Y., and Minikami S. 1990, Biochem. Biophys. Res. Commun., 170, 1049.

[101] Di Monte, D., Sandy, M.S., Ekström, G., and Smith, M.T. 1986, Biochem. Biophys. Res. Commun., 137, 303.

[102] Lambert, C.E., and Bondy, S.C. 1989, Life Sci., 44, 1277.

[103] Sinha, B.K., Singh, Y., and Krishna, G. 1986, Biochem. Biophys. Res. Commun., 135, 583.

[104] Adams, J.D., Klaidman, L.K., and Cadenas, E. 1992, Ann. New York Acad. Sci., W. Langston and A. Young, (Ed.), New York, 239.

[105] Adams, J.D., Klaidman, L.K., and Leung, A.C. 1993, Free Rad. Biol. Med., 15, 181.

[106] Corongiu, F.P., Dessi, M.A., Banni, S., Bernardi, F., and Piccardi, M.P. 1987, Biochem. Pharmacol., 36, 2251.

Santiago Ambrosio et al.

Intracerebral applications of MPP+

[107] Di Monte, D., Jewell, S.A., Ekström, G., Sandy, M.S., and Smith, M.T. 1986, Biochem. Biophys. Res. Commun., 137, 310.

[108] Chiueh, C.C., Krishna, G., Tulsi, P., Obata, T., Lang, K., Huang, S-J., and Murphy, D.L. 1992, Free Rad. Biol. Med., 13, 581.

[109] Montgomery, J., Ste-Marie, L., Boismenu, D., and Vachon, L. 1995, Free Rad. Biol. Med., 19, 927.

[110] Santiago, M., Matarredona, E.R., Granero, L., Cano, J., and Machado, A. 1997, J. Neurochem., 68, 732.

[111] Nagatsu, T., and Hirata, Y. 1987, Eur. Neur., 26, 11.

[112] Nagatsu, T. 1987, Neurochem. Int., 11, 375.

[113] Mogi, M., Harada, M., Kojima, K., Kiuchi, K., and Nagatsu, T. 1988, J. Neurochem., 50, 1053.

[114] Awashi, Y.C., Singh, S.V., Shen, R-S., Abell, C.W., Gessner, W., and Brossi, A. 1987, Neurosci. Lett., 81, 159.

[115] Zang, L-Y., and Misra H.P. 1993, Mol. Cell. Biochem., 126, 93.

[116] Hulley, P., Hartikka, J., and Lubbert, H. 1995, J. Neural Transm. Suppl., 46, 217.

[117] Hulley, P., Hartikka, J., Abdel'Al, S., Engels, P., Buerki, H.R., Wiederhold, K.H., Muller, T., Kelly, P., Lowe, D., and Lubbert, H. 1995, Eur. J. Neuroci., 7, 2431.

[118] Spina, M.B., Squinto, S.P., Miller, J., Lindsay, R.M., and Hyman, C. 1992, J. Neurochem., 59, 99.

[119] Kirschner, P.B., Jenkins, B.G., Schulz, J.B., Finkelstein, S.P., Matthews, R.T., Rosen, B.R., and Beal, M.F. 1996, Brain Res., 713, 178. [120] Ambrosio, S., Espino, A., Cutillas, B., and Bartrons, R. 1996, Neurochem. Res., 21, 73.

[121] Moncada, S., and Higgs, A. 1993, The New Engl. J. Med., 32, 2002.

[122] Hunot, S., Boissière, F., Faucheux, B., Brugg, B., Mouatt-Prigent, A., Agid, Y., and Hirsch, E.C. 1996, Neuroscience, 72, 355.

[123] Smith, T.S., Swerdlow, R.H., Parker Jr., W.D., and Bennett Jr., J.P. 1994, NeuroRep., 5, 2598.

[124] Schulz, J.B., Matthews, R.T., Muqit, M.M., Browne, S.E., and Beal, M.F. 1995, J. Neurochem., 64, 936.

[125] Przeborski, S., Jackson-Lewis, V., Yokoyama, R., Shibata, T., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 4565.

[126] Hantraye, P., Brouillet, E., Ferrante, R., Palfi, S., Dolan, R., Matthews, R.T., and Beal, M.F. 1996, Nature Med., 2, 1017.

[127] Ohta, A., Takagi, H., Matsui, H., Hamai, Y., Iida, S., and Esumi, H. 1993, Neurosci. Lett., 158, 33.

[128] Dalmau, M., Joaquin, M., Nakamura, T., Bartrons, R., and Gil, J. 1996, Exp. Cell Res., 228, 14.

[129] Cosi, C., Colpaert, F., Koek, W., Degryse, A., and Marien, M. 1996, Brain Res., 729, 264.

[130] Snyder, S.H. 1992, Curr. Op. Neurobiol., 2, 323.

[131] Hanbauer, I., Wink, D., Osawa, Y., Edelman, G.M., and Gally, J.A. 1992, NeuroRep., 3, 409.

[132] Packer, M.A., Miesel, R., and Murphy, M.P. 1996, Biochem. Pharmacol., 51, 267.

121

Abreviatures

| 6-OHDA | 6-hidroxidopamina |
|-------------------|--|
| AADC | .Descarboxilasa dels aminoàcids aromàtics |
| BMP-2 | Proteïna morfogènica òssia-2 |
| BHE | .Barrera hematoencefàlica |
| CFM | Cèl·lules fetals mesencefàliques |
| COMT | Catecol-O-metil transferasa |
| CSF | Fluid cerebroespinal |
| DA | Dopamina |
| DAT | Transportador de dopamina |
| DBS | Estimulació cerebral profunda |
| DDC | Dopa-descarboxilasa |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DOPAC | Àcid 3,4-dihidroxifenil acètic |
| DYN | Dinorfina |
| E14 | fetus de rata de 14 dies postfecundació. |
| ENK | Encefalina |
| GB | Ganglis basals |
| GABA | Àcid gamma- aminobutíric |
| GDNF | Factor neurotròfic derivat de glia |
| GFAP | proteína fibrilar acídica de la glia |
| GPe | Globus pàl·lid extern |
| GPi | Globus pàl·lid intern |
| GSH/GSSG | Glutatió reduït/oxidat |
| HVA | Àcid homovaníl·lic |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta definició |
| I-MAO | .Inhibidors de la monoamino oxidasa |
| КО | knockout |
| LB | Cossos de levy |
| L-DOPA o levodopa | L-3,4-dihidroxifenilalanina |
| LN | Neurites de levy |
| LC | Lloc ceruli |
| MFB | Feix prosencefàlic medial |
| MPTP | 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina |

| no i metir i tempiramani |
|---|
| .Nucli accumbens |
| .NADH deshidrogenasa |
| .neurones dopaminèrgiques mesencefàliques |
| Neuromelanina |
| .Gens relacionats amb les formes familiars de la PD |
| .Malaltia de Parkinson idiopàtica o esporàdica |
| .Paraformaldehid |
| .Cossos pàl·lids |
| .Radicals lliures derivats de l'oxigen |
| .Radicals lliures derivats del nitrogen |
| .medi Roswell Park Memorial Institute |
| .Substància negra |
| .Part compacta de la substància negra |
| .Sistema nerviós central |
| .Part reticulada de la substància negra |
| .Substància P |
| .semiquinones |
| .Sèrum salí fisiològic |
| .Nucli subtalàmic |
| .Tirosina hidroxilasa |
| .Sistema ubiquitina-proteasoma |
| .Transportador vesicular de dopamina |
| .Àrea ventrotegmental |
| |

